

FIZIOLOGIJA SLOBODNIH RADIKALA* PHYSIOLOGY OF FREE RADICALS

Jelka Stevanović, Sunčica Borozan, S. Jović, I. Ignjatović**

Slobodni radikali podrazumevaju svaki atom, molekul, jon, grupu atoma ili molekula sa jednim ili više nesparenih elektrona u spoljašnjoj orbitali. U njih spadaju: azot-oksidi (NO^*), superoksid anjon radikal ($\text{O}_2^{\bullet-}$), hidroksilni radikal (OH^*), peroksilni radikal (ROO^*), alkoksilni radikal (RO^*) i hidroperoksilni radikal ($\text{HO}_2^{\bullet-}$). Međutim, u reaktivne kiseonične vrste ubrajamo i komponente bez nesparenih elektrona u spoljašnjoj orbitali (tzv. reaktivni neradikalni agensi), kao što su: singlet kiseonik ($^1\text{O}_2$), peroksinitrit (ONOO^-), vodonik-peroksid (H_2O_2), hipohlorasta kiselina (npr. HOCl) i ozon (O_3).

Visoke koncentracije slobodnih radikala izazivaju oksidativni stres koji je preduslov mnogobrojnih patoloških efekata. Međutim, niske i umerene koncentracije ovih materija, koje nastaju sasvim normalno tokom metaboličke aktivnosti ćelije, igraju višestruke značajne uloge u mnogim reakcijama. Neke od njih su: regulacija signalnih puteva unutar ćelije i među ćelijama, uloga hemoatraktanata i aktivatora leukocita, uloga u fagocitozi, učesće u održavanju, promeni položaja i oblika ćelije, pomoć ćeliji tokom adaptacije i oporavka od oštećenja (npr. izazvanih fizičkim radom), uloga u normalnom ćelijskom rastu, programiranoj ćelijskoj smrti (apoptozi) i ćelijskom starenju, u sintezi esencijalnih bioloških jedinjenja i proizvodnji energije, kao i doprinos regulaciji vaskularnog tonusa, odnosno vaskularizacije tkiva.

Ključne reči: slobodni radikali, izvori, uloge

Molekulski kiseonik, koji je suštinski važan za proizvodnju energije, jednovalentnom redukcijom, može proizvesti reaktivne međuproizvode, koji na kraju daju kratkoživeće ali hemijski vrlo aktivne slobodne radikale (SR). Pod tim se podrazumeva svaki atom, molekul, jon, grupa atoma ili molekul sa jednim ili više

* Rad primljen za štampu 25. 10. 2010. godine

** Dr sci. vet. med. Jelka Stevanović, profesor, dr sci. Sunčica Borozan, profesor, mr sci. vet. med. Slavoljub Jović, asistent, Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu; dr med. Igor Ignjatović, asistent Klinika za digestivnu hirurgiju - I hirurška klinika, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

nesparenih elektrona u spoljašnjoj orbitali. Premda su im koncentracije relativno niske (npr. superoksid anjon radikala ima svega 30-300 femtograma/g tkiva) i imaju vrlo kratak poluživot (tabela 1), slobodni radikali su hemijski veoma reaktivni. Naime, njihov kiseonik je neuporedivo reaktivniji od molekuskog kiseonika iz vazduha (Noguchi i Niki, 1999; Marlin i sar., 2002).

Tabela 1. Poluživot reaktivnih metabolita (Halliwell i Gutteridge, 1999) /
Table 1. Half-life of reactive metabolites (Halliwell and Gutteridge, 1999)

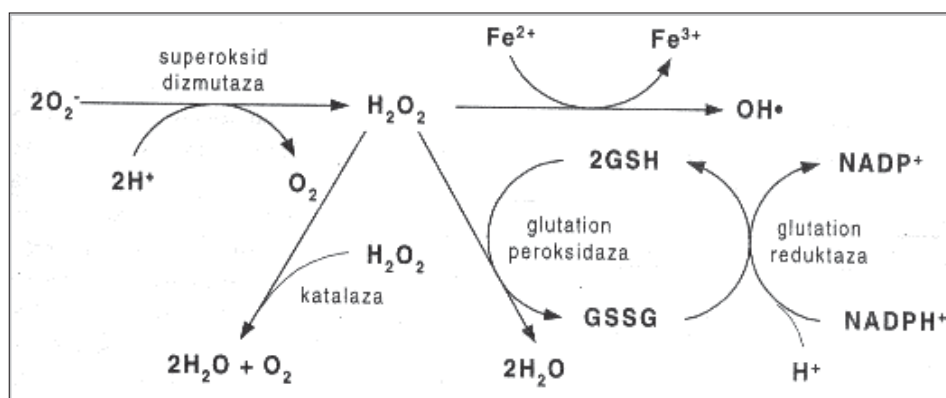
	Simbol / Symbol	Naziv / Name	Poluživot / Half-life
Radikali / Radicals	$O_2^{\bullet-}$	Superoksid anjon radikal / <i>Superoxide anion radical</i>	10-20 s
	HO_2^{\bullet}	Hidroperoksidni radikal / <i>Hydroperoxide radical</i>	7 s
	OH^{\bullet}	Hidroksilni radikal / <i>Hydroxyl radical</i>	10^{-9} s
	RO^{\bullet}	Alkoksil radikal / <i>Alcoxyl radical</i>	10^{-6} s
	ROO^{\bullet}	Peroksil radikal / <i>Peroxyl radical</i>	7 s
	NO^{\bullet}	Azot-oksidi radikal / <i>Nitrogen-oxide radical</i>	5 s
Neradikali / Non-radicals	H_2O_2	Vodonik peroksid / Hydrogen peroxide	stabilan / <i>stable</i>
	$ROOH$	Hidroperoksid / Hydroperoxide	minutima stabilan / <i>minutes-stable</i>
	$HOCl$	Hipohlorasta kiselina / Hypochloric acid	stabilan / <i>stable</i>
	$RNHCl$	N-hloramin / N-chloramine	stabilan / <i>stable</i>

U slobodne radikale ubrajamo reaktivne kiseonične vrste (ROS – Reactive Oxygen Species) i reaktivne azotne vrste (RNS – Reactive Nitrogen Species) – podgrupa oksidansa koji nastaju od azot-oksida (Valko i sar., 2007). Zajedno, ROS i RNS, čine reaktivne kiseonične i azotne vrste (RONS – Reactive Oxygen and Nitrogen Species).

Slobodni radikali sa kiseonikom su: azot-oksidi (NO^{\bullet}), superoksid anjon radikal ($O_2^{\bullet-}$), hidroksilni radikal (OH^{\bullet}), peroksilni radikal (ROO^{\bullet}), alkoksilni radikal (RO^{\bullet}) i hidroperoksilni radikal (HO_2^{\bullet}). Osim njih, u reaktivne kiseonične vrste spadaju i reaktivne komponente bez nesparenih elektrona u spoljašnjoj orbitali, tzv. reaktivni neradikalni agenasi (tabela 1), kao što su: singlet kiseonik (1O_2), peroksinitrit ($ONOO^-$), vodonik-peroksid (H_2O_2), hipohlorasta kiselina ($HOCl$) i ozon – O_3 (Halliwell i sar., 1991; Halliwell i Gutteridge, 1999).

Iako su sposobni za samostalno postojanje (Aruoma, 1994; Close i sar., 2005), slobodni radikali su nestabilni, tj. hemijski visoko reaktivni, zato što nespareni elektron koji se nalazi u njihovoj spoljašnjoj orbitali teži da se stabilizuje sparivanjem sa drugim elektronom. Tako, kada radikali reaguju sa neradika-

lima nastaju novi, tzv. sekundarni slobodni radikali, odnosno dolazi do propagacije i stvaranja čitavog niza radikala koji su takođe veoma toksični, što znači da "radikali rađaju radikale" (Cheeseman i Slater, 1993; Close i sar., 2005). Primarni ćelijski slobodni radikali, superoksid anjon radikal ($O_2^{\bullet-}$) i azot-oksidi (NO^{\bullet}), vrlo su reaktivni i brzo mogu da proizvedu seriju novih slobodnih radikala. Tako, na primer, superoksid-dismutaza (SOD) omogućava brzo razlaganje superoksid anjon radikala i nastanak vodonik-peroksida (H_2O_2), koji je neradikalni agens, ali koji reagujući sa Fe^{2+} (shema 1) prelazi u vrlo moćan hidroksilni radikal (OH^{\bullet}). Osim toga, superoksid anjon radikal i azot-oksidi međusobno brzo reaguju, formirajući peroksinitrit a potom i ostale reaktivne azotne vrste.



Shema 1. Inaktivacija nekih slobodnih radikala /
Diagram 1. Inactivation of certain free radicals

Iako je većina slobodnih radikala nestabilna, ne može se reći da su baš svi nestabilni: tako su superoksid anjon radikal ($O_2^{\bullet-}$) i hidroksi radikal (OH^{\bullet}) sposobni da postoje i nezavisno (Halliwell i Gutteridge, 1999; Halliwell i sar., 1991). Zato se može reći da stepen reaktivnosti SR zavisi od vrste prisutnih radikala i onoga sa čim on može da reaguje. Međutim, ako radikal naiđe na drugi radikal, reakcija ulazi u završnu fazu, tj. oni gube svojstva radikala. To ne znači da više ne predstavljaju opasnost po ćeliju, jer u prisustvu metala sa promenljivom valencom (gvožđe i bakar), kao što je već izneto, stvaraju nove, vrlo moćne radikale ili jone koji utiču na strukturu njenih biomakromolekula i oštećuju ćeliju.

Proizvodnja slobodnih radikala / Production of free radicals

Proizvodnju slobodnih radikala podstiču egzogeni i endogeni oksidansi kojima je organizam konstantno izložen. Egzogeni oksidansi su: ozon, smog, jonizujuće zračenje (Borozan i sar., 2004), višak jona prelaznih metala (Halliwell i Gutteridge, 1999; Božić i sar., 2003; 2003a; Gađanski-Omerović i sar., 2003; Aleksić i sar., 2004; 2004a; Božić i sar., 2004; Stevanović i sar., 2005; Jović i sar.,

2009), metabolizam toksičnih jedinjenja i lekova, ksenobiotici, višak kiseonika, odnosno njegova povećana koncentracija i sl. (Ivanović i sar., 2007; Stajković i sar., 2009). Ovi agensi posebno napadaju disajne puteve i plućno tkivo (Movat, 1985; Jenkins, 1988; Halliwell i Gutteridge, 1999; Stevanović i sar., 2010). Tako, na primer, ozon izaziva plućni oksidativni stres kod konja (Deaton i sar., 2005).

Endogeni izvori RONS su ćelije različitih tkiva (Halliwell i Gutteridge, 1999; Božić i sar., 2003; 2003a; Radovanović i sar., 2004). Pretežno nastaju u njihovim mitohondrijama, mikrozomima, citosolu i endoplazmatskom retikulumu, mada ih proizvode i sve ćelijske membrane (plazma membrana, jedrova membrana, membrana mitohondrija i sl.), peroksizomi, lizozomi i dr. Kada govorimo o procesima tokom kojih nastaju slobodni radikali, to su pre svega mitohondrijalni respiratorni lanac, katalitičke reakcije odgovarajućih enzima (npr. endotelne ksantin-oksidade i NO-sintaza) i povećana fagocitna aktivnost na mestu oštećenja tkiva. Međutim, slobodni radikali nastaju i tokom metabolizma arahidonske kiseline, odnosno sinteze eikosanoida u peroksizomima (delovanjem ciklooksigenaze, lipoksigenaze i citohroma P-450), prilikom oslobađanja hem proteina (uglavnom iz hemoglobina i mioglobina), usled smanjenja zaštitnog kapaciteta ćelija, oksidativnog hidrosilovanja u mikrozomima, razlaganja kateholamina, peroksidacije nezasićenih masnih kiselina, reakcija oksido-redukcije u prisustvu metala sa promenljivom valencom, kao što su gvožđe i bakar (Movat, 1985; Jenkins, 1988; Halliwell i Gutteridge, 1999).

Glavni endogeni izvor slobodnih radikala je respiratorni lanac prenosa elektrona u mitohondrijama (Cai i sar., 2000; Evereklioglu i sar., 2003), odnosno nepotpuna redukcija kiseonika za vreme oksidativne fosforilacije. Tada se 1-3% kiseonika može prevesti u superoksid-anjonradikal ($O_2^{\bullet-}$). Ovaj način proizvodnje ROS je posebno važan tokom fizičke aktivnosti, jer se tada koristi preko 40 puta više kiseonika nego tokom mirovanja (Art i Lekeux, 1993; Stevanović i sar., 2010; Jović i sar., 2010). Drugi po značaju endogeni izvor ROS su enzimi koji fiziološki proizvode oksidanse (npr. ksantin-oksidade endotelnih ćelija, membranske oksidade i NO-sintaze). Treći po značaju endogeni izvor ROS je autooksidacija malih molekula tokom respiratornog praska u aktiviranim fagocitima (ćelijama monocitno-makrofagnog sistema, eozinofilnim i neutrofilnim granulocitima) tokom inflamatornog odgovora (Jackson i O'Farrell, 1993; Božić i sar., 2003; 2003a; 2004).

O intenzitetu proizvodnje slobodnih radikala odlično govori podatak da se od ukupno oko 250 g kiseonika koga zdrav čovek dnevno udahne 2-5% prevede u toksični superoksid anjon radikal, a gotovo 5% ukupne normalne mitohondrijalne potrošnje kiseonika oslobađa singlet kiseonika – 1O_2 (Kehrer, 1993).

Uloge reaktivnih kiseoničnih vrsta / Roles of reactive oxygen types

Kada su otkriveni, slobodni radikali su smatrani vrlo štetnim, ali se poslednjih dvadesetak godina sve više govori i o njihovim korisnim ulogama. Naime, za razliku od visokih koncentracija slobodnih radikala, što vode u razvoj

oksidativnog stresa koji je preduslov mnogobrojnih patoloških efekata, niske i umerene koncentracije ovih materija, koje nastaju sasvim normalno tokom metaboličke aktivnosti ćelije, igraju višestruke značajne uloge u mnogim reakcijama. Neke od njih su: regulacija signalnih puteva unutar ćelije i među ćelijama, uloga hemoatraktanata i aktivatora leukocita, uloga u fagocitozi, zatim učešće u održavanju, promeni položaja i oblika ćelije, pomoć ćeliji tokom adaptacije i oporavka od oštećenja (npr. izazvanih fizičkim radom), uloga u normalnom ćelijskom rastu, programiranoj ćelijskoj smrti (apoptozi) i ćelijskom starenju, u sintezi esencijalnih bioloških jedinjenja i proizvodnji energije, kao i doprinos regulaciji vaskularnog tonusa, odnosno vaskularizacije tkiva.

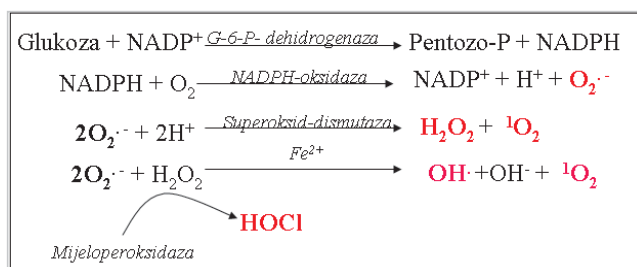
Uloga u regulaciji signalnih puteva unutar ćelije podrazumeva, na primer, oksidaciju rianodinskih receptora, kojom superoksid-anjonradikal podstiče oslobađanje Ca^{2+} iz deopa u sarkoplazmatskom retikulumu skeletno-mišićnih ćelija i na taj način modulira snagu voljnih mišićnih kontrakcija (Stamler i Meissner, 2001). Osim toga, i azot-oksidi (NO), koga proizvode skeletni mišići, ima ulogu endogenog modulatora njihove kontraktilnosti. Naime, interakcijom sa rianodinskim receptorima ili posredstvom cGM, ovaj slobodni radikal takođe modulira oslobađanje Ca^{2+} iz sarkoplazmatskog retikuluma (Eu i sar., 2000), tako da i on menja razdražljivost i kontraktilnost skeletnih mišića (Stamler i Meissner, 2001; Reid i Durham, 2002). Uz to, azot-oksidi učestvuju u međućelijskoj signalizaciji i na druge načine. Funkcioniše kao jedan od neurotransmitera na sinapsama (Stark i Szurszewski, 1992; Taddei i sar., 1998; Isenovic i La Pointe, 2000) i doprinosi regulaciji vaskularnog tonusa (Isenovic i sar., 2001), odnosno vaskularizaciji tkiva, tako što funkcionise kao lokalni vazodilatator*** (Han i Liao, 2005). Učestvuju i u regulaciji angiogeneze (Ziche i Morbidelli, 2000), kontroli peristaltike (Burnett, 1995), regulaciji reproduktivnih funkcija (Thaler i Epel, 2003), zarastanju površinskih rana (Frank i sar., 2002), metabolizmu glukoze (Roberts i sar., 1997), aktivaciji mastocita (Coleman, 2002), funkcionisanju srca (Isenovic i sar., 2001) i sl.

Mnogi efekti slobodnih radikala mogu uslediti oslobađanjem ili aktivacijom sekundarnih inflamatornih medijatora. Dosadašnje studije pokazuju da receptori za vezivanje brojnih peptidnih faktora rasta stimulišu produkciju ROS, kao i da je oksidativni prasak fagocita potreban za određeni aspekt signalizacije (Finkel i Halbrook, 2000; Droge, 2002). U tom smislu je potvrđena uloga oksidanasa kod signalizacije koju obavljaju: insulinski faktori rasta - IGF (Isenovic i sar., 2001), vaskularni endotelni faktor rasta - VEGF (Colavitti i sar., 2002; Finkel, 2003), faktor nekroze tumora - $TNF\alpha$ i interleukin 1β - IL- 1β (Finkel, 2003). Dalji dokaz veze između nastanka ROS i prenosa signala pruža podatak da TRAF₄, koji je sastavni deo TNF, prenosi signal tako što se vezuje direktno za komponentu kompleksa NADPH-oksidaza (Finkel, 2003).

*** Azot-oksidi je ranije bio poznat kao faktor relaksacije vazomotora poreklom iz endotela, tj. EDRF (engl. *Endotel Deriver Relaxing Factor*).

Budući da su reaktivne kiseonične vrste moćni hemoatraktanti i aktivatori leukocita, esencijalne su i za antimikrobnu aktivnost i uklanjanje ćelijskih ostataka (Barnes, 1990; Lansing i sar., 1991; Gilmour, 1993; Duarte i sar., 1994; Božić i sar., 2003; 2003a; 2004; Radivojević i sar., 2004). Razarenje tkiva pomoću slobodnih radikala, posebno sa hidroksilnim radikalom (OH^{\bullet}), stimuliše antimikrobnu aktivnost fagocitnih ćelija za vreme respiratornog praska (Movat, 1985; Kehrer, 1993; Božić i sar., 2003; 2003a; 2004). Za odbranu domaćina je posebno važna sposobnost neutrofilnih granulocita za produkciju ROS i njihovu specifičnu upotrebu u borbi protiv mikroorganizama (Smith, 1997; Close i sar., 2005). Naime, leukociti proizvode slobodne kiseonične radikale tokom fagocitoze. Respiratorni prasak otpočinje odmah po unosu stranog tela u fagocit (npr. neutrofilni granulocit ili monocit) a podstiču ga neki citokini (npr. IL1 i TNF), pod dejstvom NADPH-oksidadze, multienzimskog sistema koji generiše sintezu slobodnih kiseoničnih radikala.

U mitohondrijama fagocita dolazi do konverzije molekulskog kiseonika u slobodne radikale i neke neradikalske agense (shema 2), odnosno u: superoksidni anjon radikal ($\text{O}_2^{\bullet-}$), hidroksilni radikal (OH^{\bullet}), hipohlorastu kiselinu (HOCl), vodonik-peroksid (H_2O_2) i singletni kiseonik ($^1\text{O}_2$). Tako, aktivacijom NADPH-oksidadze nastaje superoksid anjon radikal, a njegovom dismutacijom se dobijaju vodonik-peroksid i singletni kiseonik (shema 2). Istovremeno, lizozomalna mijeloperoksidaza (MPO) omogućava nastanak hipohloraste kiseline – HOCl, i hidroksilnog radikala – OH^{\bullet} (Halliwell i Gutteridge, 1999; Yanaka i sar., 1997; Božić i sar., 2003). Njihova proizvodnja je neophodna, zato što omogućavaju uništavanje materije unete u fagozome. Ovo postižu tako što oksidacijom inaktiviju membranske lipide, najrazličitije intracelularne proteine (npr. enzime i receptore), genetski materijal (DNA i RNA) i sl. Superoksid anjon radikal, hipohlorasta kiselina i hidroksilni radikali mogu reagovati sa nezasićenim masnim kiselinama membranskih lipida, tako što iniciraju njihovu peroksidaciju i tako omo-



Shema 2. Proizvodnja superoksid anjon radikala ($\text{O}_2^{\bullet-}$), vodonik peroksida (H_2O_2), singletnog kiseonika ($^1\text{O}_2$), hidroksilnog radikala (OH^{\bullet}) i hipohloraste kiseline (HOCl) u neutrofilnim granulocitima tokom oksidativnog praska /

Diagram 2. Production of superoxide-anion radicals ($\text{O}_2^{\bullet-}$), hydrogen peroxide (H_2O_2), singlet oxygen ($^1\text{O}_2$), hydroxyl radical (OH^{\bullet}) and hypochloric acid (HOCl) in neutrophil granulocytes during oxidative burst

gućavaju destrukciju i uklanjanje na primer bakterijskih membranskih lipida (Moncado i Higgs, 1993; Close i sar., 2005). Konačno, proizvedeni slobodni radikali, svaki na svoj način, doprinesu liziranju bakterijskih ćelija u roku od 30 do 60 minuta, naravno, uz veliki utrošak kiseonika. Zato se kiseonični radikali i druge toksične vrste, proizvedene od strane NADPH-oksidge i MPO, smatraju direktno odgovornim za uništavanje mikroorganizama. Međutim, moramo da istaknemo da oni nisu dovoljni za uništavanje bakterija, već je za to najvažnije oslobađanje neutrofilnih proteaza (Reeves i sar., 2002; Finkel, 2003).

Osim slobodnih radikala koje dobijaju zahvaljujuću aktivnosti NADPH-oksidge i mijeloperoksidge, makrofagi proizvode i citolitični azot-oksidge koga koriste za uništavanje, ne samo bakterija, nego i malignih i tumorskih ćelija sopstvenog organizma. Iako sam nije jako toksičan, fagocitni azot-oksidge je jako važan jer reaguje sa vodonik-peroksidom ili superoksidnim anjonom i tako omogućava proizvodnju jako toksičnog peroksinitritnog radikala (ONOO^-) i azot(IV)-oksidge radikala (NO_2^*) koji ubijaju bakterije, gljivice, helminte i tumorske ćelije.

Doprinos ROS koji nastaju u fagocitima nije samo u degradacija patogeni i oštećenih ćelija sopstvenih tkiva, nego i u tome što aktivirani fagociti oslobađaju ROS i da bi indukovali migraciju leukocita, jer su moćni hemoatraktanti i aktivatori ovih ćelija (Barnes, 1990; Lansing i sar., 1991; Gilmour, 1993; Duarte i sar., 1994; Stevanović i sar., 2010; Jović i sar., 2010), i kako bi razvili inflamatorni odgovor, kojim otpočinje oslobađanje drugih inflamatornih medijatora, kao što su: eikosanoidi, citokini i proteaze (Movat, 1985; Halliwell i Gutteridge, 1999; Barnes, 1990; Sjodin i sar., 1990; Lansing i sar., 1991; Gilmour, 1993; Duarte i sar., 1994).

Od ostalih fizioloških uloga slobodnih radikala treba istaći učešće u integrinima posredovanom, održavanju, promeni položaja i oblika ćelija. Osim toga, stimulacijom transkripcionih faktora (HSP1, NF κ B i dr.), slobodni radikali kontrolišu gensku ekspresiju i tako podstiču sintezu proteina i normalan rast ćelija.

Neosporno je da slobodni radikali pomažu adaptaciju i oporavak tkiva posle oštećenja na više načina. Naime, podstiču oštećene ćelije da uđu u programiranu ćelijsku smrt – apoptozu (Kim i sar., 2001; Stevanović i sar., 2002; Radovanović i sar., 2004), a takođe indukuju privlačenje leukocita u oštećeno tkivo, aktiviraju ih i, kao što je već opisano, značajno učestvuju u njihovoj fagocitnoj ulozi. Na taj način, slobodni radikali potpomažu uklanjanje oštećenih ćelija iz tkiva i tako ubrzavaju njihov oporavak. Ako tome dodamo i ulogu slobodnih radikala u podsticaju sinteze nekih biološki aktivnih jedinjenja (npr. NO, kao vazodilatatornog i angiogenog transmitera) i stimulaciji normalnog rasta ćelija, jasno je da su oni uključeni u kompletan tok oporavka tkiva, od uklanjanja oštećenih ćelija do njihove zamene novim. Međutim, ovde se mora istaći da, osim u uklanjanju oštećenih ćelija, slobodni radikali učestvuju i u ćelijskom starenju.

Slobodni radikali su uključeni i u proizvodnji energije. Tako, na primer azot-oksidge ima ulogu u metabolizmu glukoze (Roberts i sar., 1997). On je potreban

i za diferencijaciju razvojnih oblika eritrocita, jer inhibira rast, diferencijaciju i hemoglobinizaciju primarnih ćelija eritrocitne loze (Cokic i Schechter, 2008).

Ako imamo u vidu mnoštvo navedenih, potpuno fizioloških i veoma korisnih delovanja najrazličitijih slobodnih radikala, jasno je da su oni neophodni za život i opstanak, ali naravno, samo kada se sintetišu u normalnim količinama, jer čim njihova sinteza prevaziđe kapacitet tzv. antioksidativne odbrane organizma dolazi do oksidativnog stresa. On se manifestuje najrazličitijim oštećenjima biomolekula (proteina, DNK, lipida i ugljenih hidrata) i, shodno tome, vodi u seriju poremećaja funkcija različitih ćelija, tkiva, pa i kompletnog organizma (Borozan i sar., 2002; 2009).

Zaključak / Conclusion

Dokorašnja shvatanja da su slobodni radikali štetni agensi, zato što izazivaju oksidativni stres, koji je preduslov mnogobrojnih patoloških efekata, opovrgavana su poslednjih dvadesetak godina, podacima koji pokazuju da niske i umerene koncentracije ovih materija, koje nastaju tokom normalnih metaboličkih aktivnosti ćelije, imaju višestruki značaj u mnogim reakcijama. Naime, dokazano je da slobodni radikali učestvuju u regulaciji signalnih puteva unutar ćelije i među ćelijama, indukciji hemotakse, aktiviranju leukocita, u fagocitozi, u održavanju, promeni položaja i oblika ćelije, pomažu ćeliji tokom adaptacije i oporavka od oštećenja, doprinose normalnom ćelijskom rastu, učestvuju u programiranoj ćelijskoj smrti (apoptozi) i ćelijskom starenju, u sintezi esencijalnih bioloških jedinjenja i proizvodnji energije, doprinose regulaciji vaskularnog tonusa, odnosno vaskularizacije tkiva i dr.

ZAHVALNICA :

Rezultati rada su deo naučno istraživačkog projekta u oblasti osnovnih istraživanja, evidencioni broj 173034 finansiran od strane Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije.

Literatura / References

1. Radovanović A, Stevanović J, Gledić D. Apoptoza kao način prirodnog odumiranja ćelija jajnika. *Vet glasnik* 2004; 58(1-2): 43-54.
2. Art T, Lekeux P. Training-induced modification in cardiorespiratory and ventilatory measurements in throughbred horses. *Eq Vet J* 1993; 25: 532-6.
3. Aruoma OI. Free radicals and antioxidant strategies in sports, *J Nutr Biochem* 1994; 5: 370-81.
4. Barnes PJ. Reactive oxygen species and airway inflammation, *Free Radical Biology and Medicine* 1990; 9: 235-43.
5. Borozan SZ, Gadjanski-Omerovic GN, Stajkovic SS. Effects of ionizing radiation on antioxidant system in human erythrocytes, *Central European Journal of Occupational and Environmental Health* 2004; 10(1): 12-7.

6. Borozan S, Djurdjić V, Stajković S. Slobodni radikali i antioksidativna odbrana. Zbornik Predavanja XXIII Seminara za inovacije znanja veterinara, Beograd 2002, P121-31.
7. Borozan S, Gopčević K, Jović S, Gojgić-Cvijović G. Oxidative damage of human plasma proteins induced by benzene, 12th EuCheMS International Conference on Chemistry and Environment, Abstracts, Stockholm University, Stockholm, Sweden, 14-17. June, 2009, Tox P36.
8. Božić T, Stevanović J, Kovačević M, Jović S, Lukić S, Petakov M, Borozan S, Mijačević Z, Knežević M, Bulajić S. Toluene mediated oxidative stress and granulomonocitopoiesis, *Acta Veterinaria* 2003; 53(4): 201-10.
9. Božić T, Stevanović J, Kovačević-Filipović M, Borozan S, Popović D, Todorović D. Possible effects of depleted uranium (du): i changes in cellular and biochemical values in peripheral blood of ruminants in exposed areas, *Central European Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 2003a; 9(4): 267-71.
10. Božić T, Stevanović J, Popović D, Vlaški M, Fišter S, Kovačević-Filipović M. Possible health effects of depleted uranium (du): examination of peripheral blood of ruminants in exposed areas, 22nd Meeting of the European Society of Veterinary Pathology. Olsztyn, Poland, 2004: 56.
11. Burnett AL. Nitric oxide control of lower genitourinary tract functions: a review, *Urology* 1995; 45: 1071-83.
12. Gadjanski-Omerović GN, Borozan SZ, Božić TP, Popović DLj. Possible effects of depleted uranium (DU): II. Damage of liver and kidney malfunction in animals of exposed areas, *Central European Journal of Occupational and Environmental Medicine* 2003; 9(4): 273-8.
13. Cai J, Nelson KC, Wu M, Sternberg PJ, Jones DP. Oxidative damage and protection of the RPE, *Prog Retin Eye Res* 2000; 19: 205-21.
14. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry, *Br Med Bull* 1993; 49: 481-93.
15. Close GL, Ashton TA, McArdle A, MacLaren DP. The emerging role of free radicals in delayed onset muscle soreness and contraction-induced muscle injury *Comparative Biochemistry and Physiology* 2005; Part A 142: 257-66.
16. Cokic VP, Schechter AN. Effects of nitric oxide on red blood cell development and phenotype, *Curr Top Dev Biol* 2008; 82: 169-215.
17. Colavitti R, Pani G, Bedogni B, Anzevino R, Borrello S, Waltenberger J, Galeotti T. Reactive oxygen species as downstream mediators of angiogenic signaling by vascular endothelial growth factor receptor-2/KDR. *J Biol Chem* 2002; 277(5): 3101-8.
18. Coleman JW. Nitric oxide: a regulator of mast cell activation and mast cell-mediated inflammation. *Clin Exp Immunol* 2002; 129: 4-10.
19. Deaton CM, Marlin DJ, Smith NC, Roberts CA, Harris PA, Schroter RC, Kelly FJ. Antioxidant and inflammatory responses of healthy horses and horses affected by recurrent airway obstruction to inhaled ozone. *Equine Vet J* 2005; 37: 243-9.
20. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function, *Physiol Rev* 2002; 82: 47-95.
21. Duarte JA, Carvalho F, Bastos ML, Soares JM, Appell HJ. Do invading leucocytes contribute to the decrease in glutathione concentrations indicating oxidative stress in exercised muscle, or are they important for its recovery?, *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 1994; 68(1): 48-53.

22. Eu JP, Sun J, Xu L, Stamler JS, Meissner G. The skeletal muscle calcium release channel: coupled O₂ sensor and NO signaling functions, *Cell* 2000; 102: 499–509.
23. Evereklioglu C, Hamdi E, Doganay S, Cekmen M, Turkoz Y, Otlu B, Ozerol E. Nitric oxide and lipid peroxidation are increased and associated with decreased antioxidant enzyme activities in patients with age-related macular degeneration, *Documenta Ophthalmologica* 2003; 106: 129-36.
24. Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing, *Nature* 2000; 408: 239-47.
25. Finkel T. Oxidant signals and oxidative stress, *Current Opinion in Cell Biology* 2003; 15: 247-54.
26. Frank S, Kampfner H, Wetzler C, Pfeilschifter J. Nitric oxide drives skin repair: Novel functions of an established mediator, *Kidney Int* 2002; 61: 882-8.
27. Gilmour MI, Park P, Selgrade MK. Ozone-enhanced pulmonary infection with *Streptococcus zooepidemicus* in mice, *American Review of Respiratory Diseases* 1993; 147: 753-60.
28. Halliwell B, Kaur H, Ingelman-Sundberg M. Hydroxylation of salicylate as an assay for hydroxyl radicals: a cautionary note, *Free Radic Biol Med* 1991; 10(6): 439-41.
29. Halliwell B, Gutteridge JM. *Free Radicals in Biology and Medicine* 3rd ed., New York: Oxford University Press, Oxford 1999; 140-84.
30. Han TH, Liao JC. Erythrocyte nitric oxide transport reduced by a submembrane cytoskeletal barrier, *Biochim Biophys Acta* 2005; 1723: 135-42.
31. Isenovic E, LaPointe M. Role of Ca⁺⁺ phospholipase A₂ on regulation of inducible nitric oxidesynthase, *Hypertension* 2000; 35: 249-54.
32. Isenovic RE, Muniyappa R, Milivojevic N, Rao Y, Sowers JR. Role of PI3-kinase in isoproterenol and IGF-1 induced eNOS activity, *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 285: 954-8.
33. Ivanović S, Borozan S, Jezdimirović M, Aleksić N, Milovanović M, Tomašević-Čanović M, Đurđević S. The application of adsorbent bentonite in oxidative stress induced by paraquat. *Acta Veterinaria* 2007; 57(4) 329-40.
34. Jackson MJ, O'Farrell S. Free radicals and muscle damage, *Br Med Bull* 1993; 49: 630-41.
35. Aleksić J, Lukić S, Jović S, Kovacević-Filipović M, Vlaški M, Stevanović J, Božić T, Popović D. Investigation of oxidative stress in sheep bred in areas exposed to depleted uranium (du) ammunition, *Oxidative stress and mechanisms of protection*; 2004 May 28-29; Kragujevac: 2004.
36. Aleksić J, Lukić S, Jović S, Kovacević-Filipović M, Vlaški M, Stevanović J, Božić T, Popović D. Investigation of oxidative stress in sheep bred in areas exposed to depleted uranium (DU) ammunition, *Jugoslav. Physiol. Pharmacol. Acta* 2004; 40(1-3): 139-44.
37. Stevanović J, Radovanović A, Merćep D. Apoptoza kao način umiranja ćelije; signali, biohemijske i morfološke karakteristike, 23. Seminar za inovacije znanja veterinarara 2002 Februar 13-14; Beograd.
38. Jenkins RR. Free radical chemistry. Relationship to exercise. *Sports Med* 1988; 5: 156-70.
39. Jović S, Aleksić J, Krsić A, Stevanović J, Kovačević-Filipović M, Borozan S, Božić T, Popović D. A study on oxidative stress and complete blood count of sheeps breed in the area exposed to depleted uranium (du) ammunition, *Acta Veterinaria* 2009; 59 (5-6): 481-8.

40. Jović S, Stevanović J, Borozan S, Jović S, Trailović D, Značaj azot-monoksida tokom fizičkog opterećenja trkačkih konja, I Regionalno savetovanje "Uzgoj, reprodukcija i zdravstvena zaštita konja" 2010 Oct. 1-3;Novi Sad.
41. Kehrer JP. Free radicals as mediators of tissue injury and disease, *Crit Rev Toxicol* 1993; 23(1): 21-48.
42. Kim PK, Zamora R, Petrosko P, Billiar TR. The regulatory role of nitric oxide in apoptosis, *Int Immunopharmacol* 2001; 1: 1421-41.
43. Lansing MW, Mansour E, Ahmed A, Cortes A, Garcia L, Lauredo IT, Wanner A, Abraham WM. Lipid mediators contribute to oxygen-radical-induced airway responses in sheep, *Am Rev Respir Dis* 1991; 144(6): 1291-6.
44. Marlin DJ, Fenn K, Smith N, Deaton CD, Roberts CA, Harris PA, Dunster C, Kelly FJ. Changes in Circulatory Antioxidant Status in Horses during Prolonged Exercise, *J Nutr* 2002; 132: 1622S-7S.
45. Moncada S, Higgs A. Mechanisms of disease – the L-arginine nitric oxide pathway. *N Eng J Med* 1993; 329.
46. Movat HZ. *The inflammatory Reaction*, Amsterdam, Oxford: Elsevier Scientific Publications, 1985.
47. Noguchi N and Niki E. Chemistry of active oxygen species and antioxidant, In: Papas AM (Ed.), *Antioxidant status, Diet, Nutrition and Health*, CRC Press LLC, London, 1999.
48. Reeves EP, Lu H, Jacobs HL, Messina CG, Bolsover S, Gabella G, Potma EO, Warley A, Roes J, Segal AW. Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K⁺ flux, *Nature* 2002; 416: 291-7.
49. Reid MB, Durham WJ. Generation of reactive oxygen and nitrogen species in contracting skeletal muscle: potential impact on aging, *Ann NY Acad Sci* 2002; 959: 108-16.
50. Roberts CK, Barnard RJ, Scheck SH, Balon TW. Exercise-stimulated glucose transport in skeletal muscle is nitric oxide dependent, *Am J Physiol* 1997; 273: E220-E225.
51. Sjodin B, Hellsten Westing YH, Apple FS. Biochemical mechanisms for oxygen free radical formation during exercise, *Sports Med* 1990; 10: 236-54.
52. Smith JA. Exercise immunology and neutrophils, *Int J Sports Med* 1997; 18: 46-55.
53. Stajković SS, SZ Borozan, G Gađanski-Omerović. The effect of toluene on oxidative processes in rats blood, *Journal of the Serbian Chemical Society* 2009; 74, 15-25.
54. Stamler JS, Meissner G. Physiology of nitric oxide in skeletal muscle, *Physiol Rev* 2001; 81(1): 209-37.
55. Stark ME, Szurszewski JH. Role of nitric oxide in gastroin-testinal and hepatic function and disease, *Gastroenterology* 1992; 103: 1928-49.
56. Stevanović J, Borozan S, Jović S, Trailović D, 2010. Oksidativni stres kod trkačkih konja. I Regionalno savetovanje "Uzgoj, reprodukcija i zdravstvena zaštita konja" 2010 Oct. 1-3, Novi Sad.
57. Stevanović J, Kovačević-Filipović M, Vlaški M, Popović D, Borozan S, Jović S, Božić T. A study on oxidative stress and peripheral blood parametars of cows bred in the area exposed to depleted uranium ammunition. *Acta Veterinaria* 2005; 55(4): 269-78.
58. Taddei S, Viridis A, Ghiadoni L, Salvetti A. Endothelial dysfunction in hypertension: Fact or fancy?, *J Cardiovasc Pharmacol* 1998; Suppl 3: 41-8.

59. Thaler CD, Epel D. Nitric Oxide in Oocyte Maturation, Ovulation, Fertilization, Cleavage and Implantation: A little dab'll do ya, *Curr Pharm Des* 2003; 9: 399-409.
60. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human diseases. *Int J Biochem C* 2007; 39: 44-84.
61. Yanaka K, Camarata PJ, Spellman SR, Skubitz AP, Furcht LT, Low WC. Laminin peptide ameliorates brain injury by inhibiting leukocyte accumulation in a rat model of transient focal cerebral ischemia, *J Cereb Blood Flow Metab* 1997; 17(6): 605-11.
62. Ziche M, Morbidelli L. Nitric oxide and angiogenesis, *J Neurooncol* 2000; 50: 139-48.

ENGLISH

PHYSIOLOGY OF FREE RADICALS

Jelka Stevanović, Sunčica Borozan, S Jović, I Ignjatović

Free radicals imply that every atom, molecule, ion, group of atoms, or molecules with one or several non-paired electrons in outer orbital. Among these are: nitrogen-oxide (NO^{\bullet}), superoxide-anion-radical ($\text{O}_2^{\bullet-}$), hydroxyl radical (OH^{\bullet}), peroxy radical (ROO^{\bullet}), alkoxy radical (RO^{\bullet}) and hydroperoxy radical (HO_2^{\bullet}). However, reactive oxygen species also include components without non-paired electrons in outer orbital (so-called reactive non-radical agents), such as: singlet oxygen ($^1\text{O}_2$), peroxy nitrite (ONOO^-), hydrogen-peroxide (H_2O_2), hypochloric acid (eg. HOCl) and ozone (O_3).

High concentrations of free radicals lead to the development of oxidative stress which is a precondition for numerous pathological effects. However, low and moderate concentrations of these matter, which occur quite normally during cell metabolic activity, play multiple significant roles in many reactions. Some of these are: regulation of signal pathways within the cell and between cells, the role of chemoattractors and leukocyte activators, the role in phagocytosis, participation in maintaining, changes in the position and shape of the cell, assisting the cell during adaption and recovery from damage (e.g. caused by physical effort), the role in normal cell growth, programmed cell death (apoptosis) and cell ageing, in the synthesis of essential biological compounds and energy production, as well as the contribution to the regulation of the vascular tone, actually, tissue vascularization.

Key words: free radicals, sources, roles

РУССКИЙ

ФИЗИОЛОГИЯ СВОБОДНЫХ РАДИКАЛОВ

Елка Стеванович, Сунчица Борозан, С. Йович, И. Игњатович

Свободные радикалы подразумевают каждый атом, молекул, ион, группу атомов или молекул с одним или больше неспаренных электронов во внешнем

круге. К ним относятся: азот-оксид (NO^\bullet), супероксид-анион-радикал ($\text{O}_2^{\bullet-}$), гидроксильный радикал (OH^\bullet), пероксильный радикал (ROO^\bullet), алькоксильный радикал (RO^\bullet) и гидропероксильный радикал (HO_2^\bullet). Между тем, в реактивные кислородные виды включаем в число и компоненты без неспаренных электронов во внешней сфере действия (так называемые реактивные нерадикальные агенты), как суть: синглет (одиночный) кислород ($^1\text{O}_2$), пероксинитрит (ONOO^\bullet), водород-пероксид (H_2O_2), гипохлористая кислота (например HOCl) и озон (O_3).

Высокие концентрации свободных радикалов ведут в развитие окислительного стресса, который предварительное условие многочисленных патологических эффектов. Между тем, низкие и умеренные концентрации этих веществ, возникающие совсем нормально в течение метаболической активности клетки, играют многосложные значительные роли в многих реакциях. Некоторые из них суть: регуляция сигнальных путей внутри клетки и между клетками, роль гемоаттрактантов и активаторов лейкоцитов, роль в фагоцитозе, участие в удержании, изменении положения и формы клетки, помощь клетке в течение адаптации и поправки от повреждения (например вызванных физическим трудом), роль в нормальном клеточном росте, программированной клеточной смерти (апоптозе) и клеточном старении, в синтезе эссенциальных биологических соединений и производстве энергии, словно и вклад регуляции сосудистого тонуса, то есть сосудистости ткани.

Ключевые слова: свободные радикалы, источники, роли