NASTAJANJE I IZLUČIVANJE SLOBODNIH RADIKALA KOD ŽIVOTINJA PRI STRESNIM UVJETIMA

Lončar, Višnja

Undergraduate thesis / Završni rad

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of agriculture / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Poljoprivredni fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:151:752238

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek - Repository of the Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek

zir.nsk.hr

Image not found or type unknown

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET

Višnja Lončar
Sveučilišni preddiplomski studij
Smjer: Zootehnika

NASTAJANJE I IZLUČIVANJE SLOBODNIH RADIKALA KOD ŽIVOTINJA PRI STRESNIM UVJETIMA

Završni rad

Osijek, 2015.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET

Višnja Lončar,
Preddiplomski studij smjer Zootehnika

NASTAJANJE I IZLUČIVANJE SLOBODNIH RADIKALA KOD ŽIVOTINJA PRI STRESNIM UVJETIMA

Završni rad

Povjerenstvo za ocjenu i obranu završnog rada:

1. Prof. dr. sc. Marcela Šperanda-predsjednik
2. Izv. prof. dr. sc. Drago Bešlo-mentor
3. Prof. dr. sc. Zvonko Antunović

Osijek, 2015

SADRŽAJ:

1. UVOD 1
2. GENERIRANJE SLOBODNIH RADIKALA 3
4. FAGOCITI I GENERIRANJE SLOBODNIH RADIKALA 13
5. OBRAMBENI MEHANIZAM OD SLOBODNIH RADIKALA 16
6. Ne enzimatski antioksidanti 16
6.1. Tiolni antioksidanti 16
6.2. Vitamin E 17
6.3. Askorbinska kiselina 18
6.4. Polifenoli 21
7. Enzimatski i proteinski antioksidanti 23
7.1. Superoksid dismutaza (SOD) 23
7.2. Katalaza 24
7.3. Glutation peroksidaza 25
7.4. Transferin 26
7.5. Albumin 27
8. MATERIJALI I METODE 28
8.1. Priprema uzoraka 28
8.2. Priprema mobilne faze 28
8.2.1. Priprema standardne otopine 28
8.3. Visokotlačna tekućinska kromatografija (HPLC) 29
9. DETEKCIJA 31
10. REZULTATI 32
11. ZAKLJUČCI: 38
12. POPIS LITERATURE: 39
13. SAŽETAK 44
14. SUMMARY 45
15. POPIS SLIKA 46
16. POPIS TABLICA 47
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA 48

1. UVOD

Poznata je činjenica da je kisik toksičan, bilo za anaerobne, bilo za aerobne organizme, dakle za sve žive oblike na Zemlji. Međutim, životinje, biljke i bakterije trebaju kisik za stvaranje kemijske energije, ATP. Život na Zemlji nije moguć bez kisika, kojega u atmosferi ima oko 21 %. Upravo je ironično to da kisik, element neophodan za život, [Mohammed AA, Ibrahim AA., -2004.] u određenim situacijama ima štetno djelovanje na ljudski i životinjski organizam. [Bagchi K, Puri S.-1998]. Kisik ima potencijalno štetnih učinaka, zbog formiranja i aktivnosti niza kemijskih spojeva, koji su poznati kao reaktivne vrste kisika (ROS). Oni imaju tendenciju da doniraju kisik drugim tvarima. Slobodni radikali i antioksidanti postali su uobičajena tema u suvremenim raspravama o mehanizmima bolesti. [Aruoma OI.-1994]. Tijekom odvijanja različitih metaboličkih procesa normalno je da nastaju i slobodni radikali. Stvaranje slobodnih radikala je dobro regulirano fiziološkim odvijanjem u aerobnoj stanici. U homeostazi, nastajanje slobodnih radikala i njihovo uklanjanje je u ravnoteži, jer tijekom nastajanja slobodnih radikala, u stanici postoji antioksidativni obrambeni sustav koji uklanja reaktivne kisikove radikale (ROS) i reaktivne dušikove radikali (RNS). U slučaju neravoteže dolazi do oksidativnog stresa (Lobo V. I sur.- 2010).

Oksidativni stres označava poremećaj ravnoteže između stvaranja slobodnih radikala i sposobnosti obrambenih sustava u organizmu da te radikale eliminiraju (Beeridge i sur. – 1996).

Oksidansi su slobodni radikali, odnosno atomi, ioni ili molekule koje u vanjskoj elektronskoj ljusci sadrže jedan nespareni elektron. Najčešći su reaktivni kisikovi radikali (ROS) i reaktivni dušikovi radikali (RNS).

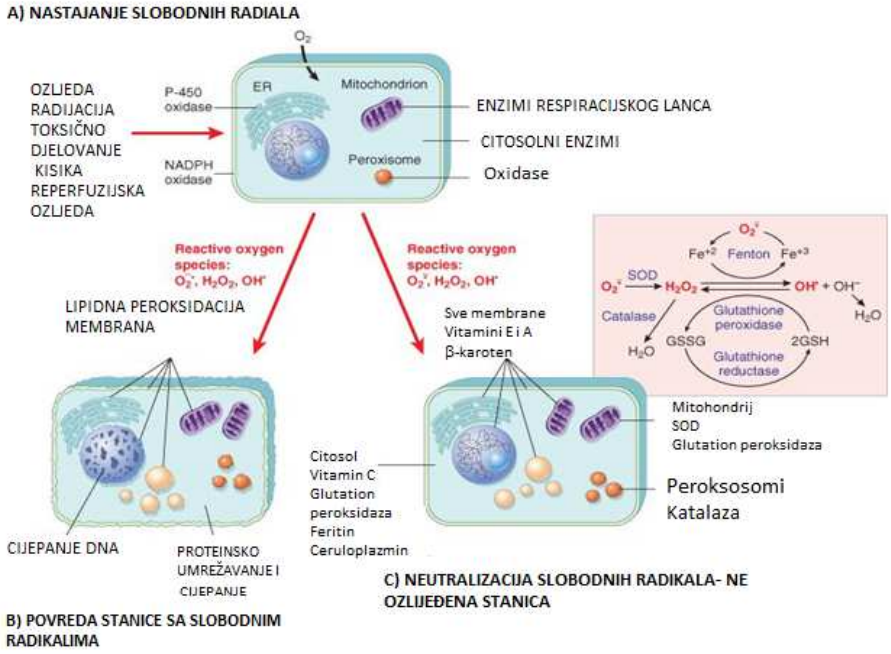
ROS (eng. *Reactive oxygen species*) je superoksidni radikal ($O_2^{\bullet}$), hidroksilni radikal ($^{\bullet}OH$), peroksilni radikal ($R^{\cdot}O_2^{\bullet}$), alkoksilni ($RO^{\bullet}$), hipokloritna kiselina (HclO), ozon (O_3), singletni kisik ($^1\Delta_gO_2$) i vodikov peroksid (H_2O_2). Hidroksilni radikal je najreaktivniji, odnosno odlikuje se niskom specifičnošću prema supstratu i kratkim vremenom poluživota. Slikovito rečeno, najlakše oduzima elektron od okolnih molekula. Važan je inicijator lipidne peroksidacije.

RNS (eng. *Reactive nitrogen species*) su reaktivne vrste koje u svojem sastavu osim kisika sadrže i dušik, primjerice dušikov monoksid (NO) dušikov dioksid (NO_2), peroksinitrit

($ONOO^-$) i dr. Dušikov monoksid (NO) stvaraja različite izoforme enzima NOS (dušikov-oksid sintetaza) (Smith C M i sur. – 2004). U niskim koncentracijama esencijalan je kao neurotransmiter i hormon koji uzrokuje vazodilataciju. U visokim koncentracijama se veže s molekulom kisika ili superoksidnim radikalom i stvara RNS, čiji je učinak na stanice sličan učinku ROS-a.

U živom organizmu slobodni kisikovi radikali se stvaraju na nekoliko načina:

1. djelovanjem ionizirajućeg zračenja na biološke molekule
2. tijekom procesa staničnog disanja, zbog «bijega» pojedinih elektrona u transportnom lancu elektrona i nepotpune redukcije kisika
3. sintezom u stanicama imunološkog sustava, neutrofilima i makrofazima, posredstvom enzima NADPH-oksidaze i mijeloperoksidaze (respiracijski prasak) (Halliwelli sur. 2000).



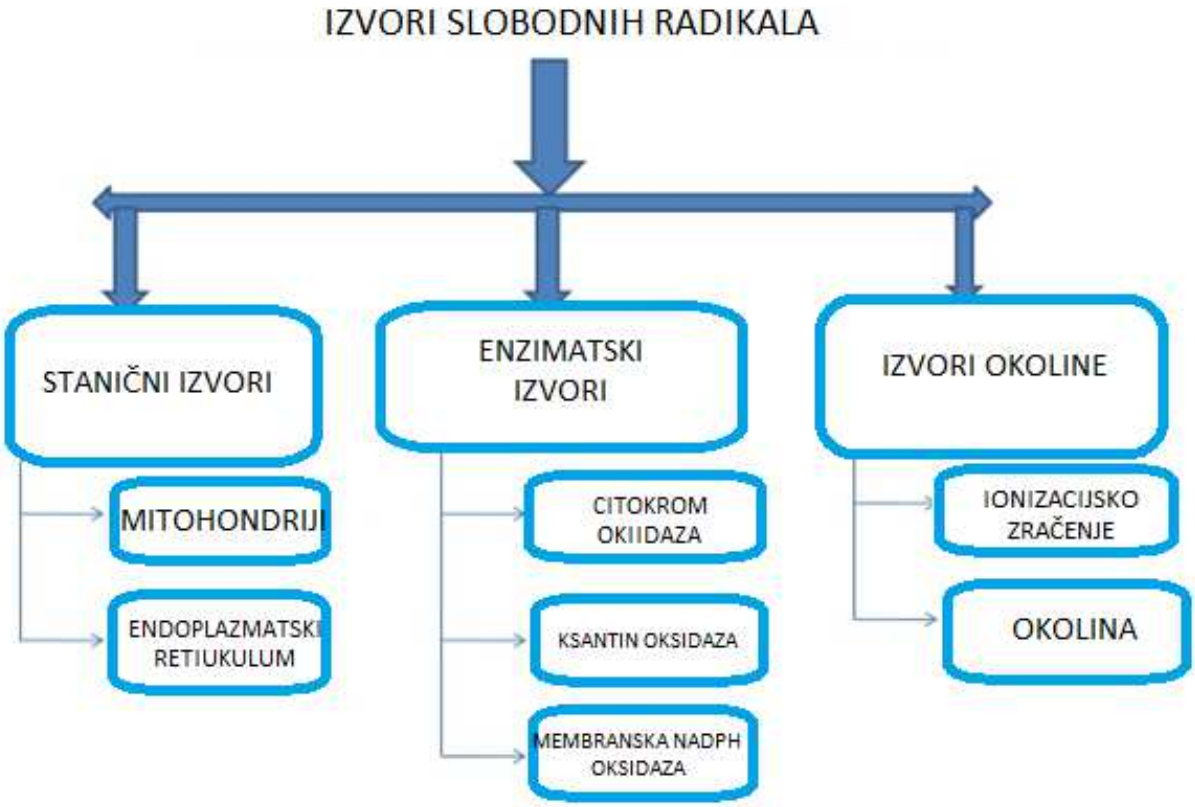
Slika 1. Prikaz nastajanja i eliminacije ROS

Izvor: https://www.studyblue.com/notes/note/n/vpath655-midterm/deck/5832532

Slobodni radikali stvoreni na načine da reagiraju s okolnim molekulama kako bi postigli stabilnost, pri čemu molekula s kojom reagiraju postaje novi slobodni radikal (sl. 1.). Započeta lančana reakcija prekinut će se kada se spoje dva slobodna radikala, koji svaki sa svojim nesparenim elektronom pridonosi u stvaranju čvrste i stabilne kovalentne veze.

2. GENERIRANJE SLOBODNIH RADIKALA

Slobodni radikali mogu nastati od endogenih i egzogenih supstanci. Oni kontinuirano nastaju u stanici i okolini. Izvori slobodnih radikala shematski su prikazani na slici 2.



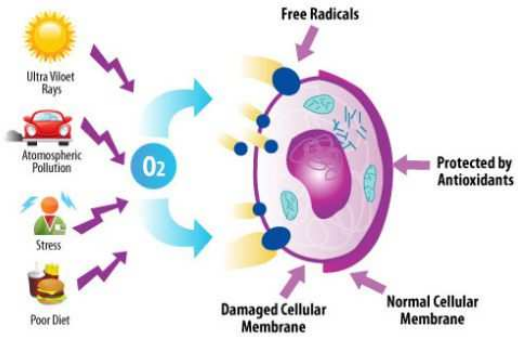
Slika 2. Shematski prikaz izvora slobodnih radikala.

Izvor: http://www.slideshare.net/signup?login_source=slideview.popup.like&from=favorite&layout=foundation&from_source=http%3A%2F%2Fwww.slideshare.net%2Fsameersaharan1%2Fpresentation-on-34578313

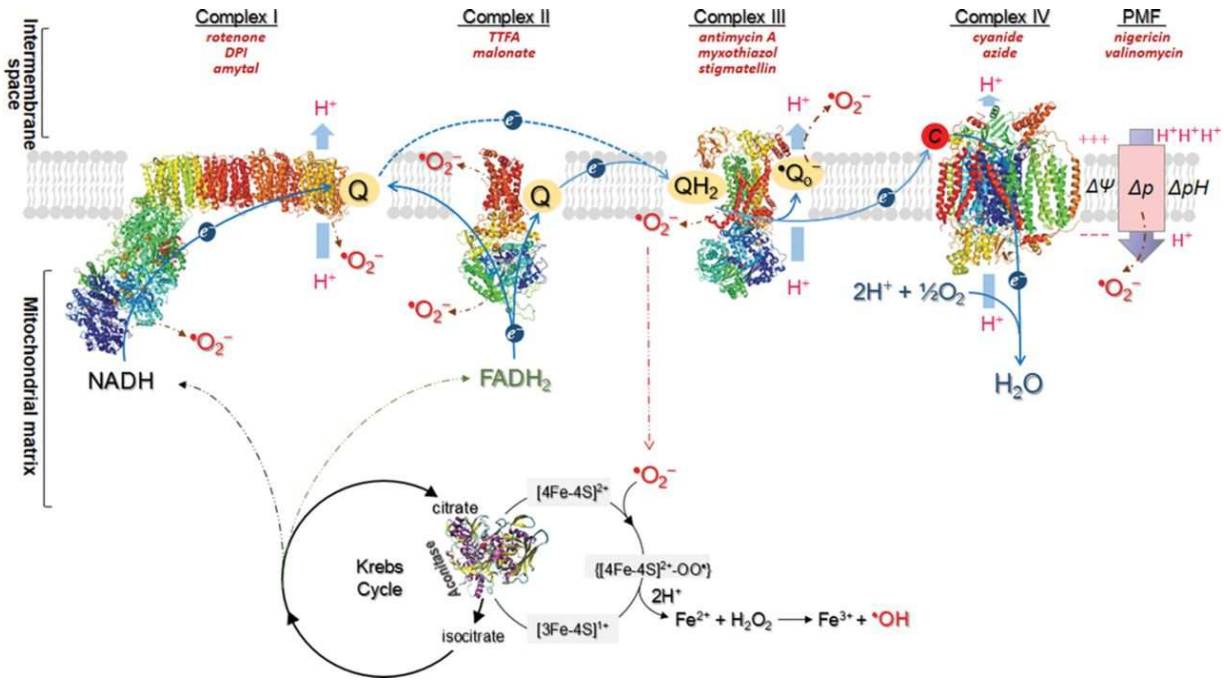
Različiti izvori slobodnih radikala su:

- UV zrake, X-zrake, γ-zrake i mikrovalovi
- Metalni koenzimi
- Kisikovi slobodni radikali nastali od zagađenoga zraka
- Upala, inicijator neutrofili i makrofagi koji produciraju ROS i RNS
- Stimuliranje neutrofila kada su izloženi mikroorganizmima
- U mitohondrijima-elektron transportnim lancem nastaju slobodni radikali
- ROS nastaje od pojedinih izvora sličnih mitohondriju citokrom oksidaze, ksantin oksidaze, neutofila i lipidne peroksidacije
- ROS generira metabolizam arahidonske kiseline, trombociti i stanice glatkih mišića
- Interakcija sa kemikalijama, ispušnim plinovima automobila, plinovi dima cigarete
- Sagorijevanjem organske materije kuhanjem, gorenjem šume, aktivni vulkan
- Industrijski otpad, kemikalije, udisaj alkohola, sadržaj lijekova, azbest, sadržaj pesticida i herbicida, neki metalni ioni, toksične gljive i ksenobiotici (Valko M, i sur.-2006; Cadenas E -1989; Bagchi K, Puri S, -1998)

Najbolji primjer štetnog djelovanja slobodnih radikala je oštećenje strukture stanice, odnosno mitohondrijske membrane, pod utjecajem slobodnih kisikovih radikala nastalih u mitohondrijima tijekom procesa transportnog lanca elektrona (slika 3).



Slika 3. Prikaz mogućnosti nastanka ROS-a.
Izvor: https://flavonjamblog.files.wordpress.com/2013/11/free-radical-animation1.jpg



Slika 4. Generiranje slobodnih radikala putem elektron transportnog lanaca.

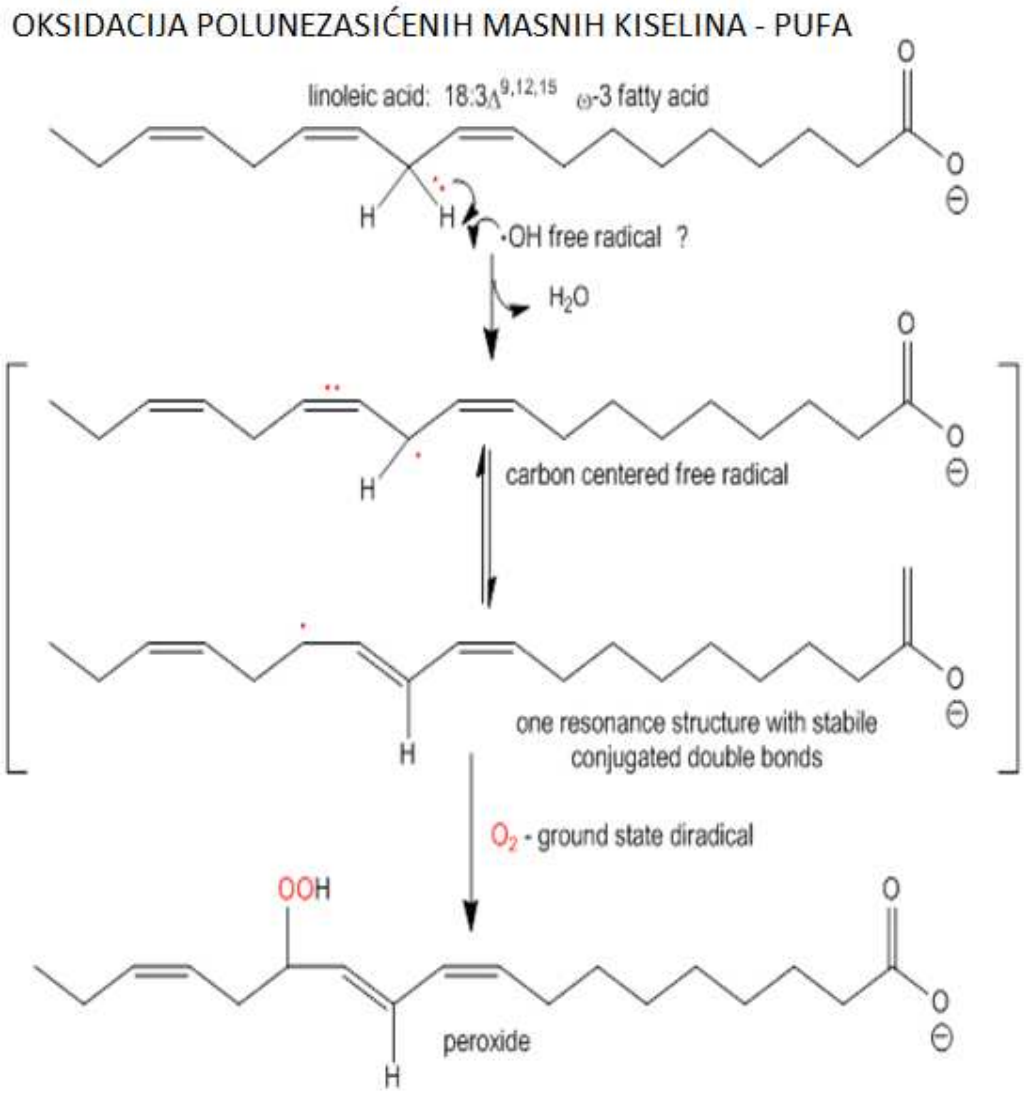
Izvor:
http://circresearch.com/gallery/tag/electron-transport-chain-complex-proteins

Tako nastali slobodni radikali reagiraju s masnim kiselinama koje su sastavni dio membranskih lipida. Nastala lančana reakcija dovodi do oštećenja unutrašnje membrane. Na sličan način dolazi do oštećenja stanične membrane, membrane endoplazmatskog retikuluma i jezgrine membrane (Valko i sur.-2007). Važno je naglasiti da slobodni radikali u stanici imaju najveći afinitet vezanja za polinezasićene masne kiseline u sastavu membranskih fosfolipida, pri čemu nastaju lipidni peroksidi i novi lipidni radikali (slika 5).

Slobodni radikali mogu biti u blagotvornoj ulozi:

- Slobodni radikali mogu obaviti mnoge kritične funkcije u našem tijelu u kontroli protoka krvi kroz naše arterije, u borbi protiv infekcije, da bi naš mozak bio budan i u fokusu.
- Fagocitne stanice uključene su u tjelesnu obrambenu funkciju proizvodeći i mobilizirajući slobodne radikale kisika pri uništavanju bakterija i drugih stanica koje su napadnute od stranih tvari.

- Slično antioksidanti, neki slobodni radikali na niskim razinama signalne su molekule, odnosno odgovorni su za uključivanje i isključivanje gena.
- Neki slobodnih radikala, kao što su dušikov oksid i superoksid se proizvode u vrlo visokom iznosu od imunoloških stanica kako bi uništili viruse i bakterije.
- Neki slobodni radikali ubijaju stanice raka. U stvari, određeni lijekovi protiv raka,imaju cilj povećanja slobodnih radikala u tijelu.



Slika 5. Prikaz oksidacije polunezasićenih masnih kiselina.

Izvor:

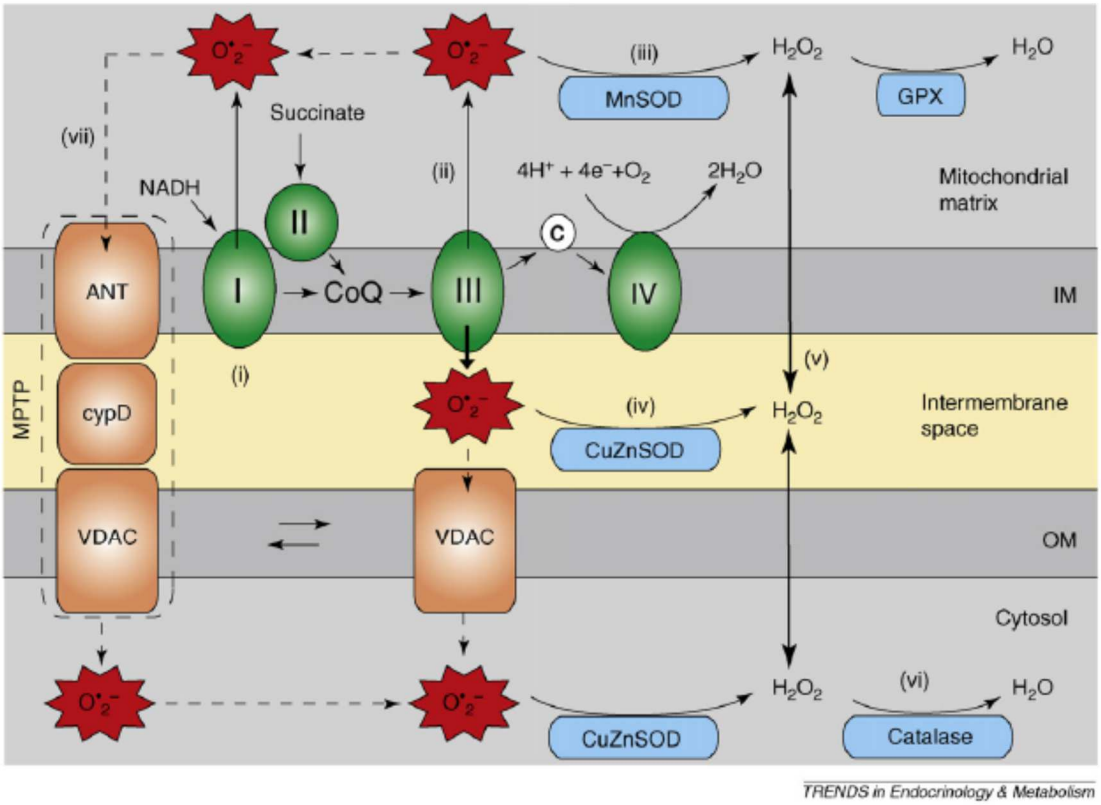
http://biowiki.ucdavis.edu/Biochemistry/Oxidation_and_Phosphorylation/THE_CHEMISTRY_OF_DIOXYGEN

3. MITOHONDRIJ I GENERIRANJE SLOBODNIH RADIKALA

Mitohondriji su glavne stanične organele koje sudjeluju u proizvodnji slobodnih radikala (Cadenas i Davies, - 2000). Mitohondriji konzumiraju oko 90% staničnog kisika i najosjetljiviji su kao organele na oksidativna oštećenja. Mitohondrijska DNA sadrži histone koji su vrlo osjetljivi na reaktivne radikale kisika. Štoviše, mitohondriji sadrže više od 100 različitih enzima, koji sudjeluju u sintezi ATP, koji kontinuirano komuniciraju sa slobodnim radikalima. Smanjenje aktivnosti nekih od ovih enzima u procesu starenja može biti i posljedica dugogodišnje interakcije tih enzima sa radikalima. Procijenjeno je da je broj oksidativno induciranih šteta u mitohondrijskoj DNA deset puta veća od jezgrine DNA. Dokazano je da se mitohondrijska oštećenja DNA akumulirana povećanjem godina života i može imati važnu ulogu u staničnom starenju (Ames BN i sur-1993). Trebalo bi također napomenuti da je popravak DNA mnogo manje učinkovit u mitohondrijima nego u jezgri (Linn S. -1995). Nedostatak ravnoteže između slobodnih radikala proizvedenih u mitohondrijima i antioksidativnih obrambenoh mehanizama u mitohondriju mogu dovesti do „curenja“ tih štetnih reaktanta u citoplazmu ili stanice vezivnog tkiva, stoga narušavaju tkiva i / ili stanice. Na temelju tih činjenica, mitohondriji mogu imati vrlo važnu neposrednu ulogu u dobnoj tkivnoj degradaciji i starenju (Johnson FB-1999). Biokemija oksidativnog stresa dušika i kisika ima temeljnu ulogu u preživljavanju i smrti. Njegova uloga u preživljavanju je povezana s visokim redoks potencijalom, koji su izvrsno oksidirajuće sredstvo, sposobno lako prihvatiti elektrone. Smanjenje potencijala molekularnog kisika zahtijeva četiri elektrona i četiri protona i rezultira oslobođanju kemijske potencijalne energije. Nasuprot tome, uloga kisika u stanicama kako u preživljenu tako i smrti proizlazi iz njegove elektronske strukture. Kisik sa svoja dva vanjska nesparena elektrona, tvoreći dvostruku vezu između dva atoma čini kisik kinetički stabilan, osim u prisutnosti prikladnog katalizatora (npr. Prijelazni metali) koji preuzimaju elektrone tako da se dobiju nestabilni oblici kisika. Redukcijom O_2 s jednim elektronom nastaje stabilni međuprodukt $^{\bullet}O_2^-$ koji je preteča u mnogim reaktivnim radikalima kisika (ROS). Stvaranje reaktivnih radikala kisika (ROS) uključuju superoksida ($^{\bullet}O_2^-$), vodikovog peroksida (H_2O_2) i hidroksilnih radikala ($^{\bullet}OH$) [Turrens, J.F. -2003]. Ironično, mitohondrijski respiratorni lanac, odgovoran je za većinu kisika kao i sintezu većine staničnih ROS-a [Sun, J. I Trumpower, B.L. -2003]. U *in vivo* uvjetima $^{\bullet}O_2^-$ može nastati enzimatskim i neenzimatskim putem. Enzimatski izvor uključuje NADPH oksidazu koja je smještena u polimorfonuklearnim stanicama makrofagima i endotelnim stanicama i citokrom P-450 ovisn o oksigenazi (Coon et al. 1992). Proteolitička pretvorba od ksantin dehidrogenaze, gdje uz ksantin oksidazu nastaje

enzimatski izvor $^{\bullet}O_2^-$ i H_2O_2. H_2O_2 ,hidrolitički se razloži na $^{\bullet}OH$, radikal koji je najreaktivniji u stanici (Yokoyama i sur. 1990). Neenzimatska sinteza $^{\bullet}O_2^-$ nastaje kada jedan elektron izravno prenosi kisik redukcijom koenzima ili prostetične skupine (na primjer, ili flavini ili željezo sumpor klasteri) ili ksenobiotika inhibitora određenim enzima (na primjer, sredstvo protiv raka adriamicin ili herbicid parakvat). Mitohondrijski lanac prijenosa elektrona sadrži nekoliko redoks centara gdje mogu „procuriti" elektroni na kisik, što predstavlja primarni izvor $^{\bullet}O_2^-$ u većini tkiva. Poznato je da višak ROS-a može oksidirati i oštetiti proteine, nukleinske kiseline, polisaharide i lipide. Osim toga, visoka razina unutar staničnog ROS-a može utjecati na redoks stanje razine glutationa i tioredoksin, kao kofaktora za antioksidacijske enzime. Zanimljivo je da osim u sintezi ROS-a , mitohondrijski respiratorni lanac sposoban je za sintezu dušikovog monoksida (NO) [Igamberdiev, A.U. i Hill, R.D. -2008i Castello, P.R. et al. -2006]. O_2 može reagirati sa NO formirati peroksinitrita ($ONOO^{\bullet}$), jaki oksidans. Druge oksidanse dobivene sa NO nazivamo reaktivnim radikalim dušika (RNS). Oni mogu oksidirati proteine i nukleinske kiseline [Radi, R. -2004]. Sveukupno, prekomjerno nakupljanje ROS ili RNS i njihova nekontrolirana oksidacija staničnih komponenata nazivamo oksidativnim stresom. Višak RNS također vrši nitroziranje ili nitriranje staničnih molekula, uključujući proteine i glutation. To se naziva stes reaktivnim radikalima dušika. ROS i RNS su popratna pojava kod starenja i nekih bolesti, uključujući hipertenziju, arterosklerozuc, dijabetičke periferne neuropatije, Alzheimerova bolest i razne demencije [Butterfield, D.A. et al. -2007; Faraci, F.M. -2005; Hamel, E. Et al. -2008; Perry, G. Et al. -2002; Polidori, M.C. et al. -2007; Pop-Busui, R. Et al. -2006].

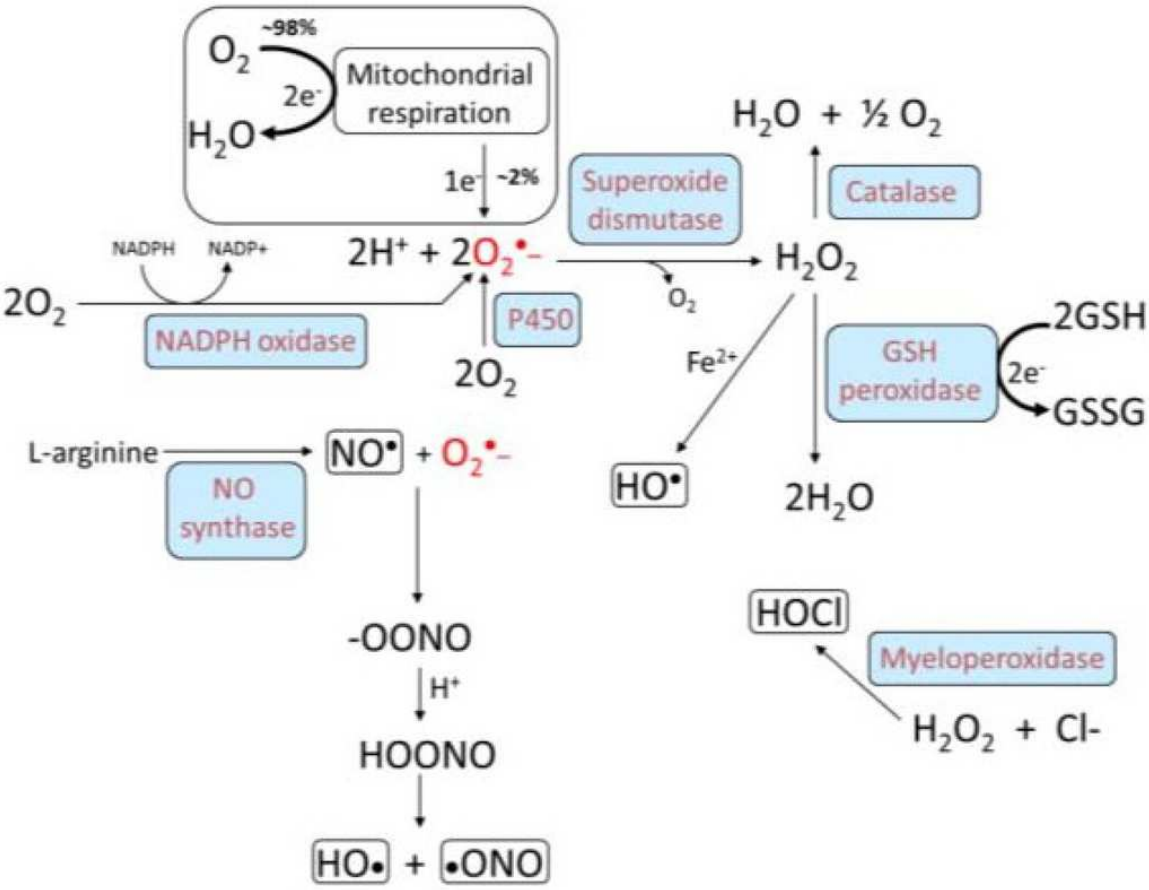
Glavno mjesto nastajanja ROS u stanicama smatra se mitohondrijski respiratorni lanac (slika 4) [Loschen, G. Et al. -1973]. Tijekom disanja, većina konzumiranog kisika prevede se u vodu. Međutim, procjenjuje se da 1-2% kisika potrošenog tijekom disanja nije potpuno preveden u voda, ali se umjesto toga djelomično smanjuje na O_2 [Cadenas, E. I sur. -1977)] koji se može pretvoriti u H_2O_2 [Boveris, A. Et al. -1972] i visoko reaktivni $^{\bullet}OH$, $^{\bullet}O_2^-$ mogu se proizvesti različitim reakcijama koje teku u mitohondrijima [Turrens, J.F. -2003]. Međutim, općenito, vjeruje se da su dva glavna mjesta proizvodnje superoksidnog radikala $^{\bullet}O_2^-$ proizvodnja u mitohondrijskom respiratornom lancu na komplekse I i III (slika 5). Jasno je da će mitohondriji kao generatori nastanka ROS-a utjecati na molekule ne samo unutar mitohondrija, ali i onih u drugim staničnim odjeljcima. Jer ROS reagira sa velikim brojem proteina i provodi prenošenje signala, postalo je veliko zanimanje za ispitivanje same regulacije njihove sinteze.



Slika 6. Sinteza i razgradnja ROS.

Izvor: Robert O. Poyton, Kerri A. Ball and Pablo R. Castello (2009) Mitochondrial generation of free radicals and hypoxic signaling, Trends in Endocrinology and Metabolism 20 (7); 332-340

ROS su manje stabilni nego spojevi koji imaju stabilnu konfiguraciju (oni koji nemaju nesparene elektrone), iako je njihova reaktivnost općenito veća. Molekula s jednim ili više nesparenim elektron u svojoj vanjskoj ljusci nazivaju se slobodni radikali [Bahorun T-2006]. Slobodni radikali su hidroksil (OH $^{\bullet}$), superoksid ($O_2^{\bullet -}$), dušikov oksid (NO $^{\bullet}$), dušikov dioksid ($NO_2^{\bullet}$), peroksil (ROO $^{\bullet}$), hidroksi peroksil ($H_2O^{\bullet}$), alkoksilom (RO $^{\bullet}$), perokisil (ROO $^{\bullet}$), dušikov oksid (NO $^{\bullet}$), dušikov dioksid ($NO_2^{\bullet}$) i lipid peroksid (Loo $^{\bullet}$). Također, vodikov peroksid (H_2O_2), ozon (O_3), singletni kisika, hipokloritna kiseline (HOCl), dušična kiselina (HNO_2), peroksinitrit ($ONOO^-$), didušikov trioksid (N_2O_3) i lipid peroksid (LOOH) nisu slobodni radikali i nazivaju se oksidansima, jer mogu lako stvoriti slobodne radikale u živim organizmima [Genestra M -2007].



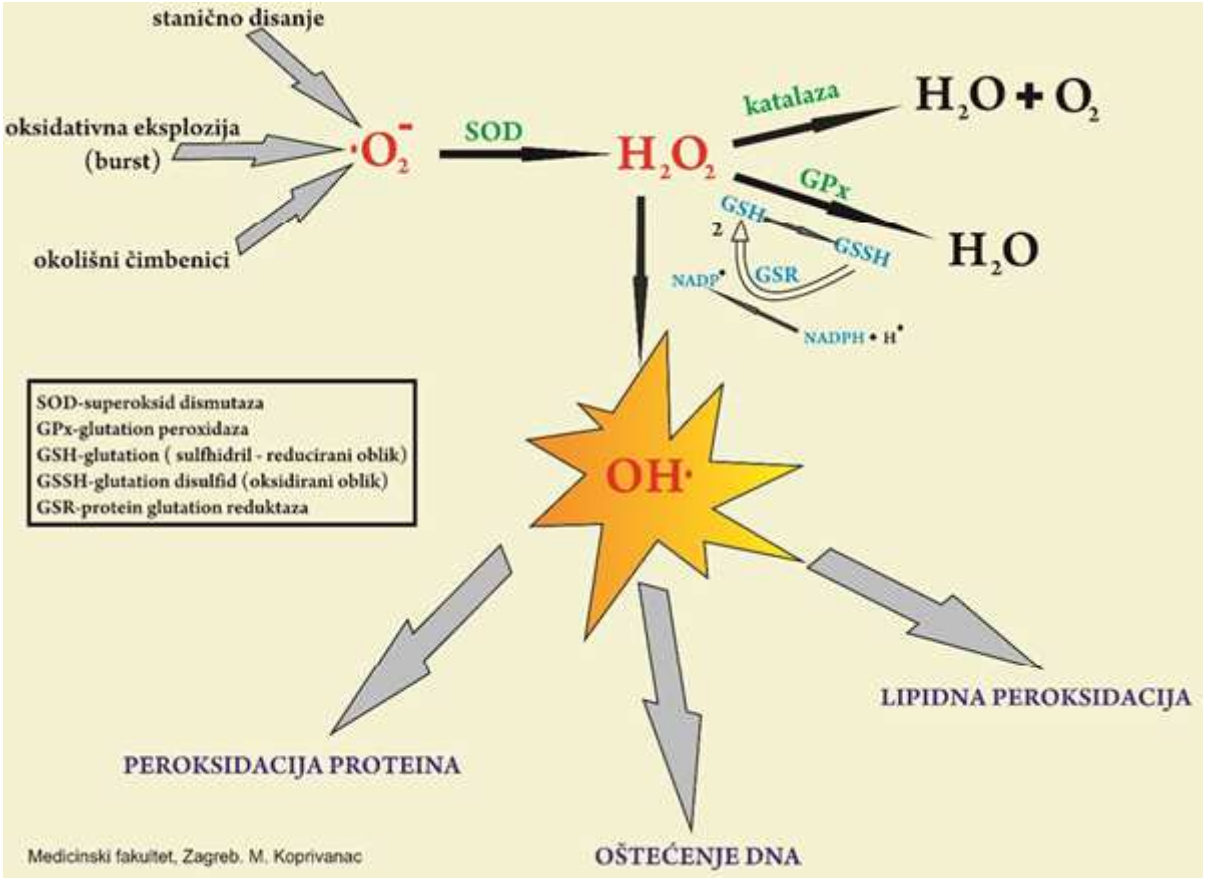
Slika 7. Shematski prikaz nastajanja ROS i RNS.

Izvor: Matthew K. Ross , Anberitha T. Matthews and Lee C. Mangum (2014) Chemical Atherogenesis: Role of Endogenous and Exogenous Poisons in Disease Development, Toxics , 2, 17-34

Slobodni radikali su generirani od endogenih ili egzogenih izvora. Endogeni slobodni radikali mogu se generirani aktivacijom imunološke stanice, upale, mentalnog stresa, pretjeranog vježbanja, ishemije, infekcija, raka i starenja. Egzogeni slobodni radikali dobiju se iz zraka i zagađenjem vode, pušenjem, unosom alkohola, teških metala, određenih lijekova (ciklosporin, takrolimus), industrijskog otapala, kuhanje i zračenja. Nakon penetracije u tijelo, ti spojevi su egzogeni, oni pomažu nastanku slobodnih radikala [Valko M. -2007].

Prevaga oksidansa nasuprot navedenih obrambenih mehanizama dovodi do oksidativnog stresa. U stanicama pojedinih tkiva prisutnost i djelovanje slobodnih radikala uzrokuje strukturne i funkcionalne poremećaje, te u konačnici nekrozu ili malignu alteraciju.

Oksidativni stres se danas spominje u kontekstu mnogih bolesti poput ateroskleroze, Parkinsonove bolesti, infarkta miokarda, Alzheimerove bolesti, te sindroma kroničnog umora.



Slika 8. Prikaz oksidacijsko-redukcijskih procesa

Izvor: M. Koprivanac; Zagreb: Medicinski fakultet

U živim organizmima postoje obrambeni mehanizmi koji održavaju ravnotežu oksido-redukcijskih procesa (slika 8).

To su:

- postojanje određenih staničnih organela (mitohondriji, lizosomi) koje odvajaju veće količine slobodnih radikala od ostalih vitalnih dijelova stanice
- stanični enzimi: superoksid dismutaza, katalaza i glutation peroksidaza
- antioksidansi: vitamin E, C, urična kiselina, polifenoli

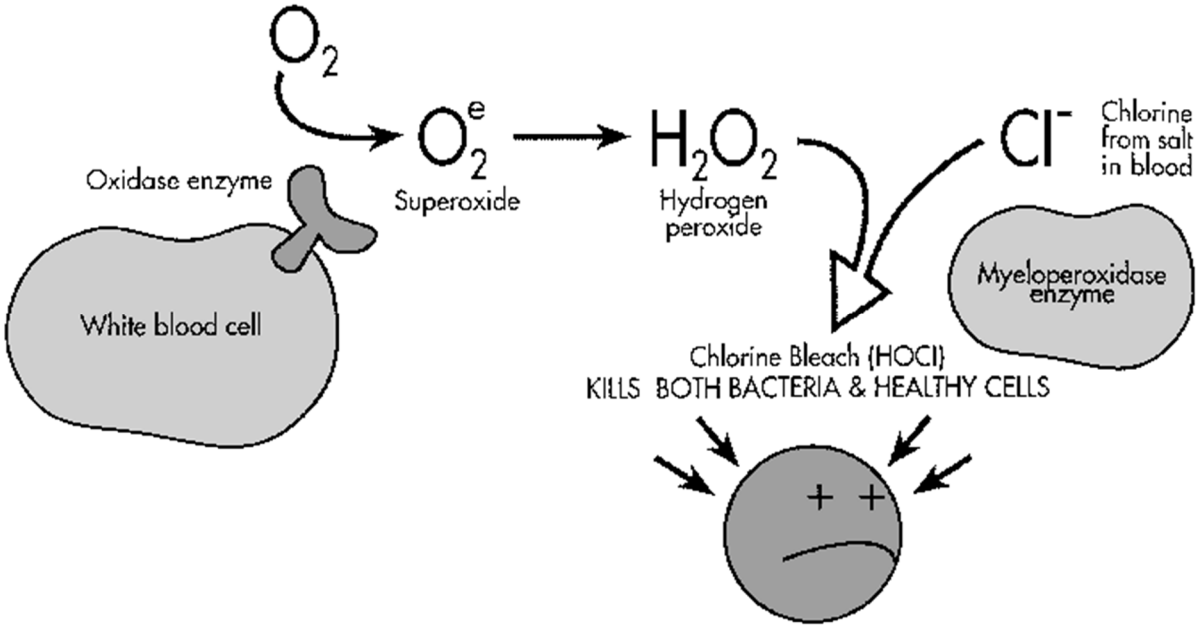
Antioksidansi su kemijski spojevi koji, najjednostavnije rečeno, mogu spriječiti ili usporiti oštećenja stanice. Svaki spoj koji može donirati elektrone i neutralizirati, na taj način slobodne radikale ima antioksidativna svojstva. Antioksidansi djeluju na tri različita načina: mogu sniziti energiju slobodnih radikala, spriječiti njihovo nastajanje ili prekinuti lančanu reakciju oksidacije.

Dakle, antioksidansima se nazivaju molekule sposobne za inhibiciju oksidacije drugih molekula. Oksidacija je kemijska reakcija u kojoj dolazi do prijenosa elektrona ili vodika sa supstance na oksidirani spoj, i tako mogu nastati slobodni radikali. Oni mogu započeti lančanu reakciju, a kada dođe do lančane reakcije u stanici, može biti prouzročena šteta ili može doći do staničnog uništenja.

Mitohondriji su opisani kao „pokretači napretka u stanici“, jer oni povezuju energetsku aktivnost transporta elektrona i „pumpanje“ protona s procesom energetskog očuvanja oksidativne fosforilacije, kako od makromolekule dobiti kemijsku energiju u obliku ATP-a. Takvi energetski postupci nisu bez-opasni, međutim, lanac prijenosa elektrona pokazao se donekle, takve popratne reakcije od transportnog lanca mitohondrijskih elektrona s molekularnim kisikom izravno jest generiranje superoksida anion radikal ($O_2^{\bullet -}$ „propusna“). Koji djelovanjem dismutaze nastaje vodikov peroksid (H_2O_2), koji može dalje reagirati kako bi se dobio hidroksilni radikal ($HO^{\bullet}$). Lanac prijenosa elektrona reakcijama unutarnje mitohondrijske membrane, mitohondrijska vanjska membrana enzima monoamino oksidaze katalizira oksidativnu deaminaciju biogenih amina i kvantitativno je veliki izvor H_2O_2 koji pridonosi povećanju stabilne koncentracije i u mitohondrijskom matriksu i u citosolu. Reaktivni radikali kisika generirani u mitohondrijima, ili iz drugih mjesta unutar ili izvan stanice, mogu dovesti do oštećenja mitohondrijskih membrana i pokrenuti procese razgradnje. Takve toksične reakcije znatno doprinose procesu starenja i čine temeljne istine „slobodni radikali- teorija starenja.“ Trenutne spoznaje i razumijevanje mitohondrijske DNA, RNA i proteina izmjene kod oksidativnog stresa i enzimsko uklanjanje oksidativnog oštećenja molekula vrše enzimi nukleaze i proteaze.

4. FAGOCITI I GENERIRANJE SLOBODNIH RADIKALA

Fagociti, uključujući i neutrofile, igraju ključnu ulogu u stanicama domaćina u obrani protiv patogena, bakterija i imaju ključnu ulogu kod upalnim procesima. Neutrofili infiltriraju upaljeno tkivo, izlučuju velike vezikule i izlučuju velike količine bioaktivnih spojeva. Kao što je već poznato u prvoj minuti stimulacije, neutrofilne stanice otpuštaju velike količine visoko toksičnih reaktivnih radikala kisika (ROS), tijekom tzv. „respiratorni prasak.“ ROS zna se da pripadaju najučinkovitijem mehanizmu ubijanja mikroba. Prema tome, neutrofili predstavljaju obrambene stanice prednje linije u zaštiti organizma protiv infekcije i igraju nezamjenjivu ulogu u pravilnom obavljanju imunološkog sustava. Međutim, prekomjerna proizvodnja ROS-a može dodatno promovirati upalni proces i pridonijeti oštećenju u tijelu vlastite stanice i tkiva. Prikupljeni dokazi ukazuju da abnormalna, neučinkovita, ili odsutna regulacija ROS proizvodnje sudjeluje u patogenezi kroničnih upalnih poremećaja kao što su astma, reumatoidni artritis, alergijski rinitis, kronične opstruktivne plućne bolesti, ili upalne bolest crijeva [Casbon A. J i sur.-2009, Hajkova A i sur.-2009]. Respiratorni prasak neutrofila prvenstveno karakterizira zbog proizvodnje superoksid anion radikala ($O_2^{\bullet}$). ROS proizvodi neutrofile, njihov kontakt prenosi različite podražaje (npr, citokini, čimbenici rasta, fragmenti bakterijskih membrana i drugi). Znači, superoksid anion radikal ($O_2^{\bullet}$) nakon stimulacije NADPH oksidaze kompleksnog enzima. NADPH oksidaza membranski vezani enzim, građe je od citokroma b558, koji se sastoji od gp91phox i p22phox i citozolni komponente p47phox, p67phox i Rac1. U mirovanju neutrofila, kompleks NADPH oksidaza su podjedinice razdvojene, nakon aktivacije, citosolne komponente povezuje se s membranskih dijelova i novonastali enzimski kompleks aktivno katalizira proizvodnja su superoksid anion radikal ($O_2^{\bullet}$).



Slika 9. Shematski prikaz aktivacije NADPH oksidaze u ubijanje bakterijqa.

Izvor: http://nzsm.webcentre.co.nz/article2023.htm

Glavni izvor superoksid radikala je specijalizirana bijela krvna stanica koju nazivamo makrofagi i neutrofili. Enzim, (NADPH oksidaze) nalazi se na površinama tih stanica. Ovaj enzim je aktiviran kada makrofagi i neutrofili nailaze na strano invazivno tijelo kao što je bakterija. Enzim dodaje elektron molekuli kisika oko nje, stvarajući superoksid. Superoksid nije vrlo reaktivan iako je radikal. Obično reagira sa vodom i nastaje vodikov peroksid (H_2O_2). Vodikov peroksid se često naziva reaktivnim radikalom kisika (ROS) i otrovan je za mnoge bakterije. To uništava bakterije, oksidacijom razne metaboličke kontrole molekula i generira daljnju sintezu radikala unutar bakterija reakcijom s bakrom i željezom.

Neutrofili mogu poboljšati destruktivnu moć vodikovog peroksida reakcijom sa soli u organizmu pomoću enzima mijeloperoksidaze. Ovaj enzim je nevjerojatno zelene boje u epruveti, ali većina ljudi je upoznato s njom kao zelenom sluzi u svojoj plućnoj maramici za vrijeme hunjavice. Ovaj enzim pretvara vodikov peroksid do hipoklorita, također poznat kao klor. Klor je moćan i smrtonosna ubojica bakterija. Nažalost, to također ubija bilo što drugo na što nailazi, kao što su zdrave stanice. Ona puštena na stanicu uništava enzime i strukture proteina dodavanjem atome klora. To uzrokuje apoptozu i stanica umire (Genestra M. -2007; Hemuller S. -2008).

Sinteza ROS sa neutrofilama ,unutar stanično redoksnog okruženja koje igraju ključnu ulogu u regulacija i pojačavanje odgovora na upalni proces, a sa druge strane, oksidansi

sintezom NADPH oksidaze mogu biti vrlo toksični, ne samo za infektivnih agensa, ali za susjedna tkiva. Stoga, dobra regulacija enzimskog kompleksa potrebno je kontrolirati njihovu proizvodnju. Unutarstanični redoks može biti, farmakološki modulirani kemijskim antioksidansima koji djeluju donirajući elektron slobodnim radikalima i pretvarajući ga u neradikalne oblike, ili inhibicijom enzima koji su uključene u ROS proizvodnju, uključujući inhibitore NADPH oksidaze. Budući da polifenoli imaju antioksidativne i protuupalne učinke, oni su predmet interesa kao potencijalni spojevi za takvo korištenje [Čiž M.-2010; Denev P.-2010].

5. OBRAMBENI MEHANIZAM OD SLOBODNIH RADIKALA

Kako bi se uklonila opasnost od slobodnih radikala na tkiva i stanice, postoji širok izbor antioksidanata i sustava za popravak. Obrambeni mehanizmi protiv oksidativnog stresa mogu se podijeliti na: antioksidanse i enzime. Enzimi koji sudjeluju u uklanjanju slobodnim radikalima su: glutation peroksidaze, superoksid dismutaza (SOD) i katalaza (slika 6). Ne-enzimski antioksidansi koji sudjeluju u obrani od oksidativnog stresa su: askorbinska kiselina (vitamin C), α-tokoferol (vitamin E), glutation (GSH), karotenoidi i flavinoidi. U normalnim i zdravim stanicama, postoji precizna ravnoteža nastanka slobodnih radikala i njihovog uklanjanja. Međutim, kod stanja oksidativnog stres, gdje se sintetizira prekomjerna koncentracija slobodnih radikala. Kako bi se neravnoteža slobodnih radikala pomjerila u stanje ravnoteže tu u stanici pomaže glutation.

6. Ne enzimatski antioksidanti

6.1. Tiolni antioksidanti

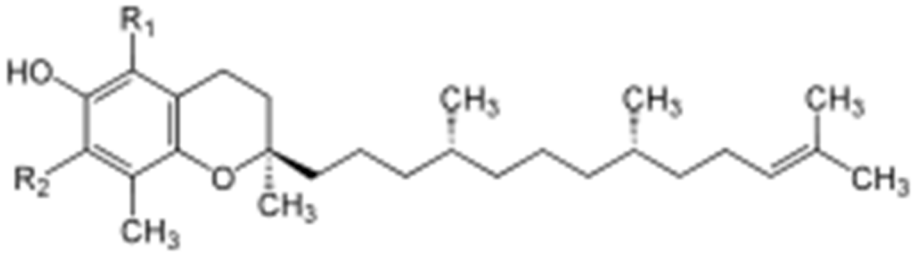
Glutation je važan stanični antioksidans u mitohondrijima i staničnim jezgrama. Glutation se sintetizira od tri aminokiseline: cisteina, glutamina i glicina. Cistein je aminokiselina koja sadrži sumpor i koristi se za sintezu glutationa (ova aminokiselina je vrlo kritična u detoksifikaciji). Kada elektron izgubi GSH on se oksidira. Kada je nivo oksidiranog oblika ove molekule povećava tada se međusobno povezuju disulfidnim mostom u obliku glutation disulfid ili oksidirani glutation (GSSG). Glavne uloge zaštite glutationa od oksidativnog stresa su:

1. glutation je kofaktor za detoksikaciju enzima kao što su glutation peroksidaze (GPX) i glutation transferaza;
2. GSH sudjeluje u aminokiselinskom prometu kroz membranu;
3. GSH uklanja hidroksilne radikale i singletni kisik izravno, detoksikaciju vodikovog peroksida i lipidnu peroksidaciju katalitičkim djelovanjem glutation peroksidaze;
4. glutation može regenerirati oksidirani vitamin C i vitamin E. Štoviše, GSH u jezgri uključuje popravak DNA u mehanizam [Dröge W. -2002)].

Oksidirani glutation (GSSG) se akumulira unutar stanice i omjer GSH / GSSG je dobra mjera oksidativnog stresa u organizmu (Dröge W. -2002). Glavna zaštitna uloga glutationa protiv oksidativnog stresa: da može djelovati kao ko-faktor za nekoliko detoksikacijih enzima, sudjeluje u aminokiselinskom transportu preko plazma membrane, regenerira Vitamini C i E natrag u njihove aktivne oblike (Masella i sur- 2005). Još je tu antioksidans tioredoksin (TRX)

sustav; to su proteini s oksidoreduktaznom aktivnosti i sveprisutni u eukariotskim i prokariotskih stanicama (Holmgren A.- 1985). Ona također sadrži disulfidnu vezu i posjeduje dva redoks-aktivne cisteina (Cys-Gly-Pro-Cys) (Nakamura i sur, 1997). Tioredoksin sadrži dvije susjedne SH skupine u svom reduciranom obliku koji se prevede u disulfidnu jedinicu u oksidiranom TRX prilikom prolaska redoks reakcije s više proteina. Nivo tioredoksina je mnogo manji nego GSH, međutim, TRX i GSH možda se preklapaju, kao i kompatibilne funkcije u aktivaciji i regulaciji transkripcijskih faktora (Valko i sur.-2006). Treći važan antioksidans je prirodni spoj α-liponska kiselina (ALA), koji je disulfidni derivat od oktanske kiseline. Ta mast je topljiva u vodi, a time je široko rasprostranjena u staničnim membranama i citosolu eukariotskih i prokariotskih stanica. A-lipoična kiselina se lako apsorbira iz hrane i brzo prevodi u njegovu smanjenu dihodrolipoidnsku kiselinu (DHLA) (Smith AR i sur-2004). Oboje ALA i DHLA su snažni antioksidansi i njihovi učinci čišćenja slobodnih radikala, metalnih iona i antioksidanata, recikliranje i popravaka oštećenja proteina kao posljedica oksidativnog stresa (Navari-Izzo F. I sur.- 2002). Dihidroliponska kiselina je jači antioksidans nego lipoična kiselina, a mogu djelovati sinergistički s drugim antioksidantima, kao što su glutation, askorbata i tokoferol. Međutim, to također može imati i pro-oksidantivna svojstva i po mogućnosti smanjuje i njegovu sposobnost da generiraju radikale koji mogu oštetiti proteine (Navari-Izzo sur, 2002).

6.2. Vitamin E



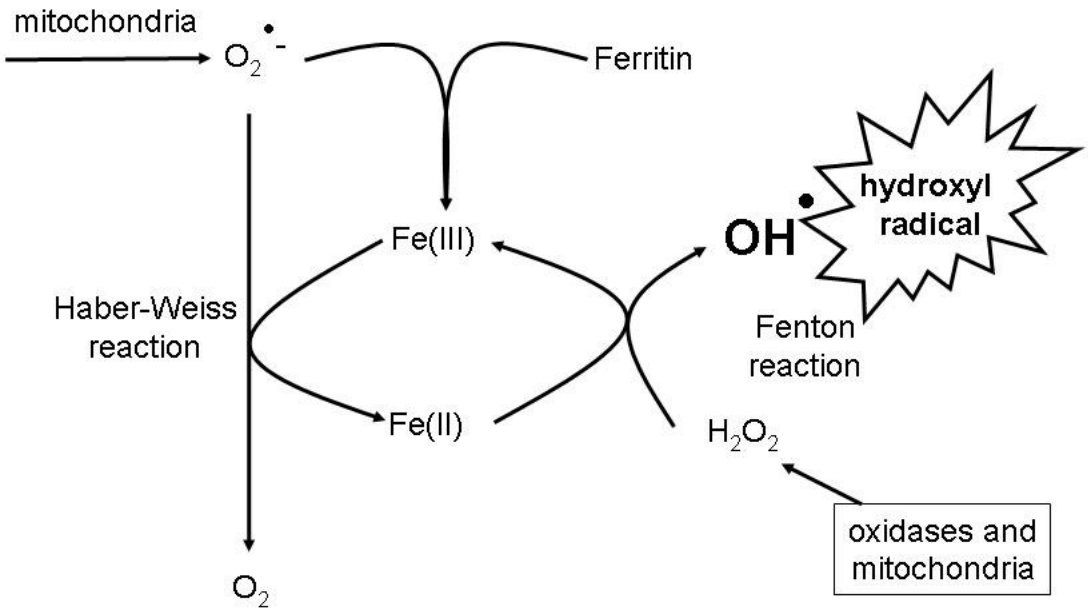
To je topiv vitamin u masti, postoji u osam različitih oblika. U ljudi, α-tokoferol je najaktivniji oblik, te je glavni snažan antioksidans stanične membrane (Hensley K. I sur 2004). Glavna funkcija vitamina E je zaštita od lipidne peroksidacije (Pryor WA- 2000.), također je dokazano da α-tokoferola i askorbinska kiseline funkcioniraju zajedno za vrijeme antioksidativne reakcije, α-tokoferol prevede se u α-tokoferol radikal donirajući labilni

vodik lipidu ili lipidu peroksil radikal, a α-tokoferol radikalu može se stoga smanjiti na početni α-tokoferol oblik uz askorbinsku kiselinu (Kojo S.- 2004)

6.3. Askorbinska kiselina

Askorbinska kiselina ili vitamin C je snažan antioksidans, međutim, ona pokazuje pro oksidativnu aktivnost koja može generirati reaktivne radikale kisika. Vitamin C ima antioksidativno djelovanje, smanjuje oksidanase kao što je vodikov peroksid, međutim, može reducirati metalne ione koje dovodi do stvaranja slobodnih radikala.

Askorbinska kiselina ima nekoliko poznatih interakcija s metalnim ionima. Ove interakcije uključuju redoks reakcije, uključujući reakcije redukcija Fe (III) u Fe (II), preko Fenton reakcije (slika 10).



Slika 10. Prikaz Fenton-ove reakcije.

Izvor: http://www.biomedcentral.com/content/figures/1755-8794-2-2-6-l.jpg

Oksidacijom organskog željezo (II) i vodikovog peroksida nazivamo „Fenton reakcija“, koju da je prvi put opisao HJH Fenton (Prousek J. -2007).

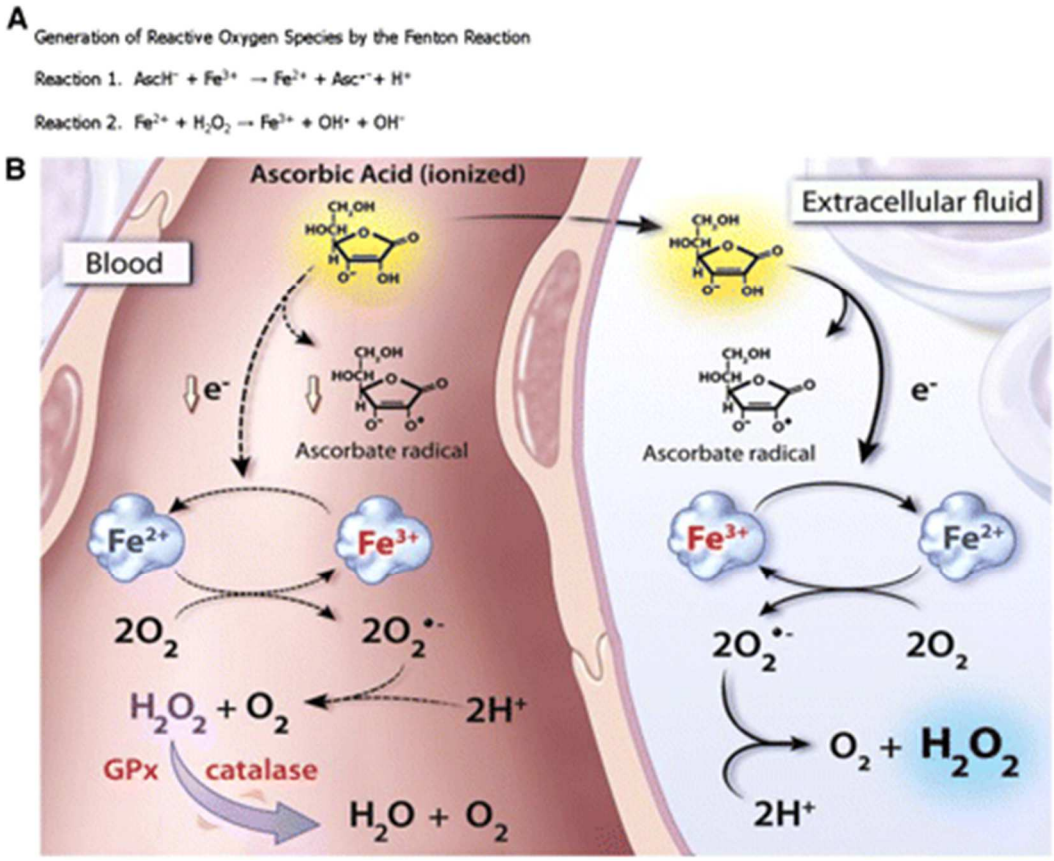
Znamo da se Fentonova reakcija definirana kao mješavina vodikovog peroksida i željezo (II) trenutno prihvaćena kao jedna od najučinkovitijih metoda za oksidaciju organskih onečišćujućih tvari.

Željezo (II) se oksidira vodikovim peroksidom u željezo (III), tvoreći hidroksilni radikal i hidroksidnu ion u procesu (slika 9). Željezo (III) se zatim reducira natrag u željezo (II) sa drugom molekulom vodikovog peroksida, formira peroksid radikal i proton. Neto učinak je disproporcioniranja vodikovog peroksida za stvaranje dviju različitih vrsta kisik radikal, vodom (H^+ i OH^-) kao nusprodukt.

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + HO^{\bullet} + OH^-$$

$$Fe^{3+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{2+} + HOO^{\bullet} + H^+$$

Zbog toksičnosti željeza, slično kao u ostalim prijelazim metalima, može proizlaziti iz Fenton-ove reakcije. Općenito je prihvaćeno da oksidirajući intermedijari uključeni u Fenton reakcije mogu oštetiti biomolekule i igraju važnu ulogu u procesu starenja i raznih bolesti kao što je rak. Fenton reakcijom utvrđeno je da je ključ oksidacije membranskih lipida, oksidacije i amino kiselina u reakcijama gdje su prisutne biološki smanjena sredstva, kao što je askorbinska kiselina. Poznavanje Fenton-ove reakcije u biološkim sustavima važan je i za sudjelovanje u patološkim procesima kao što karcinogeneze, neurodegenerativnih bolesti, ateroskleroze, itd.



Slika 11. Shematski prikaz Fentonove reakcije u krvožilnom sustavu i vanstaničnom sustavu i generiranje slobodnih radikala

Izvor: Fisher A. E. O. Nougton D. P. (2003) Vitamin C contributes to inflammation via radical generating mechanisms: a cautionary note, 61 (5-6) 657-660.

Askorbinska kiselina može reciklirati Fe (III) u Fe (II), koja olakšava daljnje stvaranje reaktivnih radikala kisika kasnijim Fentonovim ciklusa (slika 10).

$$2\ Fe^{2+} + 2\ H_2O_2 \rightarrow 2\ Fe^{3++}\ 2\ OH^{\bullet} + 2\ OH\text{-}$$

$$2\ Fe^{3+} + \text{Askorbat} \rightarrow 2\ Fe^{2+} + \text{Dehidroaskorbat}$$

Pretpostavlja se da u prisutnosti O_2, reakcijom Fe (II) i askorbinske kiseline rezultira u nastajanju reaktivnih radikala kisika. Predloženi mehanizam pokazuje oksidaciju askorbinske kiseline na dehidroaskorbinsku kiselinu, transfer elektrona od Fe (II), i zatim hidroksilacijom aromatskog spoja. Kemijski mehanizmi gore navedeni pokazuju potencijal za interakciju Fe^{2+} i askorbinske kiseline oksidativno oštećenje okolnog tkiva.

6.4. Polifenoli

Flavonoidi, odnosno bioflavoni skupina su sekundarnih metabolita koji su široko rasprostranjeni u biljkama. U skupinu flavonoida ubrajamo antocijanidine, izoflavone, izoflavonole, aurone, flavone, flavonone, flavonole i dihidro-flavone. Oni pripadaju skupini polifenolnih spojeva koji imaju različite terapeutske učinke. Djelovanje flavonoida na molekularnoj razini nije u potpunosti razjašnjeno. Razlozi toga su razlike u kemijskim svojstvima i velika strukturna heterogenosti (slika 12).

Osnovni skelet	Klasa	Primjer
C_6	Jednostavni fenoli	Katehol, hidrohinon, rezorcinol
	Benzohinoni	
C_6-C_1	*Fenolne kiseline*	*p*-Hidroksibenzoeva kiselina, salicilna kiselina
C_6-C_2	Fenilsirćetne kiseline	*p*-Hidroksifenilsirćetna kiselina
C_6-C_3	*Cimetne kiseline*	Kafena kiselina, ferulna kiselina
	Fenilpropeni	Eugenol, mirsticin
	Kumarini	Umbeliferon, eskuletin, skopolin
	Hromoni	Eugenin
C_6-C_4	Naftohinoni	Juglon
C_6-C_1-C_6	Ksantoni	Mangostin, mangiferin
C_6-C_2-C_6	Stilbeni	Rezveratol
	Antrahinoni	Emodin
C_6-C_3-C_6	Flavonoidi	
	Flavoni	Sinensetin, nobiletin, izosinensitin, tangeretin, diosmin
	Flavonoli	Kvercetin, kempferol
	Flavonol glikozidi	Rutin
	Flavanoli	Dihidroksikvercetin i dihidroksikempferol glikoizdi
	Flavanoni	Hesperidin, naringenin
	Flavanon glikozidi	Hesperidin, neohesperidin, narirutin, naringin, eriocitrin
	Antocijanini	Glikozidi pelargonidina, peonidina, delifinidina, petunidina, cijanidina
	Flavanoli (katehini)	(+)-Katehin, (-)-epikatehin, (+)-galokatehin, (-)-epigalokatehin
	Halkoni	Floridžin, arbutin, halkonaringenin
$(C_6$-$C_3)_2$	Lignini	Pinorezinol
$(C_6$-C_3-$C_6)_2$	Biflavonoidi	Agatisflavon

Slika 12. Osnovne strukture formule najvažnijih podgrupa flavonoida

Izvor: Sandoval-Acuna C., Ferreira J., Speisky H. (2014) Polyphenols and mitochondria: An update on their increasingly emerging ROS-scavenging independent actions, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 559 75–90.

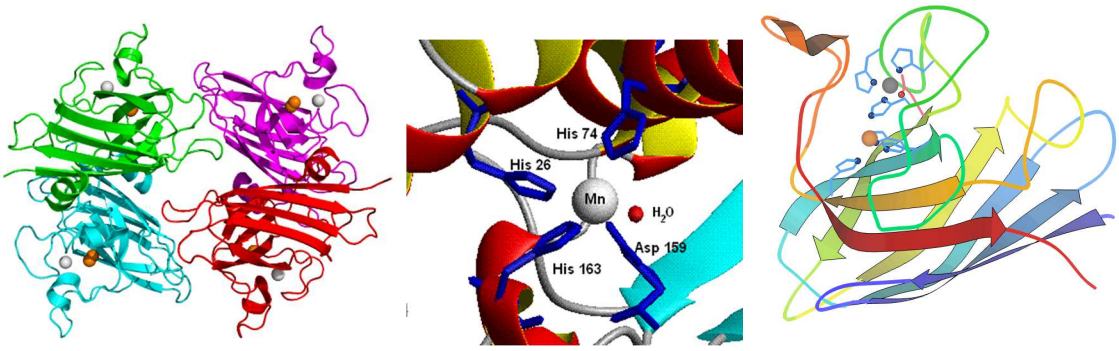
Općenito, polifenoli mogu djelovati kao antioksidanti preko dva glavna načina djelovanja. Prvi, stupaju u reakciju sa ROS. Antioksidativno djelovanje polifenola prvenstveno se pripisuje nazočnosti benzenskog prstena na koji je vezana hidroksilna skupina koja je sposobna za doniranje jednog vodika atoma ili jednog elektrona na ROS [Bors W. I sur.-1990, Amić D. I sur-2007.]. Kao posljedica toga, fenoksil radikal polifenola je generira, a nakon reakcije s drugim radikalom, dobije se stabilna struktura [Bors W.]. Valja napomenuti, međutim, da *in vitro* neki polifenoli (kao što su kvercetin, miricetina, galna kiselina i epigalokatehingalat) također mogu djelovati kao pro-oksidansi, ovisno o njihovoj koncentraciji.

Drugi, stanje u kojem postoji osnovana vjerojatnost da prirodni polifenola mogu stupiti u *in vivo* uvjetima kao antioksidans izravno se vežu za ROS (tj. kvercetin i epigalokatehin-3-galat) koji su dokazani da izravno ulaze u mitohondrije.

7. Enzimatski i proteinski antioksidanti

7.1. Superoksid dismutaza (SOD)

A) B) C)



Slika 13. Prikaz a) EC-SOD, b) Mn-SOD, c) Cu/Zn-SOD

Izvor: https://en.wikipedia.org/wiki/File:Superoxide_dismutase_2_PDB_1VAR.png

Enzimatski antioksidansi imati zanemariv značaj u izvanstaničnim prostorima. Izvanstanični superoksid dismutaza (EC-SOD) (Marklund SL- 1984) prisutan je samo u malim količinama. U unutarstaničnom prostoru, antioksidativni enzimi igraju značajnu ulogu. Cu / Zn-superoksid dismutaza(Cu / Zn SOD), slično EC-SOD, posebno katalizira superoksid radikal na neradikalne molekulame O_2 i H_2O_2.

$$Cu^{2+}\text{-SOD} + O_2^- \rightarrow Cu^{+}\text{-SOD} + O_2$$

$$Cu^{+}\text{-SOD} + O_2^- + 2H^+ \rightarrow Cu^{2+}\text{-SOD} + H_2O_2$$

Ljudski i goveđi Cu / Zn SOD inhibira veće koncentracije H_2O_2 koji oksidativno štete histidinu koji se nalazi u aktivnom mjestu jedinica aktivna (Bertini i sur.- 1998). Tri izoforme SOD su prisutne u ljudima (slika 13). Oni se razlikuju u sadržaju metala u aktivnom mjestu, u broju podjedinica, te aminokiselinskom sastavu od apoenzima, u osjetljivosti na inhibitore, itd. Način djelovanja sa metalnim ionima i uklanjanje superoksida je prikazano reakcijama:

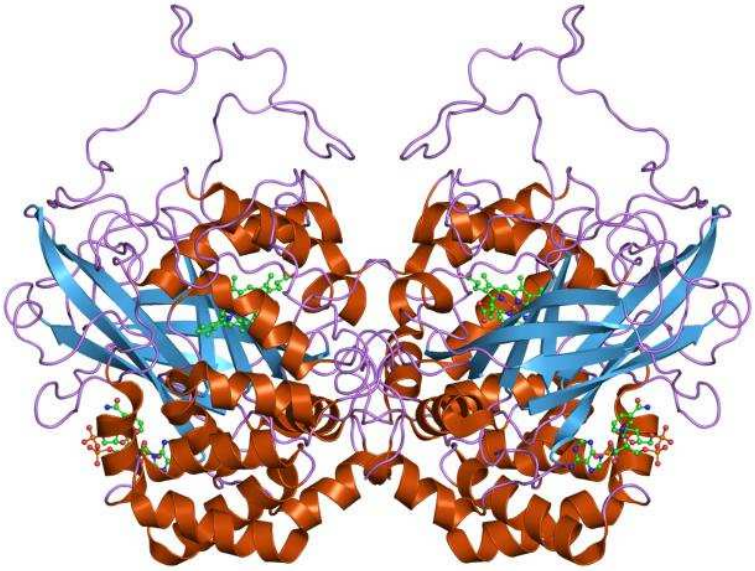
$$M^{(n+1)+}\text{-SOD} + O_2^- \rightarrow M^{n+}\text{-SOD} + O_2$$

$$M^{n+}\text{-SOD} + O_2^- + 2H^+ \rightarrow M^{(n+1)+}\text{-SOD} + H_2O_2.$$

Gdje su: M = Cu (n=1) ; Mn (n=2) ; Fe (n=2) ; Ni (n=2).

Uz izvan stanična EZ-SOD i unutarstanični Cu / Zn SOD, postoji Mn SOD u mitohondrijima. Usprkos činjenici da je SOD jedan od najvažnijih unutarstaničnih antioksidativnih sustava, njegova niska razina aktivnosti ne mora uvijek dovesti do patoloških uvjeta. Antioksidansi djelomično mogu zamijeniti jedan drugoga i nedostatak jednog antioksidansa može izazvati povećanu sintezu drugih antioksidanata.

7.2. Katalaza



Slika 14. Shematski prikaz katalaze.

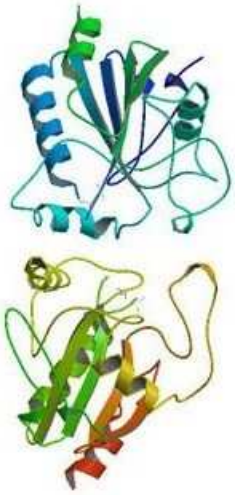
Izvor. https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/8/86/PDB_7cat_EBI.jpg

Većina aerobnih organizama, osim nekih bakterija i algi, sadrže katalaze. U životinja, katalaza se nalazi u svim bitnim organima, posebno u jetri i eritrocitima. Mozak, srce i mišići skeleta sadrže samo male količine katalaze. Katalaza se nalazi u peroksisomima stanica. Mitohondrija, kloroplasta, i endoplazmatski retikulum sadrži zanemarive količine katalaze.

Molekularna masa katalaze je 240,000, a sastoji se od četiri podjedinica, sadrži hem s koordiniranim Fe^{3+} atom u njihovom aktivnom mjestu. Svaka podjedinica veže jednu molekulu NADPH. Katalaza katalizira razgradnju H_2O_2 u vodu i kisika (Murthy MR i sur. -1981).

$$2\ H_2O_2 \longrightarrow 2\ H_2O + O_2.$$

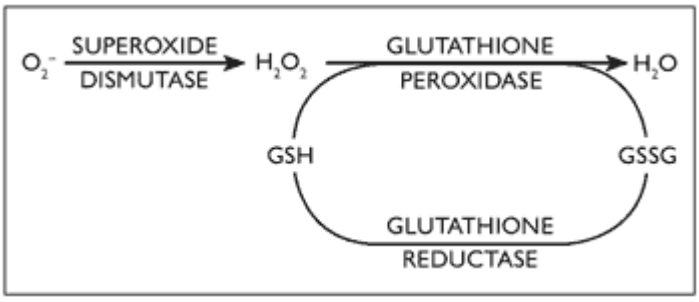
7.3. Glutation peroksidaza



Slika 15. Prikaz glutation peroksidaze.

Izvor: http://www.amazing-glutathione.com/glutathione-peroxidase.html

Enzim glutation peroksidaza (GPx) pojavljuje se u dva oblika selena : ovisan i selen neovisan GPx. Ovi enzimi se razlikuju po broju podjedinica, kao i selenu vezanom u aktivnom centru, a i u katalitičkom mehanizmu. Selen-neovisni GPx (glutation S-transferaza, GST) katalizira detoksifikaciju različitih ksenobiotika. Atom selena ima oksidacijski broj (II), koji je prisutan u molekuli enzima i ne sudjeluje u katalizi (Holovska i sur.-1998). Selen ovisna glutation peroksidaza (GPx) sastoji se od četiri podjedinice, a svaka podjedinica sadrži modificiranu aminokiselinu selenocistein tj. jedan atom selena u aktivnom centru.



Slika 16. Shematski prikaz reakcije glutation peroksidaze i prevođenje H_2O_2 u vodu.

Izvor: www.nature.com

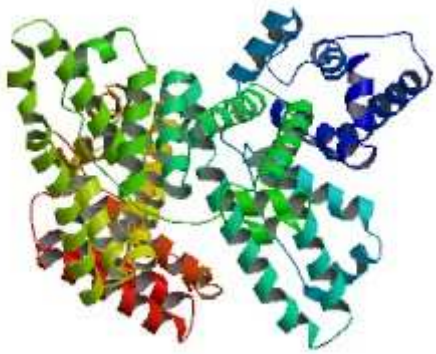
GPx reagira sa H_2O_2 i sa dva elektrona, proizvodnjom selena dobije se H_2O. U drugoj fazi katalitički ciklus, selen je smanjio koncentraciju za dva GSH. Značajno je da selen reagira

brže nego sufhidrilna skupina. Tijekom redoks reakcija, ona prenijeta dva elektrona sprečavaju stvaranje superoksida iz molekule kisika. Za tvorbu superoksida, samo je jedan elektron potreban. Visoka GPx aktivnost je otkrivena u jetri; srednje aktivnost u srcu, plućima i mozgu; i niska aktivnost u mišićima (Durackova- 2007). Glutation peroksidaza surađuje s tripeptid glutationom (GSH) prisutnim u stanicama u relativno visokoj koncentraciji (milimol). Podloga za GPX reakciju je H_2O_2 ili organski peroksid. Glutation peroksidaza razgrađuju peroksidi na voda ili alkohol, a istovremeno se oksidira GSH (slika 15). Većina glutationa prisutna u stanicama govore u reduciranom obliku (GSH) u odnosu na oksidirani oblik (GSSG). Dio ukupnog glutationa u stanicama prisutan je u obliku „mješovitog“ glutationa.

7.4. Transferin

Transferin je protein u krvnoj plazmi koja veže Fe^{3+} atoma. Njegov kapacitet vezanja predstavlja samo 20-30%. Željezovi ioni vezani su snažno za transferin i ne kataliziraju lipidnu peroksidaciju. Apotransferin (transferina bez Fe^{3+} atoma) ima veliku sposobnost da se vežu na atom Fe^{3+} pušten iz feritina ili drugih izvora. Prema tome, transferin djeluje kao antioksidans jer sprečava nastajanje $^{\bullet}OH$ radikala i lipidnu peroksidaciju preko Fenton-tipa reakcije. Važan protein metabolizma željeza je feritin prisutan u plazmi i stanicama kao zaliha proteina. Za razliku transferin, feritin veže Fe^{3+} slabom vezom. Takvo izdanje Fe^{3+} iz feritina zahtijeva prisutnost od odgovarajućim redukcijskim, na primjer, O_2 i smanjene Fe^{3+} atomi mogu napregnuti svoja katalitička svojstva na hidroksilne radikale. Stoga, feritin se ne može smatrati antioksidansom; naprotiv, može biti izvor pro-oksidativnog djeluje Fe^{2+} atoma (Rieth AG i sur. – 1992).

7.5. Albumin



Slika 17. Prikaz albumina.

Izvor:
http://www.bio.davidson.edu/Courses/Molbio/MolStudents/spring2010/Little/humanserumalbumin.htm

Njegova antioksidativna sposobnost temelji se na vezi Cu^{2+} i atoma hema čime sprječava oksidacijsko oštećenje drugih molekula u izvanstaničnom prostoru. Albumin je također nazvan „samo-žrtvovanja“ antioksidans. U slučaju Cu^{2+} ioni vezani za albumin, radikalne reakcije mogu se ubrzati. Cu^{2+} atom može biti oksidiran vodikovim peroksidom u visoko toksični atom Cu^{3+}. Na tim redoks reakcijama, bakar se iz albumina ne oslobađa i protein može biti na mjestu gdje se Cu^{2+} veže na albumin. Međutim, u plazmi, kao što je albumin, visoka koncentracija (600 mmol/l) i sveukupna promjena je takva da su moguće biološke posljedice. Albumin značajno doprinosi antioksidativnoj aktivnosti u izvanstaničnom prostoru. Jedan od važnih funkcija ,serum albumin, je njegova zaštita od oksidativnog oštećenja hipokloritne kiseline (HOCl) proizvedena po mijeloperoksidaze (Halliwell B.-1988), kada je HOCl vezana na albumin tiolne grupe.

8. MATERIJALI I METODE

U ovom radu odredili smo koncentracije flavonoida, fenolnih kiselina i ukupne polifenole u uzorcima meda sa područja Republike Hrvatske visokotlačnom tekućinskom kromatografijom (HPLC).

8.1. Priprema uzoraka

Odvagana su 2g meda te macerirana u porculanskoj zdjelici uz dodatak 18ml vode za HPLC. Homogenizirani uzorci su kvantitativno prenešeni u tikvicu okruglog dna. Tako pripremljeni uzorci su se zagrijavali uz povratno hladilo na vodenom kupatilu 30 min. Nakon toga uzorci su filtrirani. Jedan dio uzorka (oko 1ml) u Ependorfici centrifugiran je 20 min na +4 °C pri 15000 o/min. Nakon centrifugiranja, vršeno je dekantiranje. Od tako pripremljenih supernatanata vršeno je sljedeće razrijeđenje:

R1=100µl supernatant + 9900µl HPLC vode

Ovako pripremljeni uzorci su injicirani (20µl). HPLC analiza za svaki uzorak trajala je oko 50 min.

8.2. Priprema mobilne faze

Za pripremu mobilne faze potrebno je: metanol 99,8%, acetonitril, voda za HPLC, octena glacijalna kiselina (200:100:700:10). Mobilna faza je filtrirana na uređaju za vakum filtraciju, kroz filter papir (naylon 66 membranes; 0,45µm x 47mm). Profiltrirana mobilna faza prenešena je u čistu i suhu reagens bocu i degazirana 15 min.

8.2.1. Priprema standardne otopine

Napravljene su standardne otopine sljedećih standarda koncentracije 1mg/ml

4-hidroksifenil mliječna kiselina

α-ciano-4-hidroksicinaminska kiselina

pinobaksin

luteolin

kaempferol

pinocembrin

krisin

Standardi su otopljene u mobilnoj fazi, a krisin u vodi za HPLC.

8.3. Visokotlačna tekućinska kromatografija (HPLC)

U posljednje vrijeme veliku primjenu ima visokotlačna tekućinska kromatografija (eng. High performance liquid chromatography-HPLC). HPLC je korisna za razdvajanje komponenti koje ne mogu isparavati ili su termički nestabilne, što ujedno i proširuje opseg spojeva koji se mogu detektirati u odnosu na GC (plinsku kromatografiju). Komponente koje se mogu odrediti su aminokiseline, proteini, nukleinske kiseline, masne kiseline, ugljikohidrati, fenoli i dr. HPLC se zasniva na pojavi apsorpcije. HPLC uređaj prikazan je na slici 18.



Slika 18. Instrument visokotlačne tekućinske kromatografije

Mobilna faza ulazi u kolonu pod tlakom od 400 atm. Uzorak se preko komore za injektiranje uzorka rasprskava i zajedno sa mobilnom fazom ulazi u kolonu gdje se na bazi različite apsorpcije vrši razdvajanje smjese spojeva. Detektor se nalazi na izlazu kolone i neke fizikalno-kemijske promjenu pretvara u električni signal.

Tekuću, mobilnu, fazu mogu činiti različita otapala, od onih sa visokim polaritetom, kao što su voda i metanol, do onih koji imaju veoma malu polarnost (heksan).

Kolone kod HPLC su dužine od 10 do 30 cm, dijametra od 4 mm. Stacionarna faza je najčešće silika gel veličine čestica od 3 do 10μm. Silika gel se presvlači organskim spojevima određenih karakteristika u ovisnosti od komponenti koje se razdvajaju.

9. DETEKCIJA

U HPLC koromatografiji se koriste različiti detektori. Svaki od njih se zasniva na mjerenju neke fizikalno-kemijske promjene plina koji se određuje. Promjena se konvertira u električni signal i detektira se. Neki od detektora otkrivaju razlike u provodljivosti temperature plina koji izlazi iz kolone. Zagrijavanjem žica, nalazi se ispred kolone i preko nje prolaze plinovi. Naime, svaki plin koji prolazi kroz kolonu ima različitu toplinsku provodljivost odnosno sposobnost da promjeni temperaturu zagrijavanja žice. Promjena temperature žice je veličina koja se mjeri, pretvara i električni signal određuje.

10. REZULTATI

Kvantitativno određivanje fenolskih kiselina, polifenola i flavonoida u uzorcima meda izvršeno je na osnovu retencionih vremena (t_R) standardnih otopina i sadržaja određenih čistih supstanci u standardnim otopinama.

U Tablici 1. prikazani su rezultati fenolnih kiselina u koncentraciji µg/100 g meda

MED		**36345**	**36132 (MP)**	**36132 (TB)**	**36134**	**36409**	**36135**	**SRED-NJE**	**SD**	**%CV**
SPOJ	RT^									
NP (C1)	3.1	234.53	35.21	26.41	53.70	46.84	18.29	**69.16**	82.04	118.6
NP 2	5.7	22.28	16.40	10.19	12.08	102.21	15.80	**29.83**	35.71	119.7
NP 2a	6.1						27.10	**27.10**		
NP (C2)	6.5	78.07	119.57	70.07	111.25	36.77	95.98	**85.28**	30.34	35.6
NP 3a	7.1	5.57						**5.57**		
MP 3b	7.6	5.95					20.09	**13.02**	10.00	76.8
	7.9						19.99	**19.99**		
NP 3c	8.2	8.77					14.58	**11.68**	4.11	35.2
NP 4	8.9	35.47	31.86	1.28	1.74	77.59	31.54	**29.92**	28.02	93.7

p-kum.	9.3			13.10		13.30	45.99	**24.13**	18.93	78.5
NP 5 (C3)	9.5	234.53	204.10	305.72	343.78	298.89	218.31	**267.55**	56.20	21.0
SUM		625.17	407.15	426.77	522.55	575.61	507.67	510.82	83.94	16.4

U Tablici 2. Prikazani su rezultati koncentracije ukupnih polifenola µg/100g meda

UZORCI MEDA									
	36345	**36132 (MP)**	**36132 (TB)**	**36134**	**36409**	**36135**	**Srednja vrijed-nost**	**Odstupanja**	**%odstu-panja**
Flavonoidi	990.37	587.58	568.98	594.08	808.56	936.25	747.6	189.4	25.3
Fenolna kiselina	625.17	407.15	426.77	522.55	575.61	507.67	510.8	83.9	16.4
UKUPNI POLIFENOLI	**1615.5**	**994.7**	**995.8**	**1116.6**	**1384.2**	**1443.9**	**1258.5**	**259.4**	**20.6**

U Tablici 3. Prikazani su rezultati koncentracije flavonoida µg/100g meda

Flavonoidi u medu (µg/100 g)											
Compound	**RT min**	**P8728**	**P8684**	**P8774**	**P0120**	**#P8676**	**#P8676a**	**P8932**	**Sred. Vrijd.**	**SD**	**%CV**
Unknown 18	14.91	183.06	183.48	211.71	49.87	252.28	246.85	267.12	199.20	73.78	37.0
Unknown 19	18.71	43.35		7.98	54.76	19.3			31.35	21.47	68.5
Unknown 20	19.44	8.1	28.86	15.93		21.59	15.59	10.51	16.76	7.56	45.1
Unknown 21	20.64	28.51	12.62	21.32	29.79	30.12	11.33	17.96	21.66	8.03	37.1
Unknown 22	21.27	14.88	3.17	17.74		14.62	12.43	2.4	10.87	6.49	59.7
Unknown 23	22.61	6.43	8.98	12.87	10.01	8.83	68.08	29.88	20.73	22.31	107.6
pinobanksin	23.46	8.57		10.07	3.52	5.03			6.80	3.04	44.7
Unknown 25	24.44	5.97		4.52	2.85	1.64			3.75	1.90	50.6
Unknown 26			2.21	3.41	1.47	2.86			2.49	0.84	33.7
Unknown 27	26.71	6.33	4.09	8.93	5.54	3.22			5.62		0.0
luteolin	27.76	12.92	15.89	16.92	6.33	15.53	3.15	3.22	10.57	6.13	58.1

Unknown 27a	27.90						23.06	16.76	19.91	4.45	22.4
Unknown 28	30.44	42.83	5.98	34.72	4.28	30.22	4.86	2.44	17.90	17.29	96.5
kaempferol	31.41	4.75	11.14	9.82	10.23	11.47	8.74	4.2	8.62	2.97	34.5
Unknown 29	33.02	16.8	3.34	17.84	4.34	17.24	7.56		11.19		
Unknown 30	34.84	11.09	4.47	12.05	9.24	15.59	3.82		9.38	4.55	48.6
Unknown 30b	36.69						2.74	6.64	4.69	2.76	58.8
pinocembrin	37.74	7.58	1.04	4.78	4.12	7.45	6.79	6.06	5.40		
Unknown 31	38.91	2.58			2.45	0.93		1.98	1.99	0.75	37.7
Unknown 36	47.14	15.69	9.77	8.06	15.93	9.68	19.75	19.76	14.09	4.91	34.8

Iz rezultata :

U tablici 1. vidljiv je veliki raspon koncentracija fenolnih kiselina u medu. Vjerojatno je uzrok porijeklo meda iz različitih područja Hrvatske. I to u rasponu od 5,57 do 218,31 µg/100 g meda.

U tablici 2. koncentracija ukupnih polifenola se kretala od 994,7 do 1443,9 µg/100 g meda.

U tablici 3. koncentracija flavonoida u medu se kretala od 1,04 do 267,12 µg/100 g meda.

Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da se velike razlike u polifenolima, flavonoidima i ukupnim fenolima kreću u velikim rasponima što je posljedica različitih geografskih područja u R Hrvatskoj.

11. ZAKLJUČCI:

- U ovom radu prikazani su dosadašnji rezultati u generiranju slobodnih radikala i kao što je poznato slobodni radikali su uzročnici raznih bolesti;
- Dosadašnji rezultati ukazuju da u samim organizmima postoje mehanizmi obrane od slobodnih radikala, međutim u slučaju kada se organizam ne može uz pomoć antioksidativnih molekula obraniti tj. da ih se više stvara nego što ih se može ukloniti tj. kada se organizam nalazi pod oksidativnim stresom.
- U prirodi postoje molekule koje reagiraju sa slobodnim radikalima koje su jako rekativne molekule kako bi eliminirali njihovu veliku rekativnost sa makromolekulama u stanici (proteini, ugljikohidrati, lipidi i nukleinske kiseline, pa tako između ostalih su i polifenoli,
- Polifenoli su sekundarni metaboliti biljaka koji se sintetiziraju pod određenim fiziološkim uvjetima;
- Između ostalog nalaze se i u medu u različitim koncentracijama, što ovisi o geografskom porijeklu meda;
- Med je dobar izvor antioksidativnih molekual (polifenola)

12. POPIS LITERATURE:

1. Mohammed AA, Ibrahim AA. (2004) Pathological roles of reactive oxygen species and their defence mechanism. Saudi Pharm J.;12:1–18.
2. Bagchi K, Puri S. (1998) Free radicals and antioxidants in health and disease. East Mediterranean Health Jr. 1998;4:350–60.
3. Aruoma OI (1994) Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. Food Chem Toxicol;32:671–83
4. Lobo V., Patil A., Phatak A, and Chandra N.(2010) Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health, Pharmacogn Rev.; 4(8): 118–126.
5. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free Radicals in Biology and Medicine. Third edition. Oxford Science Publications, New York, Oxford University Press, 2000.
6. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin M, Mazur M et al. (2007): Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Int J Biochem Cell Biol; 39 (1): 44-84.
7. Casbon A. J., Allen L. A., Dunn K. W., and Dinauer M. C. (2009) "Macrophage NADPH oxidase flavocytochrome b localizes to the plasma membrane and Rab11-positive recycling endosomes," *Journal of Immunology*, 182 (4) 2325–2339.
8. Hajkova, A. Svobodova, D. Krejcova et al (2009)., "Soluble glucomannan isolated from Candida utilis primes blood phagocytes,"*Carbohydrate Research*, 344 (15), 2036–2041.
9. M. Genestra M. (2007), "Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants," *Cellular Signalling*,19, (9)1807–1819.
10. Hemuller S., Wind S., Barbosa-Sicard E. Et al. (2008), "Apocynin is not an inhibitor of vascular NADPH oxidases but an antioxidant," *Hypertension*, 51 (9), 211–217.
11. Čıž M., Čıžova H., Denev P., Kratchanova M., Slavov A., and Lojek A. (2010), "Different methods for control and comparison of the antioxidant properties of vegetables," *Food Control*, 21 (4) 518–523.
12. Denev P., M. Čiž M., Ambrozova G., Lojek A., Yanakieva I., and Kratchanova M. (2010), "Solid-phase extraction of berries' anthocyanins and evaluation of their antioxidative properties," *Food Chemistry*, 123 (4), 1055–1061.
13. Dröge W. (2002) Aging-related changes in the thiol/disulfide redox state: implications for the use of thiol antioxidants. *Exper Geront*,37:1333–45.

14. Masella R, Di Benedetto R, Vari R, et al. 2005. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J Nutr Biochem*, 16:577–86.
15. Holmgren A. 1985. Thioredoxin. *Ann Rev Biochem*, 54:237–71.
16. Nakamura H, Nakamura K, Yodoi J. (1997) Redox regulation of cellular activation. *Ann Rev Immunol*, 15:351–69.
17. Valko M, Rhodes CJ, Moncola J, Izakovic M, Mazur M. (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer, Chemico-Biological Interactions, 160, 1–40.
18. Smith AR, Shenvi SV, Widlansky M, et al. 2004. Lipoic acid as a potential therapy for chronic diseases associated with oxidative stress. *Curr Med Chem*, 11:1135–46.
19. Navari-Izzo F, Quartacci MF, Sgherri C. (2002) Lipoic acid: a unique antioxidant in the detoxification of activated oxygen species. *Plant Physiol Biochem*, 40:463–70.
20. Hensley K, Benakass EJ, Bolli R, et al. (2004) New perspectives on vitamin E: α-tocopherol and carboxyethylhydroxychroman metabolites in biology and medicine. *Free Rad Biol Med*, 36:1–15.
21. Pryor WA. (2000) Vitamin E and heart disease: basic science to clinical intervention trials. *Free Rad Biol Med*, 28:141–64.
22. Kojo S. (2004) Vitamin C: basic metabolism and its function as an index of oxidative stress. *Curr Med Chem*, 11:1041–64.
23. Prousek J. (2007) Fenton chemistry in biology and medicine, *Pure Appl. Chem*., 79,(12), 2325–2338.
24. Fisher A. E. O. Nougton D. P. (2003) Vitamin C contributes to inflammation via radical generating mechanisms: a cautionary note, 61 (5-6) 657-660.
25. Sandoval-Acuna C., Ferreira J., Speisky H. (2014) Polyphenols and mitochondria: An update on their increasingly emerging ROS-scavenging independent actions, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 559 75–90.
26. Bors W., Heller W, Michel C., Saran M. (1990) Flavonoids as antioxidants: Determination of radical-scavenging efficiencies, *Methods in Enzimology*, 186,343–355.
27. Amić D. , Davidovicć-Amić D , Bešlo D, Rastija V., Lucić B. , N. Trinajstić N. (2007) SAR and QSAR of the Antioxidant Activity of Flavonoids, *Curr. Med. Chem.* 14 (7) 827–845.

28. Marklund SL (1984) Extracellular superoxide dismutase in human tissues and human cell lines. *J Clin Invest* 74:1398–1403.
29. Bertini I, Manganl S, Viezzoli MS (1998) Structure and properties of copper-zinc superoxide dismutases. *Adv Inorg Chem* 45:127–250.
30. Murthy MR, Reid TJ, Sicignano A, Tanaka N, Rossmann MG (1981). „Structure of beef liver catalase". *J. Mol. Biol.* 152 (2): 465–499.
31. Holovska´ K, Lena´rtova´ V, Rosival I, Kicˇinkova´ M, Mejercˇiakova´ A, Lega´th J (1998) Antioxidant and detoxifying enzymes in the liver and kidney of pheasants after intoxication by herbicides MCPA and ANITEN I. *J Biochem Mol Toxicol* 12:235–244.
32. Dvorakova M, Ježova D, Blažıček P, Trebaticka J,S Škodaček I, Šuba J, Waczulıkova I, Rohdewald P, Duračkova´ Z (2007) Urinary catecholamines in children with attention deficit hyperactivity disorder (ADHD): modulation by a polyphenolic extract from pine bark (pycnogenol®). *Nutr Neurosci* 10:151–157.
33. Rieth AG, Baader SL, Lode HN, Bruchelt G, Niethammer D (1992) Ferritin enhances production of DNA strand breaks by 6-hydroxydopamine, ascorbic acid and H2O2 in CCC PM2 bacteriophage DNA. *Biometals* 5:223–227.
34. Halliwell B (1988) Albumin – an important extracellular antioxidant? *Biochem Pharmacol*,37:569–571.
35. Cadenas E (1989) Biochemistry of oxygen toxicity, Annual Review of Biochemistry, 58, 1989, 79–110.
36. Bagchi K, Puri S, (1998) Free radicals and antioxidants in health and disease, Eastern Mediterranean Health Journal, 4, 350-360.
37. Cadenas E, Davies KJA (2000) Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. Free Rad Biol Med, 29:222–30.
38. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM (1993) Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90(17): 7915-7922.
39. Linn S. (1995)DNA repair in mitochondria: How is it limited? What is its function? In: Esser K, Martin GM. Eds. Molecular Aspects of Aging. Wiley, Chichester ; 199-225.
40. Turrens, J.F. (2003) Mitochondrial formation of reactive oxygen species. J. Physiol. 552, 335–344.
41. Johnson FB, Sinclair D.A, Guarente L. (1999) Molecular biology of aging. Cell; 96: 291-302.

42. Sun, J. And Trumpower, B.L. (2003) Superoxide anion generation by the cytochrome bc1 complex. Arch. Biochem. Biophys. 419, 198–206
43. Coon MJ, Ding X, Pernecky SJ & Vaz ADN (1992). Cytochrome P450: Progress and predictions. *FASEB J* **6**, 669–673.
44. Yokoyama Y, Beckman JS, Beckman TK, Wheat JK, Cash TG,Freeman BA & Parks DA (1990). Circulating xanthine oxidase: potential mediator of ischemic injury. Am J Physiol 258, G564–570.
45. Igamberdiev, A.U. and Hill, R.D. (2008) Plant mitochondrial function during anaerobiosis. Ann. Bot. (Lond.) 103, 259–268
46. Castello, P.R. et al. (2006) Mitochondrial cytochrome oxidase produces nitric oxide under hypoxic conditions: implications for oxygen sensing and hypoxic signaling in eukaryotes. Cell Metab. 3, 277–287.
47. Radi, R. (2004) Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101, 4003–4008.
48. Butterfield, D.A. et al. (2007) Elevated levels of 3-nitrotyrosine in brain from subjects with amnestic mild cognitive impairment: implications for the role of nitration in the progression of Alzheimer's disease. Brain Res. 1148, 243–248
49. Faraci, F.M. (2005) Oxidative stress: the curse that underlies cerebral vascular dysfunction? Stroke 36, 186–188 .
50. Hamel, E. Et al. (2008) Oxidative stress and cerebrovascular dysfunction in mouse models of Alzheimer's disease. Exp. Physiol. 93, 116–120 .
51. Perry, G. Et al. (2002) Alzheimer disease and oxidative stress. J. Biomed. Biotechnol. 2, 120–123 .
52. Polidori, M.C. et al. (2007) Hallmarks of protein oxidative damage in neurodegenerative diseases: focus on Alzheimer's disease. Amino Acids 32, 553–559.
53. Pop-Busui, R. Et al. (2006) Diabetic neuropathy and oxidative stress. Diabetes Metab. Res. Rev. 22, 257–273.
54. Loschen, G. Et al. (1973) Mitochondrial H_2O_2 formation: relationship with energy conservation. FEBS Lett. 33, 84–87.
55. Cadenas, E. Et al. (1977) Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c Figure 4. Model for mitochondrially generated ROS and NO in cell signaling under hypoxic conditions. Free radical production by complexes III and IV. At low oxygen concentrations,

mitochondrial complex III produces O2 and complex IV produces NO . These combine to produce ONOO. All three oxidants can act intracellularly to modify the activity or level of macromolecules, such as HIF-1a (*) to affect hypoxic gene induction. In addition, NO can leave the cell to act in extracellular signaling pathways. Review Trends in Endocrinology and Metabolism Vol.20 No.7 338 reductase from beef-heart mitochondria. Arch. Biochem. Biophys. 180, 248–257.

56. Boveris, A. Et al. (1972) The cellular production of hydrogen peroxide. Biochem. J. 128, 617–630.
57. Bahorun T, Soobrarree MA, Luximon-Ramma V, Aruoma OI (2006): Free radicals and antioxidants in cardiovascular health and disease. Internet J Med Update; 1: 1-17.
58. Genestra M (2007): Oxyl radicals, redox-sensetive signaling cascades and antioxidants. Cell Signal; 19: 1807-1819.
59. Matthew K. Ross , Anberitha T. Matthews and Lee C. Mangum (2014) Chemical Atherogenesis: Role of Endogenous and Exogenous Poisons in Disease Development, Toxics , 2, 17-34.
60. Beeridge MV, Tan AS, McCoy KD, Wang R. (1996) The biochemical and cellular basis of cell proliferation assay that use tetrazolium salts. *Biochemica* 1996; 4: 15–20.
61. Smith CM, Marks AD, Lieberman MA. Marks' Basic Medical Biochemistry: A Clinical Approach, 2nd Edition, 2004.

13. SAŽETAK

U radu su opisani fizikalni i kemijski procesi nastajanja i oslobađanja slobodnih radikala. Glavni i sporedni uzroci oksidativnog stresa i njegove štetne posljedice na organizam. Objašnjeni su principi određivanja koncentracije flavonoida, fenolnih kiselina i ukupnog polifenola u uzorcima meda sa područja Republike Hrvatske visokotlačnom tekućinskom kromatografijom (HPLC). U ovom radu prikazani su dosadašnji rezultati u generiranju slobodnih radikala.

Ključne riječi: slobodni radikali, oksidativni stres, antioksidanti, fagociti.

14. SUMMARY

In this article, physical and chemical processes of formation and dismission of free radicals, so as main and collateral causes of oxidative stress and its harmful effects to organism are described. Principles of determination quantity of flavonoids, fenol acids and total polyphenola in samples of honey in Croatia using high performance liquid chromatography (HPLC) are explained. It is presented review of former results of generation free radicals.

Key words: free radicals, oxidative stress, antioxidants, phagocytes

15. POPIS SLIKA

Redni broj		Str.
1	Prikaz nastajanja i eliminacije ROS	2
2	Shematski prikaz izvora slobodnih radikala	3
3	Prikaz mogućnosti nastanka ROS-a	4
4	Generiranje slobodnih radikala putem elektron transportnog lanaca	5
5	Prikaz oksidacije polunezasićenih masnih kiselina	6
6	Sinteza i razgradnja ROS	9
7	Shematski prikaz nastajanja ROS i RNS	10
8	Prikaz oksidacijsko-redukcijskih procesa	11
9	Shematski prikaz aktivacije NADPH oksidaze u ubijanje bakterija	14
10	Prikaz Fenton-ove reakcije	18
11	Shematski prikaz Fentonove reakcije u krvožilnom sustavu i vanstaničnom sustavu i generiranje slobodnih radikala	20
12	Osnovne strukture formule najvažnijih podgrupa flavonoida	21
13	Prikaz a) EC-SOD, b) Mn-SOD, c) Cu/Zn-SOD	23
14	Shematski prikaz katalaze	24
15	Prikaz glutation peroksidaze	25
16	Shematski prikaz reakcije glutation peroksidaze i prevođenje H2O2 u vodu	25
17	Prikaz albumina	27
18	Instrument visokotlačne tekućinske kromatografije	29

16. POPIS TABLICA

Redni broj		Str.
1	Prikazani su rezultati fenolnih kiselina u koncentraciji µg/100 g meda	32
2	Prikazani su rezultati koncentracije ukupnih polifenola µg/100g meda	34
3	Prikazani su rezultati koncentracije flavonoida µg/100g meda	35

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Poljoprivredni fakultet u Osijeku

Završni rad

NASTAJANJE I IZLUČIVANJE SLOBODNIH RADIKALA KOD ŽIVOTINJA PRI STRESNUIM UVJETIMA

FORMATION AND SECRETION OF FREE RADICALSF WITH ANIMALS AT STRESNUIM CONDITIONS

Sažetak: U radu su opisani fizikalni i kemijski procesi nastajanja i oslobađanja slobodnih radikala. Glavni i sporedni uzroci oksidativnog stresa i njegove štetne posljedice na organizam. Objašnjeni su principi određivanja koncentracije flavonoida, fenolnih kiselina i ukupne polifenole u uzorcima meda sa područja Republike Hrvatske visokotlačnom tekućinskom kromatografijom (HPLC). U ovom radu prikazani su dosadašnji rezultati u generiranju slobodnih radikala.

Ključne riječi: slobodni radikali, oksidativni stres, antioksidanti, fagociti.

Summary: In this article, physical and chemical processes of formation and dismission of free radicals, so as main and collateral causes of oxidative stress and its harmful effects to organism are described. Principles of determination quantity of flavonoids, fenol acids and total polyphenola in samples of honey in Croatia using high performance liquid chromatography (HPLC) are explained. It is presented review of former results of generation free radicals.

Key words: free radicals, oxidative stress, antioxidants, phagocytes

Datum obrane: 21.09.2015 godine