



СЛОБОДНИ РАДИКАЛИ И АНТИОКСИДАНСИ НАШИ ПРИЈАТЕЉИ ИЛИ НЕПРИЈАТЕЉИ?

Милош Мојовић

Антиоксиданси и слободни радикали



- Антиоксиданси и слободни радикали су неизоставни део нашег свакодневног живота.
- Имамо их у сваком делу тела, свакој ћелији, храни коју конзумирамо.
- АО и СР су у жижи интересовања када се говори о узроку и превенцији разних болести.
- Апотеке су препуне препарата, а новине су препуне текстова о "спасоносном" дејству антиоксиданаса.
- Питање је да ли су сви слободни радикали "лоши" а сви антиоксиданси "добри" момци?
- Ово је поље проучавања биофизичке хемије и редокс-биологије.

Баланс живота



- **Живот је баланс између два процеса**

Антиоксиданси снижавају ниво слободних радикала омогућавајући им да без причињавања велике штете изводе корисне биолошке функције.

- **Да ли би живот био могућ без слободних радикала ?**

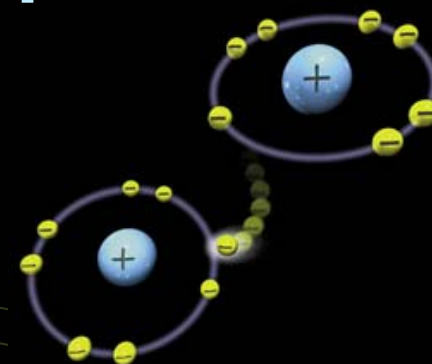
Не у форми која нам је данас позната. Производња слободних радикала је саставни део најважнијих биохемијских механизма (ћелијско дисање, раст, одбрана од патогена).

- **Да ли нас слободни радикали оштећују ?**

Да, и због тога постоји низ одбрамбених механизма организама у циљу одржавања вијабиниости сопствених ћелија.

Шта су то слободни радикали?

Слободни радикали су све врсте које могу самостално да егзистирају поседујући један или више неспарених електрона



■ Какви су то - неспарени електрони?

То су електрони који у атомској (или молекулској) орбитали **немају свог "пара"**, већ је заузимају сами.

■ Где срећемо слободне радикале?

- Најједноставнији слободни радикал је атомски водоник.
- Сами их правимо (када нпр. уређујемо нокте, хомолитички цепамо ковалентне дисулфидне везе у кератину, стварајући $\cdot\text{S}$ радикале).
- Сагоревањем органских материја (цепање C-C, C-O, C-H).
- Уколико не-радикалу додамо један електрон.
- Под утицајем UV зрачења (цепање O-O везе у H_2O_2 даје два $\cdot\text{OH}$ радикала) или из воде (цепање O-H везе под утицајем X и γ -зрака даје $\cdot\text{H}$ и $\cdot\text{OH}$) ... овај $\cdot\text{OH}$ радикал чини више штете живим организмима од јонизујућег зрачења.

Како је све почело?



■ Кисеоник наш насушни

- Да би се у митохондријама ефикасно произвела енергија потребан нам је кисеоник.
- Ова наша потреба за кисеоником врло је "занимљива" с обзиром да је кисеоник токсичан гас који изазива генетске мутације.
- Ми као кисеонични зависници "преживљавамо" само захваљујући томе што смо развили јаку антиоксидативну одбрану; (*Halliwell and Gutteridge, 2006*).

■ Кисеоник - полутант?

- Кисеоник је у давној прошлости у ствари био полутант, гас који је "загадио" Земљину атмосферу (добијен цепањем воде, као резултат фотосинтетског процеса у цијанобактеријама); (*Lane, 2002*).
- Појава кисеоника је са друге стране била веома корисна јер је узроковала појаву озонског омотача у стратосфери (као штита против опасних UV-C зрака) и уклонила феро-ione (Fe^{+2}) из воденог окружења.

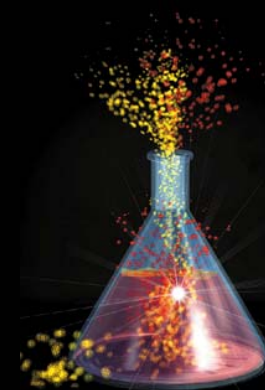
Кратка историја кисеоника



■ Како су биљке успеле да развију принцип фотосинтезе ако на праисторијској Земљи није било кисеоника?

- Атмосфера се у том периоду претежно састојала из N_2 и CO_2 (без O_3) и у таквом окружењу лице Земље је интензивно бивало бомбардовано UV зрачењем.
- Иако је ниво кисеоника на Земљи тада био $<0.1\%$, ниво H_2O_2 је био знатно већи (добивао се фотохемијским реакцијама из O_2 и долазио на Земљу са кишом).
- Уз велику количину гвожђа у Fe^{2+} облику, Фентонова реакција је представљала велику претњу живом свету.
- Првобитни прекурсор PSII је тада вероватно био H_2O_2 и верује се да је као последица фотосинтезе и великог развоја биљног света, ниво кисеоника у тој ери порастао и до 35% (зато је ниво CO_2 драстично опао).
- Из тог периода имамо формирања великих наслага угља и нафте.
- Инсекти из овог периода су користећи повећану количину кисеоника нарасли до огромних размера (у односу на данас).
- Биљке и животиње су тада морале да изграде јаку антиоксидативну одбрану што потврђују проучавања биљака које су из тог периода опстале све до данас.

Фентонова хемија



■ Фентонова реакција

- Једна од најважнијих реакција која је можда кључ за разумевање многих биохемијских процеса у организму.
- Као резултат ове реакције имамо производњу високореактивног и токсичног хидроксилног радикала ($\cdot\text{OH}$).



- Живи организми пажљиво контролишу интензитет Фентонове реакције ограничавајући расположивост Fe^{2+} и H_2O_2 .
- Било би изузетно тешко одржати живот на Земљи која је преплављена гвожђем у Fe^{2+} облику.
- Такође, у живим организмима можемо наћи посебну групу протеина - каталазе које каталишу реакцију цепања H_2O_2 .

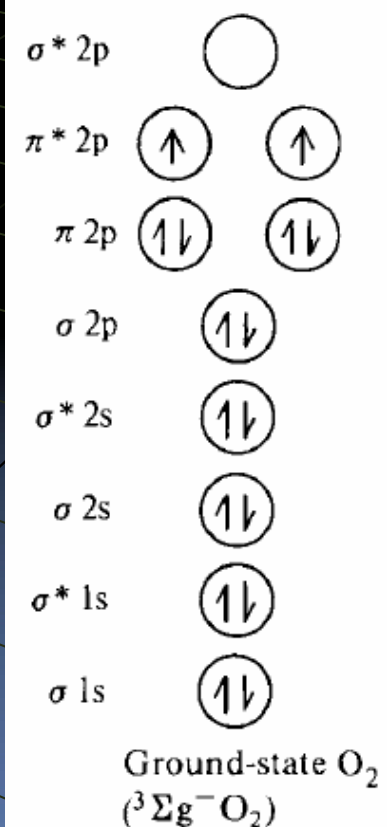


ROS (Reactive Oxygen Species)

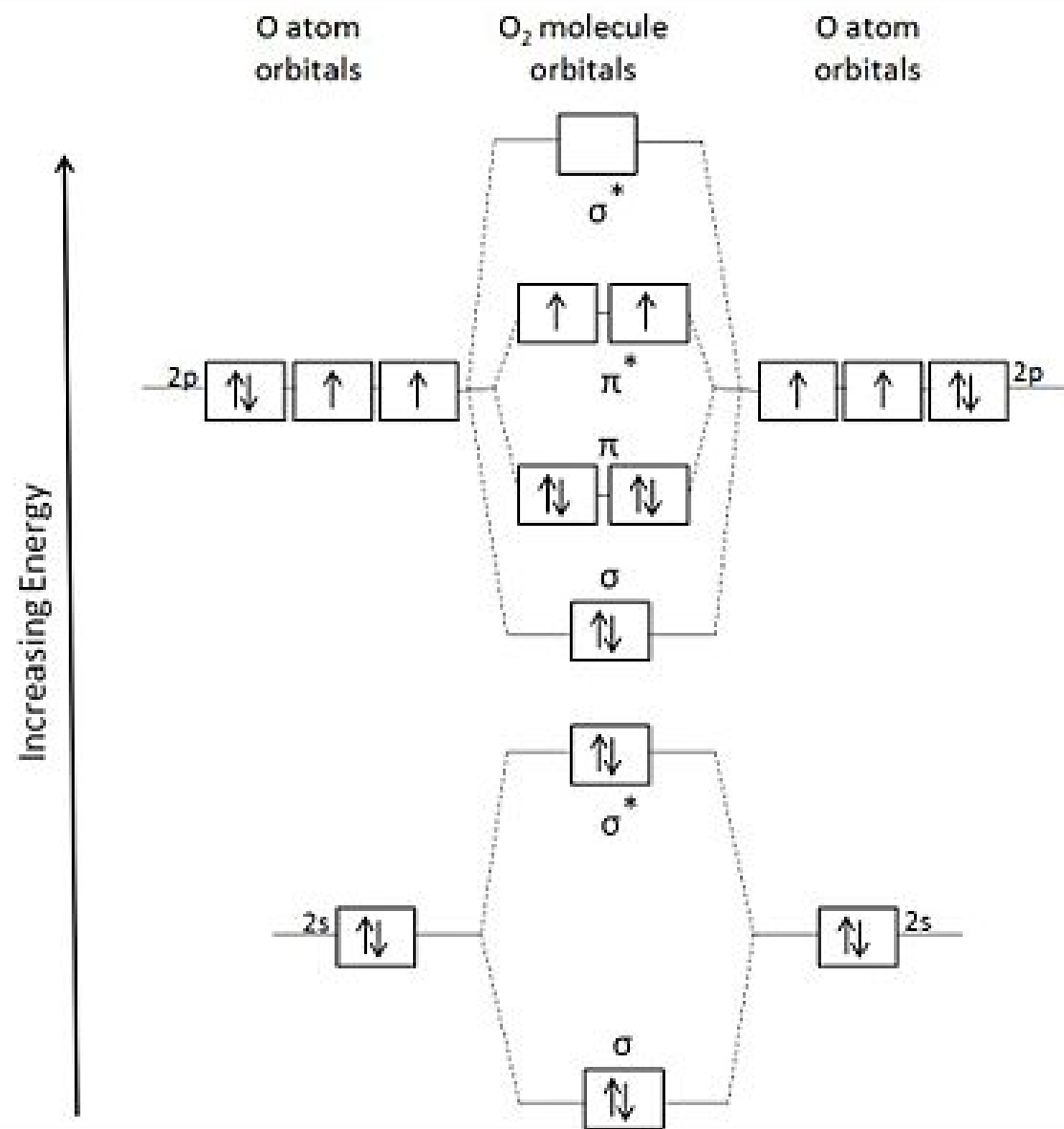
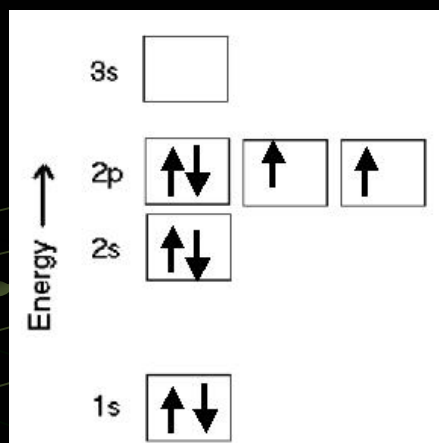
- Овај израз не укључује само радикале него и остале реактивне врсте.
- У живим системима постоји пуно различитих типова слободних радикала.
- Ми ћемо се овде фокусирати само на оне који садрже кисеоник зато што су најзаступљенији и потенцијално најреактивнији.

- **O₂ (молекул кисеоника)**

- Сам по себи је слободан радикал зато што има два неспарена електрона (тако да би могао да се пише и као $\cdot\text{O}_2$) (*Gilbert, 1981; Halliwell and Gutteridge, 2006*).
- Да мало појаснимо ... два електрона у O₂ имају паралелне спинове (исти спински квантни број) и то је његово основно стање у коме постоји око нас.
- Кисоник је термодинамички потенцијално веома добар оксиданс (жели да оксидује не-радикал тако што му узме један електронски пар).
- Међутим, оба одузета електрона морају имати исти спин (да би се уклопили у празна места на π^* орбитали).
- Електронски парови у атом. или молекул. орбиталама не могу испунити овај услов (зато што имају обрнуте спинове: +1/2 и -1/2).
- Ово ограничење чини да ће O₂ не-радикалу пре одузети по један електрон (што ову реакцију чини спором), али ће веома ефикасно одузети електрон неком радикалу (брза реакција).



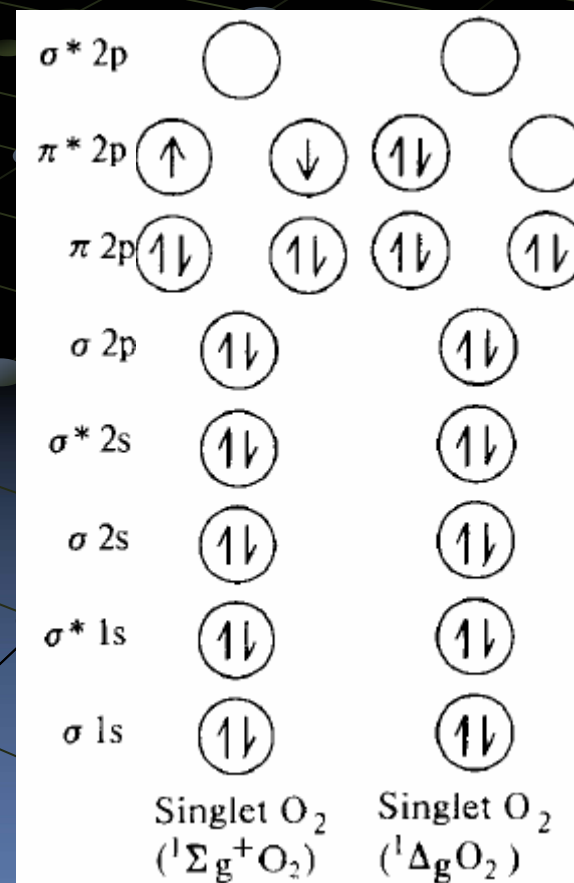
O₂ - Кисеоников атом и молекул (молекулске орбитале)



Кисеонични слободни радикали

■ $^1\text{O}_2$ (синглетни кисеоник)

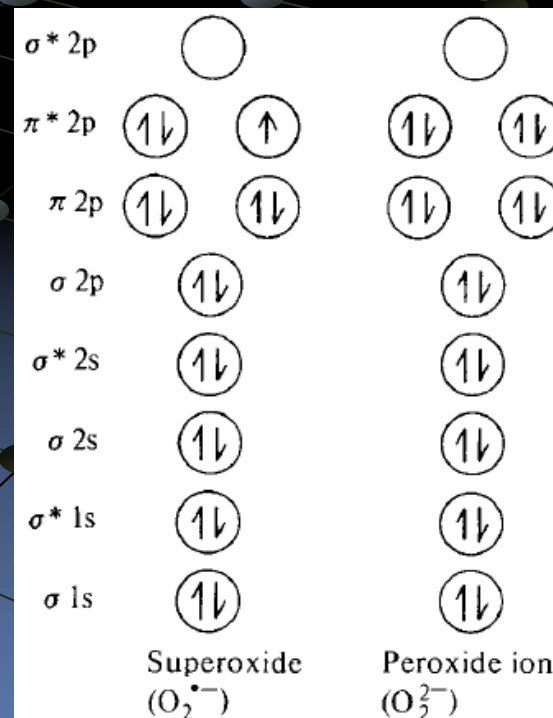
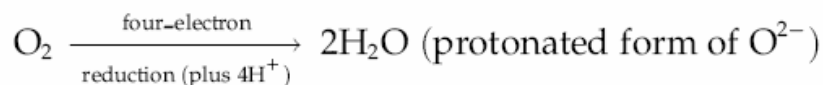
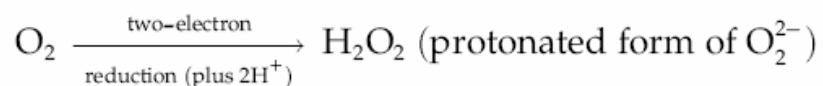
- Представља реактивнију форму кисеоника (O_2).
- Може се добити уколико молекулу кисеоника додамо енергију довољну да му прерасподели електроне као што је приказано на слици (*Footo et al., 1985*).
- У обе форме синглетног кисеоника спинска забрана је укинута те он веома ефикасно може да оксидује најразноврсније форме (протеине, ДНК, липиде ...).
- Стање $^1\Sigma_g^+$ врло брзо прелази у стабилније стање $^1\Delta_g$ које се и једино може наћи у биолошким системима.
- Треба запазити да $^1\Delta_g$ стање није слободни радикал.
- Синглетни кисеоник се може формирати у биљкама (нпр. хлоропластима) али и у животињама - најпре у кожи и оку током сунчања.



Кисеонични слободни радикали

■ $\cdot\text{O}_2^-$ (супероксидни радикал)

- Такође једна од веома реактивних форми кисеоника (O_2).
- Добија се уколико се молекулском кисеонику дода један електрон. Тада он улази у једну π^* антивезивну орбиталу при чему се добија супероксидни радикал (или прецизније - супероксид радикал анион).
- Упркос свом "супер имену", са само једним неспареним електроном, супероксидни радикал је мање радикал од O_2 (али је зато много реактивнији).
- Уколико супероксидном радикалу додамо још један електрон, он ће постати пероксидни анион O_2^{2-} (нерадикал са слабијом О-О везом) од кога се редукцијом може добити H_2O_2 .
- Додамо ли још 2 електрона овом систему у потпуности елиминешемо О-О везу и добијамо два O^{2-} јона (од којих се редукцијом може добити H_2O).



Реактивне кисеоничне врсте



■ Реактивне према свему?

- Израз "реактивне" је релативан. На пример, супероксидни радикал и водоник пероксид су **веома селективни** у својим реакцијама са **биолошким молекулима**.
- Са друге стране, хидроксилни радикал ($\cdot\text{OH}$) **напада све око себе**.
- Термин "реактивне врсте" је данас проширен, па се под њим подразумевају и оне врсте које садрже: реактивни азот, хлор или бром.

■ Па колико има тих реактивних врста?

- Пуно, набројимо неке од њих ...

Радикали:

$\cdot\text{O}_2^-$ (супероксидни радикал), $\cdot\text{OH}$ (хидроксилни радикал), $\cdot\text{HO}_2$ (хидро пероксилни радикал тј. протонисани супероксини радикал), $^1\text{O}_2$ (синглетни кисеоник $^1\Sigma_g^+$), $\cdot\text{NO}$ (азот моноксид - сигнални молекул), $\cdot\text{RO}_2$ (пероксил радикал), $\cdot\text{RO}$ (алкококсил радикал), $\cdot\text{NO}_2$ (азот диоксид), $\cdot\text{NO}_3$ (нитратни радикал)

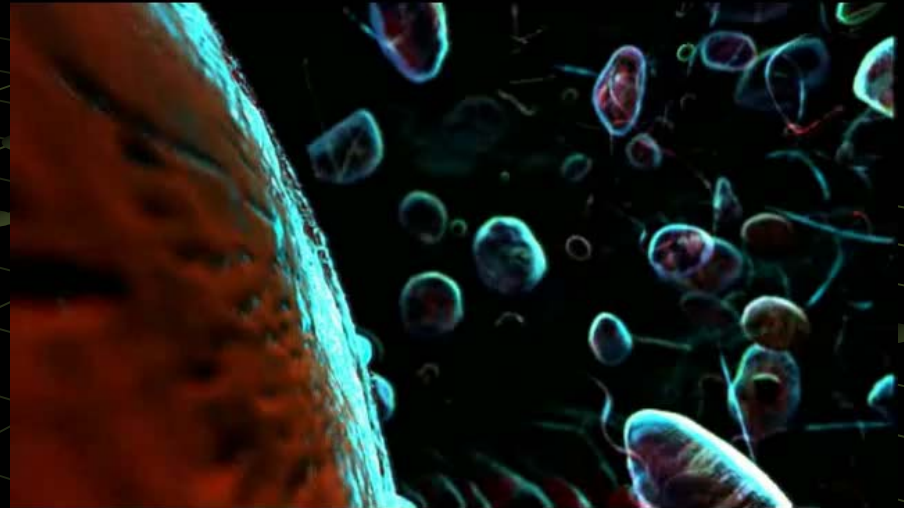
Нерадикали:

H_2O_2 (водоник пероксид), $^1\text{O}_2$ (синглетни кисеоник $^1\Delta_g$), ROOH (органски пероксиди), ONOO^- (пероксинитрит), O_3 (озон), O_2NOO^- (пероксинитрат) ...

Какву штету праве слободни радикали и остале реактивне врсте?

■ Основни типови реакција у биолошким системима

- Радикали реагују са неутралним биол. молекулама оштећујући их и стварајући нове радикале (ланчана реакција).
- Радикал може дати електрон нерадикалу и понашати се као редукциони агенс стварајући нове радикале.
- Радикал може узети електрон нерадикалу и тако бити оксидациони агенс опет стварајући нове радикале.
- Радикал може “откинути” водоников атом из C-H везе у органском молекулу стварајући “Carbon Centered” радикале (који са O_2 лако праве опасне пероксил радикале $\bullet RO_2$).
- На овај начин изазивају се: оштећења ДНК, ћелијских мембрана, протеина.
- Радикалски индукована липидна пероксидација смањује мембранску флуидност, повећава се неконтрлисано “цурење” кроз двослој, што има погубне ефекте на целокупан мембрански транспорт, оштећујући мембранске протеине, рецепторе, ензиме и јонске канале.
- Мешавина најразличитијих токсичних продуката радикалских реакција за последицу има губљење мембранске структуре и: старење, ћелијску смрт, појаву различитих системских болести као што су: канцер, појаву неуродегенеративних болести (МС, Алцхајмер, АЛС), дијабетиса, кардиоваскуларних болести ...



Антиоксидативна одбрана



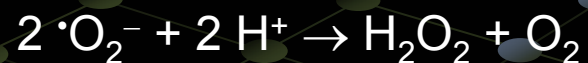
■ Како се организам бори против токсичности O₂ ?

Стратегија 1: Смањити присуство O₂ и спречити трансформацију у "ROS"

- Највећи извор $\cdot\text{O}_2^-$ радикала у већини аеробних ћелија су **митохондрије** (тј. електрон транспортни ланац који се у њима одвија). Због тога се у њима налазе **антиоксиданси** (у овом случају невезани протеини који или спречавају да електрон пређе на O₂ формирајући $\cdot\text{O}_2^-$ или везују металне јоне спречавајући појаву Фентонове реакције и $\cdot\text{OH}$ радикала).

Стратегија 2: Уклањање "ROS"

- Ензими као што је "SOD" (**супероксид дисмутаза**) имају за циљ да из околине уклоне радикале (у овом случају $\cdot\text{O}_2^-$ радикал) каталишући реакцију:



- Настали H₂O₂ такође треба уклонити, а тиме се баве ензими **каталазе** и **пероксидазе** (које користе различите супstrate за нпр. Аскорбат и Глутатион пероксидаза - која садржи Se) и пероксиредоксини.



- Употреба **антиоксиданаса** као врста које се "жртвују" у циљу уклањања "ROS". Приликом реакције са "ROS" антиоксиданси бивају оксидовани.

M6

- Најпознатији антиоксиданси су: **Аскорбат** (витамин "C") и **Токоферол** (витамин "E") чије радикалске форме су слабо реактивне. Биљке саме праве "Asc" и "Toc" али ми људи морамо да их уосимо једући биљке.

- Занимљиво је да многе животиње могу правити витамин "C" (али се при томе ствара H₂O₂) што се не догађа код биљака (да ли смо ми зато временом изгубили ову могућност?)

Да ли су "ROS" само непријатељи?



- Па ако су "ROS" толико штетни, зашто их организам у потпуности не елиминише?

- "ROS" такође имају веома корисну улогу у метаболизму па су зато само развијане антиоксидативне одбране да би се смањило њихово штетно дејство.

- **Која је корист од "ROS"?**

- Производња "ROS" од стране фагоцита гастроинтестиналног и респираторног тракта директно учествује у одбрани од микроорганизама.

M5

M2

Производња "ROS" омогућава ћелијску сигнализацију и регулацију важних ћелијских процеса (ензимску фосфорилацију и дефосфорилацију).

M3

- Митохондријална "ROS" производња (за коју се дуго сматрало да је само једна нежељена последица "цурења" електрона у е-транспортном ланцу) се испоставила као неопходна у процесу комуникације између ћелијских органела и транскрипције гена.

- Производња "ROS" у биљкама вероватно има кључну улогу у процесима "омекшавања" ћелијског зида и омогућава раст биљака.

- Производња редукујућих радикалских врста (нпр. •Н радикала, о чијем постојању у биолошким системима се дуго спекулисало) показала се као веома важна у оржавању финог оксидативног баланса у метаболичким процесима.

А шта се догађа када се баланс наруши?



■ Оксидативни стрес

- Уколико је количина "ROS" много већа од количине антиоксиданаса долази до оксидативног стреса (OC).
- У стању OC долази до оксидативних оштећења биомолекула.
- OC настаје или ако долази до повећања производње "ROS" или уколико опадне ниво антиоксиданаса или метала као што су: Cu, Fe, Zn, Mg.
- OC може настати и због непознато изазване појачане активности природних система за производњу "ROS".

■ Шта се догађа са ћелијама под оксидативним стресом?

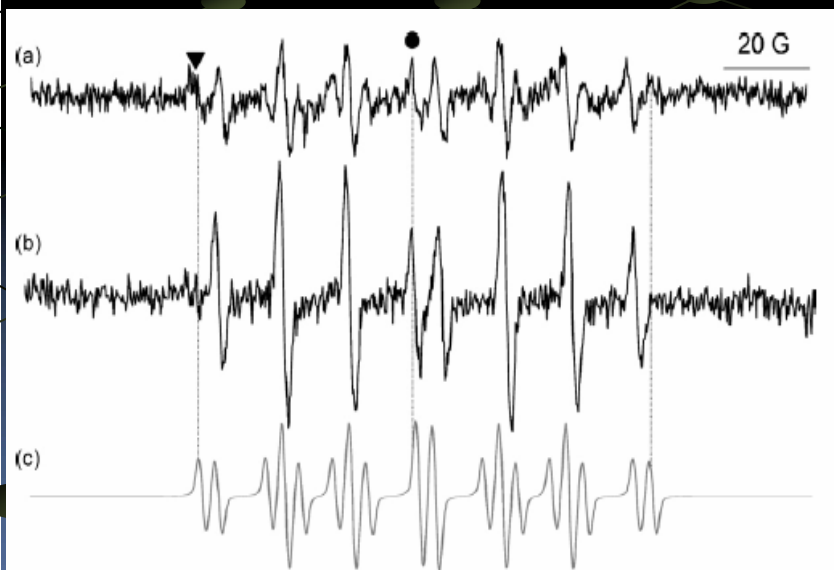
- Расте унутарћелијски ниво слободних метала (Ca^{2+} , Fe^{2+}) што изазива Фентонову реакцију.
- Може се изазвати пролиферација ћелија (што може бити корисно у зрастању рана али лоше уколико се догоди фиброза ткива).
- Ћелије се адаптирају на стрес покретањем анти-стрес механизма што их штити од оштећења али некада може узроковати и "претерану заштиту" од стреса (ћелије постају резистентне на повишен ниво "ROS").
- Тежи ниво OC изазива прекид ћелијских циклуса и њихово убрзано старење а тежак ниво OC изазива оштећења ДНК, апоптозу и некрозу.

Експерименти који указују на постојање (Н-радикала) у биолошким системима

-Постојање ове редукујуће врсте у нормалним процесима производње радикала у биолошким системима указује на могуће регулационе механизме које контролишу ниво оксидативног стреса.

-Ово може бити узрок за појаву неких системских болести.

Пример: улога слободних радикала код амиотрофичне латералне склерозе (АЛС).



Нормална особа

АЛС пацијент

Компјутерска симулација ОН и Н радикала

Код АЛС пацијената постоји повећана продукција "злих" ОН радикала која није регулисана производњом "добрих" Н.

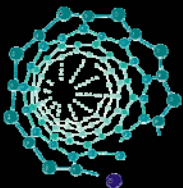
Спектри добијени ЕПР спектроскопијом

На крају укратко ...



- "ROS" су свуда око нас и у нама. Ми не можемо живети без њих јер би вероватно умрли од неке инфекције.
- "ROS" нас на крају убију због дугогодишњих оштећења које нам праве током живота.
- Од тога колико наш организам има развијен систем одбране од "ROS" зависи да ли ћемо се разболети (рак, неуродегенеративне болести, друге системске болести ...).
- "ROS" је есенцијалан за ћелијску сигнализацију, чини нас живима док нам деца не одрасту ...
- **Зашто нас узимање антиоксидативних препарата не чини вечнима?**
Зато што организам регулише ниво "ROS" и антиоксиданаса тако пажљиво да га ти додаци ни мало не потресају (па се ни оксидативна оштећена не смањују).
- **Па шта да радимо?**
Ништа посебно, омогућите организму нормалан унос здраве хране а он ће се сам побринути за остало ... или ...





Универзитет у Београду
ФАКУЛТЕТ ЗА ФИЗИЧКУ ХЕМИЈУ

Студентски трг 12-16 / Поштански факс 47 / 11158 Београд 118 / Пак 105305 / Србија
Тел/Факс (+38111) 2187-133 / ftf@ftn.bg.ac.rs / www.ftn.bg.ac.rs

Хвала на пажњи!

Потребне дневне дозе минарала и витамина

<i>Vitamin or Mineral</i>	<i>Dietary Reference Intakes (DRI)</i>	<i>Recommended Dietary Allowances (RDA)</i>	<i>Safe and Adequate Intake/Range (or Estimate)</i>
Vitamin A	Men: 1000 mcg Women: 800 mcg		
Vitamin D		5 - 10 mcg	
Vitamin E		Men: 10 mg Women: 8 mg	
Vitamin K		Men: 70-80 mcg Women: 60-65 mcg	
Vitamin C		Men: 90 mg Women: 75 mg	
Choline	Men: 550 mg Women: 425 mg		
Thiamin (B1)	Men: 1.2 - 1.5 mg Women: 1-1.1 mg		
Riboflavin (B2)	Men: 1.3 mg Women: 1.1 mg		
Niacin (B3)	Men: 16 mg Women: 14 mg		
Pantothenic Acid	5 mg		
Vitamin B6	1.3 - 1.7 mg		
Folic Acid/Folate	400 mcg		
Vitamin B12	2.4 mcg		
Biotin			(30 mcg)
Calcium	1000 - 1200 mg		
Chloride			(750 mg)
Magnesium	Men: 400-420 mg Women: 310-320 mg		
Phosphorus	700 mg		
Potassium			(2000 mg)
Sodium			(200 - 500 mg)
Sulfur			(100 mg)
Boron			(2 - 5 mg)
Chromium			50 - 200 mcg
Cobalt			(a few mcg)
Copper			1.5 - 3.0 mg
Fluoride	Men: 4.0 mg Women: 3.0 mg		
Iodine		150 mcg	
Iron		10 - 15 mg	
Manganese			2.5 - 5.0 mg
Molybdenum			75 - 250 mcg
Selenium		Men: 70 mcg Women: 55 mcg	
Zinc		Men: 15 mg Women: 12 mg	

<http://www.vitamin-insight.com/basics/daily-intake-chart.aspx>