

## ANTIOKSIDANTI

### 1. Uvod

Povsod, kjer je organska snov v stiku z zračnim kisikom (Razpredelnica 1), neprestano potekajo oksidacije posameznih sestavin. Pri sobni temperaturi in v odsotnosti aktivacijske energije, so običajno to zelo počasni procesi in šele po daljšem času opazimo spremenjene fizikalno-kemične in, v primerih hrane, tudi organoleptične lastnosti. Oksidativno »staranje« snovi je pod vplivom svetlobe in povišane temperature hitrejše. Ker v vsakdanjem življenju uporabljamo mnoge organske (polimerne) materiale, ki so izpostavljeni sončni svetlobi in zraku, so razumljiva prizadevanja, ki skušajo ohraniti prvotno funkcionalnost snovi nespremenjeno skozi daljši čas. Oksidacije lahko upočasnimo, če tem materialom (npr. avtomobilske pnevmatike, barve, laki, drugi polimerni materiali itd.) dodajamo snovi, ki na različne načine preprečujejo ali upočasnijo oksidacijo. Takim dodatkom pravimo antioksidanti. Vsakodnevna raba tega pojma pa pomeni predvsem tiste antioksidante, ki v našem organizmu preprečujejo oziroma zavirajo nekontrolirane oksidativne procese, ki povzročajo fiziološko staranje organizma in so hkrati osnova degenerativnim obolenjem.

Razpredelnica 1

**Sestava suhega zraka (v volumskih procentih) pri T=15° C in 101,4 kPa**

Plin	volumski %,	parcialni pritisk v mmHg ali v kPa	
<b>KISIK</b>	20,94	159	21,29
<b>DUŠIK</b>	78,08	601	80,12
<b>ARGON</b>	0,93		
<b>OGLJIKOV DIOKSID</b>	0,03		
<b>NEON, METAN, HELIJ, KRIPTON, VODIK, KSENON, N<sub>2</sub>O, NO<sub>2</sub>, O<sub>3</sub>, SO<sub>2</sub>, CO itd.</b>	do 100 %		
<b>Zrak, skupaj</b>		760	101,4

### 2. Kisik

Koža in nekatere sluznice so neprestano in neposredno v stiku s kisikom v zraku in občasno tudi s svetlobo. Z dihanjem prihaja kisik v notranje okolje telesa, kjer je bodisi vezan na hemoglobin (transportni protein za kisik v eritrocitih), bodisi raztopljen (Razpredelnica 2) v telesnih tekočinah in tkivih. Na hemoglobin je vezanega približno 98,5% kisika v telesu in le 1,5% ga je raztopljenega v plazmi. Parcialni pritisk kisika (pO<sub>2</sub>) v krvi se spreminja od približno pO<sub>2</sub> = 100 mm Hg (13.3 kPa) v pljučih do pO<sub>2</sub> = 40 mm Hg (5,32 kPa) v periferni venski krvi. Tkiva s pO<sub>2</sub> pod 30 mm Hg (3,99 kPa) so hipoksična.

Razpredelnica 2

**Topnost kisika v mmol/L pri T=10° C v nekaterih okoljih**

Morska voda	Destilirana voda	Heksan in podobna topila*
0,284	0,355	1,577

\* v perfluorogljikovodkih je topnost kisika bistveno višja

Ker je kisik, (podobno kot dušikov oksid, NO<sup>\*</sup>), lipofilni plin, je njegova koncentracija v lipidnih delih telesa (v bioloških membranah) približno štirikrat večja kot v vodnih okoljih. Zato so tudi reakcije oksidacije v teh predelih (lipidni dvosloj membran) hitrejše, kot v vodnih.

Poznamo dve vrsti kisika:

- kisik (O<sub>2</sub>, angleško tudi *dioxygen*), ki je lahko v:
  - tripletnem stanju (tripletni kisik, <sup>3</sup>O<sub>2</sub>, starejša oznaka zanj je: <sup>3</sup>Σ<sub>g</sub><sup>-</sup>) ali v
  - singletnem stanju (singletni kisik, <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, starejša oznaka je: <sup>1</sup>Δ<sub>g</sub>) in
- ozon (O<sub>3</sub>).

**Farmaceutvska kemija III**  
**Vaje in seminarji**

V zraku je  $^3\text{O}_2$  (20,9%) ter v sledovih še ozon,  $^1\text{O}_2$  v zraku praktično ni. Ta nastaja le v fotokemičnih reakcijah iz  $^3\text{O}_2$  po osvetljevanju fotosenzibilizatorjev s svetlobo primerne valovne dolžine in v nekaterih kemičnih reakcijah. Razlika med tripletnim in singletnim kisikom je v razporeditvi elektronov v zadnji razvezni molekulske orbitali. Posledice so različne kemične in fizikalne lastnosti.

Molekulske orbitale	Tripletni kisik $^3\text{O}_2$	Singletni kisik $^1\text{O}_2$	Superoksidni radikal $\text{O}_2^{\cdot-}$
$\sigma^*2p$	↑ ↑	↓↑	↓↑ ↑
$\pi^*2p$	↓↑ ↓↑	↓↑ ↓↑	↓↑ ↓↑
$\pi 2p$	↓↑	↓↑	↓↑
$\sigma 2p$	↓↑	↓↑	↓↑
$\sigma^*2s$	↓↑	↓↑	↓↑
$\sigma 2s$	↓↑	↓↑	↓↑
$\sigma^*1s$	↓↑	↓↑	↓↑
$\sigma 1s$	↓↑	↓↑	↓↑

**Slika 1.** Razpored elektronov po molekulske orbitalah različnih kisikovih zvrsti.

$^3\text{O}_2$  ima v molekuli dva nesparjena elektrona. Ker so radikali vse snovi (od atomov, molekul do kompleksov), ki imajo vsaj en nesparjen elektron, lahko  $^3\text{O}_2$  obravnavamo kot biradikal, ki je v vseh agregatnih stanjih paramagneten. Zaradi nesparjenih elektronov  $^3\text{O}_2$  izredno hitro in zlahka reagira z večino radikalov, razen s samim seboj. Z neradikalnimi organskimi spojinami  $^3\text{O}_2$  pri fizioloških pogojih praktično ne reagira oziroma je reakcija praviloma zelo počasna. Zato se večina organskih spojin v stiku s  $^3\text{O}_2$  iz zraka in v odsotnosti aktivacijske energije ali radikalskih sprožilcev oksidacije, izredno počasi oksidira.

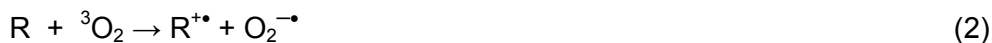
Singletni kisik ima v molekulske orbitali vse elektrone v parih in zlahka reagira z vsako organsko spojino. Nizka energija aktivacije (1-2 kcal/mol ali 4,184 – 8,368 kJ/mol) v primerjavi z aktivacijsko energijo pri neencimskih reakcijah, ki je cca 50 kcal/mol (209,2 kJ/mol) pomeni, da singletni kisik takoj oksidira vsako organsko spojino. V fizioloških/patoloških pogojih  $^1\text{O}_2$  po nastanku zreagira v kroglici z radijem 0,1  $\mu\text{m}$ . Visoka reaktivnost je glavni razlog, da ga ni v atmosferi, v telesu pa se pojavlja samo v posebnih primerih.

### 2.1. Superoksidni radikal in superoksid dismutaza (SOD)

Tripletni kisik zaradi svoje razporeditve elektronov zlahka sprejme en elektron. Nastane superoksidni (mono) radikal (1).



Vsaka snov, ki lahko odda elektron (tega sprejme kisik), se v tem procesu oksidira, tripletni kisik pa se reducira najprej v superoksidni radikal (2), (3).



oziroma:

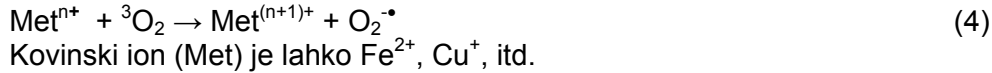


Elektroni, ki jih v celici sprejme molekula  $^3\text{O}_2$ , prihajajo iz dihalne verige ali iz drugih virov. Molekula  $^3\text{O}_2$  mora formalno sprejeti štiri elektrone, da nastaneta dve molekuli vode. V resnici redukcija kisika do vode poteka v nizu enoelektronskih redoks reakcij. Zato je  $^3\text{O}_2$  kot končni prejemnik elektronov pomemben fiziološki oksidant v vseh aerobnih oblikah življenja.

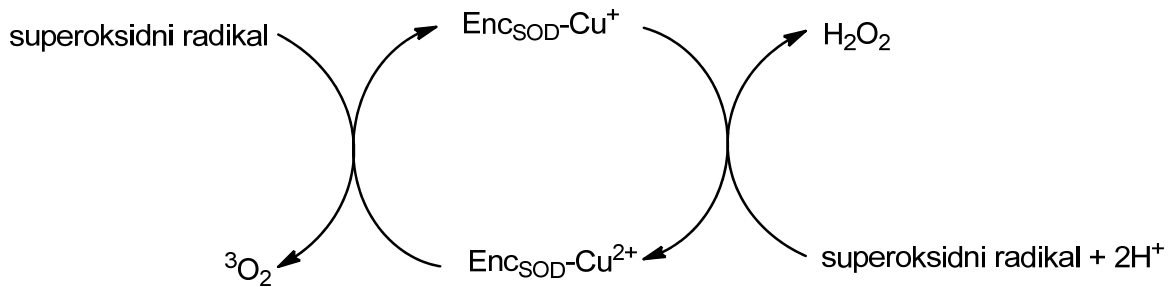
Superoksidni radikal nastaja tudi v nekaterih encimsko kataliziranih reakcijah, npr. pri oksidaciji NADPH z NADPH oksidazo, pri oksidaciji ksantina s ksantin oksidazo itd.

## Farmaceutvska kemija III Vaje in seminarji

$^3\text{O}_2$  lahko sprejme en elektron tudi iz drugih virov v celici (1). Donorji elektrona so različne spojine in tudi nekateri kovinski ioni (4). Ker je superoksidni radikal kot radikal nevaren, ga organizem s pomočjo encima superoksid dismutaze (SOD) v reakciji disproporcionacije neprestano odstranjuje tako, da ga pretvarja v vodikov peroksid in  $^3\text{O}_2$  (Shema 1 in reakcija (5)). SOD je pomemben antoksidativni encim in prvi člen v verigi antioksidantov.



**Shema 1.** Dismutacija superoksida s SOD do tripletnega kisika in vodikovega peroksida



ali:

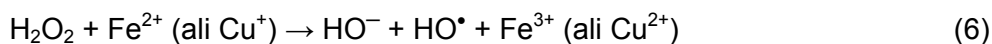


### 2.2. Vodikov peroksid in hidroksilni radikal

Vodikov peroksid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), ki nastaja v reakciji (5) in še v nekaterih drugih encimskih in neencimskih reakcijah (npr. pri metabolizmu biogenih aminov z monoaminsko oksidazo, pri oksidaciji hidrokinonov), je za celico še vedno nevaren, ker je:

- oksidant,
- po transportnih lastnostih podoben vodi in
- ker iz njega lahko nastaja nekontrolirano hidroksilni radikal ( $\text{HO}^\bullet$ ) po reakciji (6).

Vodikov peroksid lahko podobno kot voda difundira po celici in tudi skozi biološke membrane. Če na tej poti slučajno sreča  $\text{Fe}^{2+}$  ali  $\text{Cu}^+$  ion pride do Fentonove reakcije (6) v kateri se kovinski ion oksidira, vodikov peroksid pa pretvori v hidroksilni anion in v izredno reaktivni in zato nevarni  $\text{HO}^\bullet$ .



Nastanek  $\text{HO}^\bullet$  dokažemo posredno preko nastalih produktov z raznimi spojinami ali če dodamo spinske lovilce (*spin trap*), ki reagirajo s  $\text{HO}^\bullet$  pri čemer nastanejo radikali z daljšo življenjsko dobo, ki jih zaznamo z elektronsko paramagnetno resonanco (EPR).

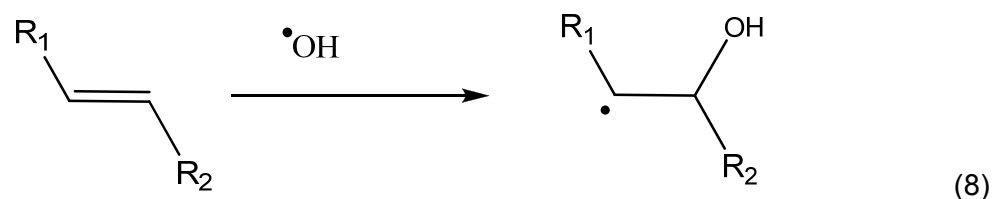
Kemična reaktivnost  $\text{HO}^\bullet$  je tolikšna, da brez težav sproži nenadzorovane oksidacije v celici, ker lahko reagira z nukleinskimi kislinami, proteini in lipidi. Hidroksilni radikal je »toksičen«, ker lahko odtegne vodikov atom iz različnih spojin (7) in ker se lahko veže (adicija) na spojine z dvojno vezjo (8).



Če je X= kisik nastane alkoksi radikal ( $\text{R-O}^\bullet$ )

Če je X= žveplo nastane tienilni radikal ( $\text{R-S}^\bullet$ )

in



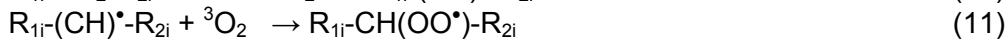
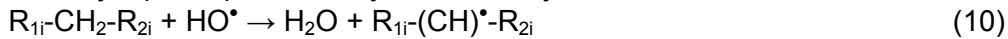
V obeh primerih nastanejo nekoliko manj reaktivni radikali, ki večinoma še vedno lahko odvezamejo vodikov atom drugim spojinam (9).



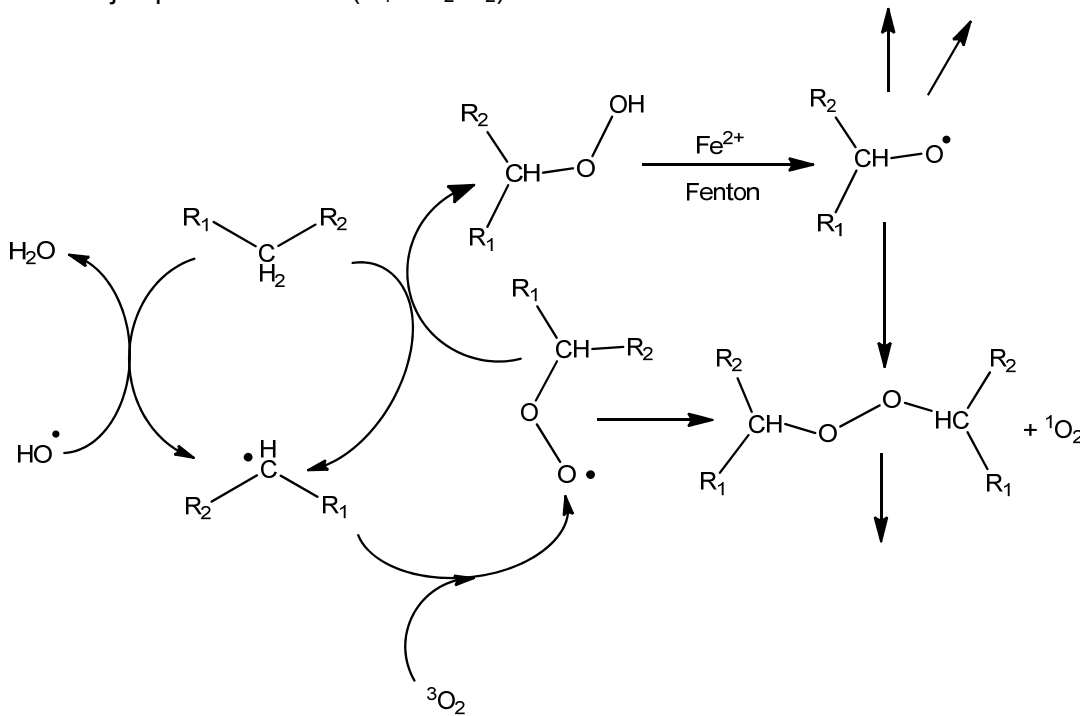
### 2.2.1 Lipidna peroksidacija

Lipidna peroksidacija je nekontrolirana oksidacija lipidov v biološki membrani, ki se začne kot radikalska verižna reakcija in se nadaljuje v kompleksen in prepleten sistem oksidacij, ki potekajo po radikalskih in neradikalskih poteh, proti koncu se v oksidacije vključi še nastali  $^1O_2$ . Reakcijo peroksidacije lahko sproži hidroksilni radikal (10) oziroma vsak radikal, ki je sposoben odvzeti vodikov atom lipidni molekuli. Nastali lipidni radikal reagira z  $^3O_2$ , ki je raztopljen v membrani (11), peroksilni radikal pa v nadaljevanju odzame vodikov atom naslednji molekuli lipida (12). Ciklični krog opisanih reakcij se ponavlja, lipidne molekule se po radikalski poti postopoma oksidirajo do hidroperoksidov, ki se v nizu nadaljnjih reakcij pretvarjajo v končne alkane, alkene, aldehide, ketone, epokside itd. Opisana oksidacija lipidnih komponent pripelje do spremenjene strukture in funkcije biološke membrane (Shema 2).

Verižne reakcije lipidne peroksidacije so naslednje:



**Shema 2.** Lipidna peroksidacija: začetek in širitev s hidroksilnim radikalom sprožene oksidacije lipidnih molekul ( $R_1-CH_2-R_2$ ).



Iz Sheme 2. sledi, da je teoretično dovolj en sam hidroksilni radikal za sprožitev oksidacije lipidnih molekul, ki jo omejuje le količina razpoložljivega kisika oziroma lipidov. Če dopustimo še možnost Fentonove reakcije, potem nastali hidroperoksidi reagirajo naprej do novih radikalov. V reakciji dveh hidroperoksilnih radikalov pa nastaja singletni kisik (13), ki sproži nov val oksidacij. Ker potekajo vse omenjene reakcije brez sodelovanja encimov, jih celica ne more neposredno kontrolirati. Zato je evolucija razvila posebne spojine – antioksidante, ki se lahko vmešajo v opisane reakcije tako, da reagirajo s posameznimi intermediati in tako prekinijo verigo povezanih reakcij. Končni rezultat je upočasnitev ali prekinitev lipidne peroksidacije.

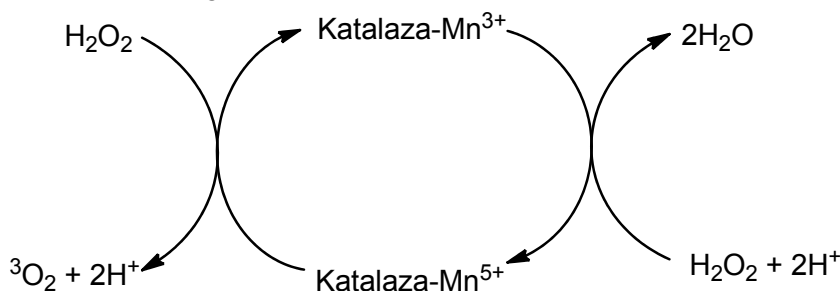


Da bi se organizem zaščitil pred nevarnim delovanjem hidroksilnih radikalov, preventivno odstranjuje najprej superoksidni radikal (5) s SOD ter v nadaljevanju še nastali  $H_2O_2$ . Prav tako poskrbi, da so ioni železa in bakra vedno varno »spravljeni« v različne komplekse, oziroma so v oksidiranem stanju in ne morajo vstopati v Fentonovo reakcijo.

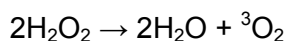
### 2.3. Katalaze in antioksidanti

Pretvorbo  $H_2O_2$  katalizirajo katalaze in še nekateri drugimi encimi. Katalaze (Shema 3.) pretvarjajo  $H_2O_2$  v vodo in tripletni kisik (14). Vendar odstranjevanje superoksidnega radikala in  $H_2O_2$  še ni dovolj za zaviranje nenadzorovanih procesov oksidacije. Potrebni so še najrazličnejši drugi antioksidanti.

**Shema 3.** Pretvorba vodikovega peroksida v tripletni kisik in vodo



ali:



Encima SOD in katalaza sta razširjena in učinkovita predstavnika fizioloških antioksidantov. **Antioksidanti so encimi, proteini, peptidi in najrazličnejše druge spojine endogenega ali eksogenega (vitamini, karoteni, polifenoli itd.) izvora, ki večinoma že v nizkih koncentracijah lahko upočasnijo, prekinejo ali preprečijo veržne reakcije in druge nekontrolirane reakcije oksidacije, ki jih sprožajo bodisi reaktivni radikali bodisi druge reaktivne zvrsti kisika in dušika.** Vsaka spojina, ki reagira z radikali, z reaktivnimi intermediati, ki lahko ponudi vodikov atom oziroma, če s kompleksiranjem ionov železa ali bakra te ione izloči iz redoks procesov, ima antioksidativno delovanje.

Neproteinski fiziološki antioksidanti so spojine, ki spadajo med fenole (npr.: vitamin E, estradiol, itd.), enole (npr.: vitamin C, flavoni itd.), kinone/hidrokinone (koencim  $Q_{10}$ ), tiole (npr.: glutation GSH) in številne druge spojine (polieni: likopen,  $\beta$ -karoten itd.)

#### 2.3.1 Vitamin E

Med lipofilnimi fenolnimi antioksidanti je najbolj znan vitamin E ( $\alpha$ -tokoferol, Slika 1), ki je zaradi svoje lipofilnosti pretežno v lipidnem dvosloju celične membrane. V plazmi (vezan na proteine ali v sklopu lipoproteinskih kopleksov) je običajna koncentracija vitamina E v območju od 10 do 40  $\mu M$ , v jetrih pa okoli 50  $\mu mol/kg$  jetrnega tkiva. Poznamo več tokoferolov, ki se razlikujejo po številu in razmestitvi metilnih skupin na fenilnem obroču:

$\alpha$ -tokoferol ima na aromatskem obroču tri metilne skupine, (Slika 1)

$\beta$ -tokoferol in  $\gamma$ -tokoferol imata dve metilni skupini v različnih položajih ter

$\delta$ -tokoferol samo eno metilno skupino.

Ker metilne skupine prispevajo k stabilnosti tokoferilnega radikala, se lastnosti različnih tokoferolov razlikujejo. Najbolj razširjen je  $\alpha$ -tokoferol, ki je tudi najučinkovitejši antioksidant.

Vitamin E kot antioksidant v hrani ima oznake:

E306 (ekstrakt z naravnim vitaminom E),

E307 (sintezni  $\alpha$ -tokoferol),

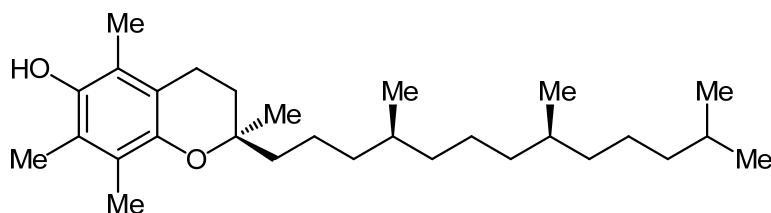
E308 (sintezni  $\gamma$ -tokoferol) in

## Farmaceutvska kemija III

### Vaje in seminarji

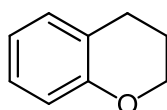
E309 (sintezni  $\delta$ -tokoferol).

Ker je vitamin E zelo občutljiv na različne oksidante - tudi na zračni kisik, je v pripravkih vedno kot ester z očetno kislino (tokoferilacetat). Ester sam ni antioksidant. Ta lastnost se pojavi šele po hidrolizi estra.



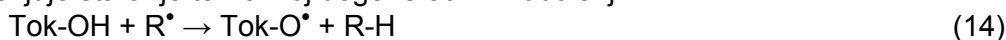
**Slika 1.**  $\alpha$ -Tokoferol kot primer fenolnega antioksidanta

V molekuli tokoferola sta pomembni fenolna skupina na substituiranem kromanskem obroču (slika 2) in dolga (C18) razvejana alkilna veriga.



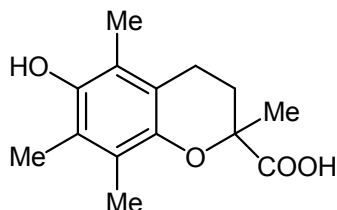
**Slika 2.** Kromanski sistem

Fenolna skupina je nosilka antioksidativne lastnosti, substituenti na obroču pa vplivajo na stabilnost tokoferilnega radikala in posredno na antoksidativno funkcijo vitamina E. V primeru  $\alpha$ -tokoferola (Slika 1) je aromatski obroč pentasubstituiran in nastali tokoferil radikal (reakcija 14) je bolj stabilen zaradi nezmožnosti delokalizacije nesparjenega elektrona po obroču. Razvejana alkilna veriga prispeva k lipofilnosti  $\alpha$ -tokoferola in kot sidro zasidra  $\alpha$ -tokoferol v membranske strukture celice. Vitamin E je topen v maščobah in netopen v vodi. Zaradi te lastnosti je glavni antioksidant v membrani. Celico ščiti pred lipidno peroksidacijo in posredno upočasnjuje staranje ter razvoj degenerativnih obolenj.



$\text{R}^\bullet$  je lahko  $\text{HO}^\bullet$ ,  $\text{HOO}^\bullet$ , Alkil- $\text{O}^\bullet$  itd.

Poznavanje odnosa med strukturo in lastnostmi pri vitaminu E je vodilo v sintezo fenolnega antioksidanta troloksa (*Trolox*), podobnega vitaminu E. Troloks (Slika 3) je sintezno dostopen analog  $\alpha$ -tokoferola, ki je veliko bolje topen v vodi kot vitamin E. Njegova vodotopnost je 50 mg/100 mL vode in 16 g/100 mL etanola. S pripravo soli pa lahko vodotopnost še povečamo. Zaradi spremenjene lipofilnosti je antioksidativno delovanje troloksa omejeno na druga področja kot pri vitaminu E.



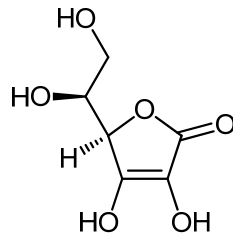
**Slika 3.** Struktura troloksa.

### 2.3.2 Vitamin C (*askorbinska kislina*)

V svetu najbolj poznan antioksidant vitamin C, ali askorbinska kislina, (slika 4) ki je vodotopen (Razpredelnica 3.) vitamin. Enolna hidroksilna skupina na mestu 4 je kislá ( $\text{pK}_{\text{a}1}=4,25$ ).

**Farmaceutvska kemija III**  
**Vaje in seminarji**

---

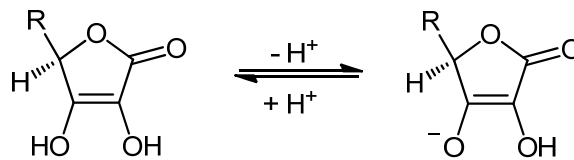


**Slika 4.** Struktura askorbinske kisline: primer enolnega antioksidanta

**Razpredelnica 3.** Topnost askorbinske kisline

Topilo	Topnost v g/100mL topila
Voda	33
Etanol	2

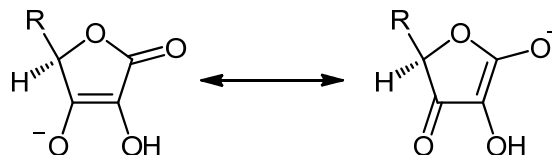
Kislost vitamina C je posledica vinologije (Slika 5). Znana je natrijeva sol (natrijev askorbat), ki je kot vodna raztopina pripravek vitamina C za parenteralno uporabo.



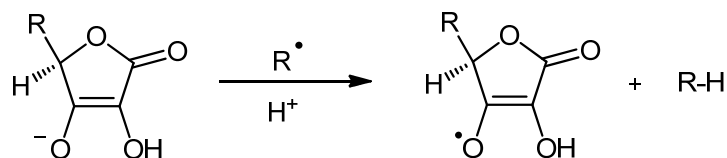
**Slika 5.** Disociacija askorbinske kisline

V plazmi je koncentracija vitamina C 50-60  $\mu\text{M}$ , v jetrih pa 260  $\mu\text{mol/kg}$  jetrnega tkiva. V očesnem zrklju je koncentracija askorbata okoli 1 mM. Zaradi konjugiranega sistema je možnih več resonančnih struktur askorbatnega aniona (Shema 4).

**Shema 4** Resonančni strukturi askorbatnega aniona



Askorbinska kislina, oziroma askorbat je lovilec radikalov in reducent. Askorbat lahko odda elektron (deluje kot antioksidant) različnim (O, N, S in C) radikalom (Slika 6) ali reducira reaktivne zvrsti kisika (ROS) ter dušika (RNS). Pri reakciji z radikalom iz askorbata nastane stabilnejši askorbil radikal. Od tu naprej so možne različne nadaljnje pretvorbe, ki jih razdelimo v dve skupini. V prvi skupini pretvorb so tiste, ki askorbil radikal pretvorijo nazaj v askorbat: disproporcionacija dveh askorbil radikalov v askorbat in dehidroaskorbinsko kislino ter regeneracija z glutationom (GSH). V drugi skupini pretvorb pa so vse tiste, ki askorbil radikal pretvorijo v manjše neaktivne molekule, ki se izločijo z urinom.



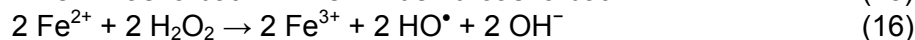
**Slika 6.** Reakcija askorbata z radikalom. V reakciji nastane askorbil radikal

Nekateri antioksidanti, med njimi je tudi vitamin C, so lahko tudi pro-oksidanti. To pomeni, da lahko sprožajo oksidativne procese in lipidno peroksidacijo. Askorbat v zgornji reakciji (Slika

### Farmaceutvska kemija III

#### Vaje in seminarji

6) je antioksidant (lovilec radikalov, angleško: *radical scavenger*), ker je odstranil radikal ( $R^\bullet$ ). Ker pa askorbat lahko reducira tudi  $Fe^{3+}$  v  $Fe^{2+}$ , je njegova vloga tudi nasprotna. Pojav  $Fe^{2+}$  omogoča nastajanje  $HO^\bullet$  v Fentonovi reakciji (6), (15) in (16). Nastali  $HO^\bullet$  brez težav sproža oksidativne procese. Zaradi tega je askorbat posredno tudi pro-oksidant. Pri vitaminu E je pro-oksidativna lastnost povezana s koncentracijo tokoferil radikala in bolj zapletena kot pri askorbatu.

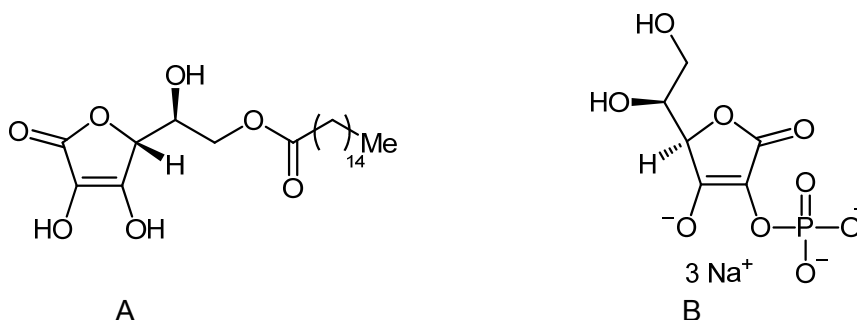


Molekula askorbinske kisline ima antioksidativno enolno skupino (4. mesto). Heterociklični obroč prispeva k stabilnosti nastalega askorbil radikala, hidroksilne skupine pa poskrbe za dobro vodotopnost. Zato je vitamin C antioksidant, ki deluje le v vodnih okoljih v celici. Sposoben je regenerirati tudi tokoferil radikal.

V vsakdanjem življenju smo preko hrane in pijače neprestano »izpostavljeni« različnim antioksidantom na osnovi askorbinske kisline, ki imajo naslednje oznake:

- E300 je askorbinska kislina
- E301 je natrijev askorbat
- E302 je kalcijev askorbat
- E303 je kalijev askorbat
- E304 je askorbilpalmitat in
- E305 je askorbilstearat.

V skupini derivatov askorbinske kisline sta zanimivi dve spojini: askorbil palmitat (stearat) in natrijev (ali magnezijev) askorbilfosfat (Slika 7). Obe spojini sta antioksidanta, ki se uporabljata predvsem v kozmetičnih izdelkih. Askorbilpalmitat je amfifilna snov, ki se z alkilnim delom sidra v lipofilne faze (micele, lipofilni nanodelci, razni tipi emulzij in liposomske membrane). Polarni del molekule je v vodni sredini, kjer deluje kot antioksidant.



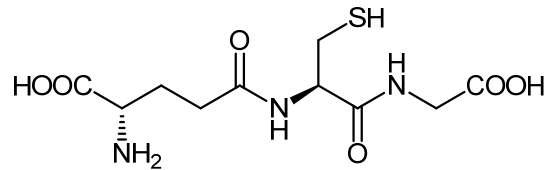
Slika 7. Strukturi askorbilpalmitata (A) in natrijeve soli askorbil fosfata (B)

#### 2.3.3 Glutation (GSH)

Med spojinami, ki lahko prekinejo radikalske reakcije so še spojine s tiolno ( $-SH$ ) skupino. Tiolna skupina je v aminokislini cistein in se pojavlja v mnogih proteinih. Vsi proteini, ki imajo tiolne skupine, so tudi antioksidanti. V večini primerov je to njihova neprioritetna lastnost, oziroma so te tiolne skupine ponavadi zadnja obrambna linija antioksidantov v telesu. Serumski albumin (HSA, *human serum albumin*) ima eno samo tiolno skupino v svoji strukturi. Zaradi te je HSA, poleg ostalega, tudi antioksidant.

Glavni celični tiolni antioksidant je tripeptid glutation (GSH). Sestavljen je iz treh aminokislin: glutaminske kisline, cisteina in glicina (Slika 8). V plazmi je njegova koncentracija  $4 \mu M$ , v jetrih pa ga je tisočkrat več:  $6,4 \text{ mmol/kg}$  tkiva. GSH ni samo antioksidant, ampak lahko kot nukleofil reagira s številnimi eksogenimi ali endogenimi elektrofilni. Na ta način organizem odstranjuje elektrofile (strupe), ki bi poškodovali genetski material ali proteine.





**Slika 8.** Struktura glutationa (GSH,  $\gamma$ -L-Glu-L-Cys-Gly) kot primer tiolnega antioksidanta

GSH se kot antioksidant po reakciji z radikalom pretvori v radikal ( $\text{GS}^\bullet$ ), ki pa najraje reagira še z enim  $\text{GS}^\bullet$  do disulfidne spojine ( $\text{GS-SG}$ ). Disulfidi so telesu znane spojine in v encimskih reakcijah redukcije, jih organizme pretvori nazaj v tirole. Na tem dejstvu temelji pomemben zaključek, da organizem troši svojo energijo, da preprečuje nekontrolirane oksidacije in lipidne peroksidacije.

### 3. Delovanje antioksidantov

Z rastlinsko hrano vnašamo v telo mnoge spojine (različni flavoni, polifenoli, polieni, nenasičene maščobne kisline, različna rastlinska barvila, žveplove spojine itd.), ki delujejo kot antioksidanti. Med njimi sta pomembna vitamin C in vitamin E. Antioksidanti se med seboj razlikujejo po mehanizmu delovanja, po redoks potencialu, po stabilnosti nastalega radikala in po tem ali jih organizem lahko obnovi. Večina raznolikih antioksidantov je neobnovljiva, kar pomeni, da se v reakciji z radikali porabljajo. Fiziološki antioksidanti (vitamin C, vitamin E, GSH in številni drugi) so do določene stopnje obnovljivi.

Fenoli, enoli in tioli so antioksidanti, ker formalno lahko ponudijo vodikov atom (17), (18).



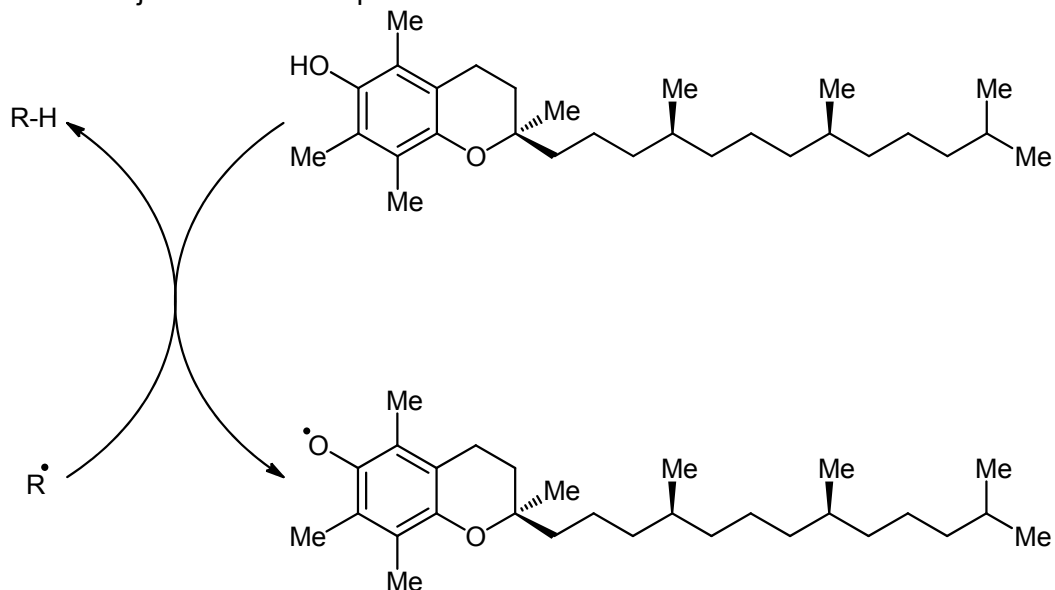
Verjetneje je, da je proces dvostopenjski: najprej pride do disociacije fenola, enola ali tiola do ustreznega aniona, sledi prenos elektrona (19), (20):



Pri reakciji radikala z antioksidantom, slednji preide v radikal, ki je v primerjavi z  $\text{R}^\bullet$  stabilnejši (manj reaktiven), manj nevaren in praviloma ne more sprožiti lipidno peroksidacijo. Ker iz  $\text{HO}^\bullet$  po reakciji z antioksidantom nastane neškodljiva voda, oziroma ker po reakciji C-radikala ( $\text{R}^\bullet$ ) z antioksidantom nastane prvotna spojina, je s tem preprečen začetek lipidne peroksidacije. Antioksidanti lahko na opisan način reagirajo tudi z radikali, ki se pojavljajo v kasnejših fazah lipidne peroksidacije (npr. z  $\text{R-O}^\bullet$ ,  $\text{R-OO}^\bullet$  in drugimi radikali). Z odstranitvijo sprožilnih radikalov in radikalov, ki se pojavijo tekom lipidne peroksidacije, se ta proces lahko ustavi ali vsaj upočasni. Pomembno je, da so antioksidanti vedno dovolj blizu nastalim radikalom.

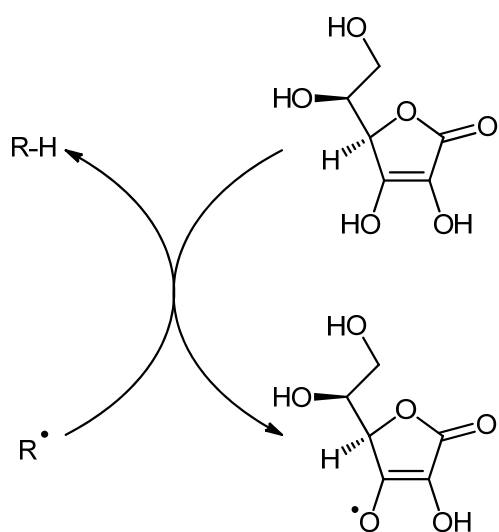
V reakciji vitamina E z radikalom (Shema 5) nastane stabilni tokoferil radikal, ki običajno ne sproža lipidne peroksidacije. Zaradi tega se oksidacija lipidov v membrani ustavi. Vitamin C regenerira nastali tokoferilni radikal nazaj v vitamin E.

**Shema 5.** Reakcija  $\alpha$ -tokoferola s primarnim radikalom



V reakciji vitamina C z radikalom nastane stabilnejši askorbil radikal, ki se po različnih poteh pretvori v različne končne produkte. GSH pretvori askorbil radikal v vitamin C, v reakciji dveh molekul askorbil radikala nastaneta vitamin C in dehidroaskorbinska kislina, ki se z vodo pretvori v spojine, ki se izločijo skozi ledvica.

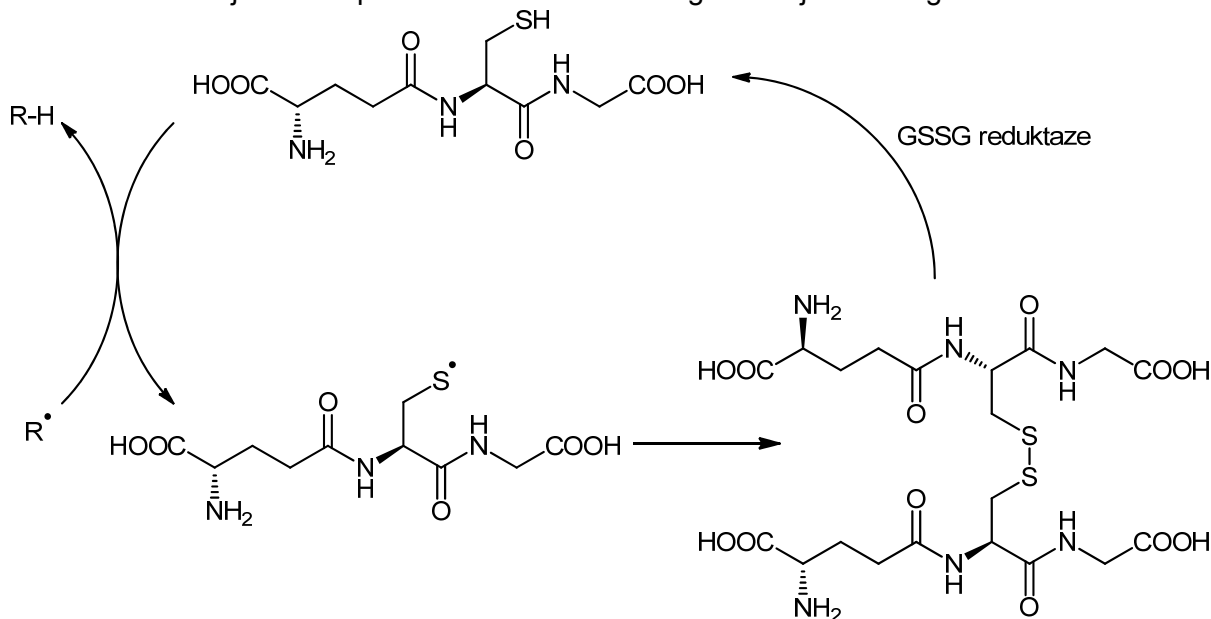
**Shema 6.** Reakcija askorbinske kisline s primarnim radikalom



Glutation (GSH) deluje kot antioksidant nekoliko drugače. Kot vitamin E in vitamin C tudi GSH nudi vodikov atom radikalom, nastali žveplov radikal pa hitro dimerizira do glutation disulfida (GSSG). Nastali disulfid je substrat mnogih reduktaz, ki ga reducirajo nazaj v GSH.

**Farmacevtska kemija III**  
**Vaje in seminarji**

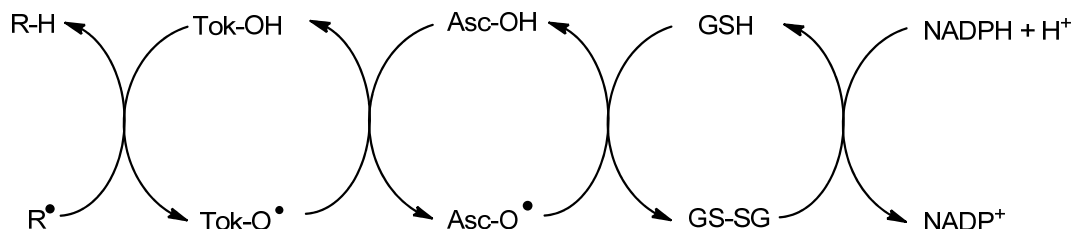
**Shema 7.** Reakcija GSH s primarnim radikalom in regeneracija nastalega GSSG



Omenili smo že, da antioksidanti v celici med seboj sodelujejo tudi tako, da drug drugega regenerirajo, če je potrebno. Tako askorbat regenerira tokoferil radikal, askorbil radikal regenerira GSH, GSSG pa reducirajo reductaze, ki koristijo koencim NADPH kot reducent. Primer medsebojne povezanosti antioksidantov in kako celica z vključitvijo svojega metabolizma skrbi za obnavljanje nekaterih ključnih (vitamin E, vitamini C in GSH) antioksidantov je prikazan na Shemi 8.

Antioksidanti delujejo v celici kot mreža medsebojno povezanih in soodvisnih redoks reakcij. Pri svojem delovanju se nekateri porabljajo, nekateri pa obnavljajo. Zato moramo skrbeti, da se uporabljeni antioksidanti stalno obnavljajo z ustrežno prehrano in da se ne izpostavimo stanjem, kjer se lahko v kratkem času pojavi večje število radikalov. Telo in tudi vsaka celica ima svojo navzgor omejeno antioksidativno kapaciteto. Ko je ta presežena, se začne lipidna peoksidacija, v večjem obsegu. Če začasno prevladajo oksidativni procesi nad reduktivnimi, potem govorimo o oksidativnem stresu. Telo lahko take oksidativne strese po določenem času zaustavi, vendar so pri tem nastale mnoge neradikalne spojine (aldehidi), ki difundirajo po telesu in reagirajo z nukleinskimi kislinami (mutacije, rak) in proteini (avtoimuna obolenja).

**Shema 8.** Primer antioksidativne mreže: povezanost in sodelovanje vitamina E (membranski antioksidant), vitamina C (antioksidant v vodnem okolju) in GSH pri odstranjevanju primarnega radikala R•. Nastali GSSG je substrat za GSSG reductazo, ki ga reducira v GSH.



Tok-OH: α-tokoferol (vitamin E)

Tok-O•: α-tokoferil radikal

Asc-OH: askorbinska kislina (vitamin C)

Asc-O•: askorbil radikal

GSH: glutation

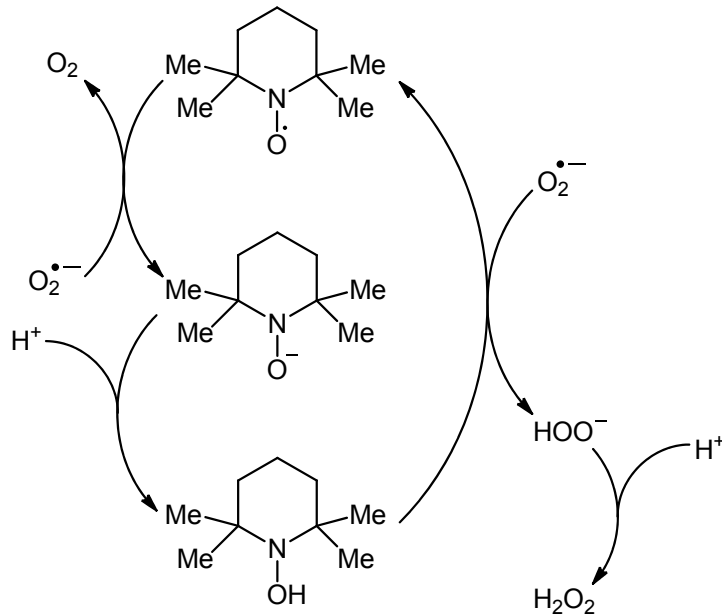
GS-SG: glutation disulfid

NADPH: reduciran nikotinadenin dinukleotid fosfat, NADP<sup>+</sup>: nikotinadenin dinukleotid fosfat

Iz sheme 8 lahko zaključimo, da dodajanje posameznega antioksidanta v večjih odmerkih ni smiselno, ker s tem dosežemo predvsem kopičenje njegovega radikala, kar lahko vodi v pro-oxidativno delovanje.

### 3.1. SOD mimetiki in mimetiki katalaz

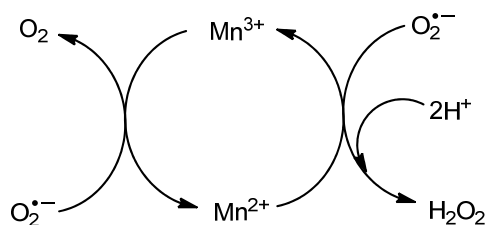
**Shema 9.** Pretvarjanje superoksida v kisik in vodikov peroksid ob prisotnosti 1-oksil-2,2,6,6,-tetrametilpiperidina.



Za nitroksidni radikal (TEMPO, **t**etrametilpiperidin-**N**-oksil) so ugotovili, da z  $O_2^{\bullet-}$  reagira tako, da nastaneta kisik in vodikov peroksid. Ker tudi SOD pretvarja superoksid v kisik in vodikov peroksid, je reakcija (Shema 9) primer oponašanja delovanja SOD, oziroma TEMPO je SOD mimetik. Znanih je še več strukturno drugačnih spojin, ki lahko prenašajo elektron z ene molekule superoksida na drugo in v tem oponašajo SOD. Predvsem so to različni kompleksi železa, bakra in mangana. Za terapevtsko rabo so najbolj zanimivi kompleksi mangana, ker je manganov ion manj toksičen za telo kot železov ali bakrov. Manganov ion ( $Mn^{3+}$ ) reagira s superoksidnim radikalom: (21) in (22). Pri tem nastaneta vodikov peroksid in kisik.



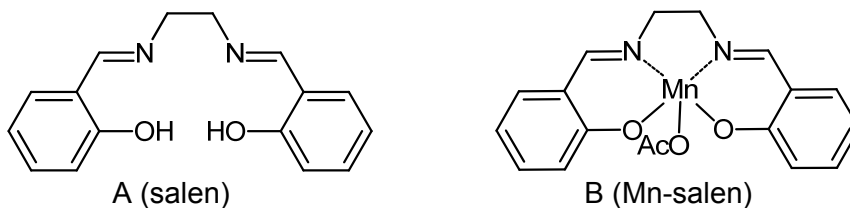
ali



Pripravili so večje število različnih manganovih kompleksov. Najenostavnejši kompleks z opisano funkcijo je kompleks  $Mn^{3+}$  z *N,N*-bis(saliciliden)etan-1,2-diaminom, ki ga v literaturi imenujejo tudi Mn-salen (Slika 9). Kompleks pretvarja superoksidni radikal v kisik in vodikov peroksid (21), (22).

**Farmaceutvska kemija III**  
**Vaje in seminarji**

---



**Slika 9.** Struktura *N,N*-bis(saliciliden)etan-1,2-diamina (A) in njegovega kompleksa z  $\text{Mn}^{3+}$  (B)

Mn-salen lahko nadalje pretvarja  $\text{H}_2\text{O}_2$  v kisik in vodo (23), (24), kar pomeni, da ni samo SOD mimetik ampak oponaša tudi delovanje katalaze (Shema 3, (14)). Njegovo katalazno delovanje opisujeta reakciji (23) in (24).



Pri vnetnih reakcijah je nastajanje superoksidnega radikala izdatnejše in presega sposobnost SOD za njegovo pretvorbo v vodikov peroksid in kisik. Zato je smiselno odstranjevanje superoksidnega radikala z SOD mimetiki, ker na ta način preprečimo, da bi se superoksidni radikal pretvoril v hidrosilni radikal, ki bi sprožil lipidno peroksidacijo.