

Uticaj slobodnih radikala na aktivnost citohrom c oksidaze – protektivna svojstva zelenog čaja

Slobodni radikali su atomi, molekuli ili joni koji u poslednjoj energetskoj orbitali imaju nesparene elektrone. Nastaju tokom različitih fizioloških i patoloških procesa i poznati su po visokoj reaktivnosti. Lako stupaju u reakcije sa lipidima i proteinima dovodeći do izmena u njihovoj strukturi i funkciji. Citohrom c oksidaza jedan je od enzima respiratornog lanca mitohondrija koji ima ulogu u prenošenju elektrona od citohroma do kiseonika. Reakcija je izrazito egzotermna i dolazi do stvaranja vode, a oslobođena energija koristi se za sintezu ATP-a. Slobodni radikali mogu oštetiti ovaj enzim i smanjiti njegovu aktivnost, a to može dovesti do razvoja po ćeliju teškog energetskog deficita. Brojna istraživanja okrenuta su ka pronalaženju supstancija iz prirode sa antioksidantnim svojstvima. Zeleni čaj je bogat flavonoidima i polifenolima za koja je pokazano da imaju antioksidantne osobine. Cilj ovoga rada bio je da se ispituju protektivna svojstva zelenog čaja na smanjenje aktivnosti citohrom c oksidaze uzrokovane slobodnim radikalima. Dobijeni rezultati pokazali su značajan antioksidativni efekat ekstrakta zelenog čaja.

Uvod

Najznačajniji put sinteze ATP-a i dobijanja energije za ćeliju predstavlja respiratorni lanac mitohondrija. On se sastoji od niza FeS proteina, citohroma i flavoproteina čija je funkcija prenos elektrona preko redoks parova sa mesta nižeg ka mestu višeg redoks potencijala. Citohrom c oksidaza, poznata još i kao Varburgov enzim ili citohrom *aa3* oksidaza, jedan je od enzima respiratornog lanca, prenosilac

redukcionih ekvivalenata sa sistema citohroma na molekularni kiseonik. Primanjem elektrona kiseonik se redukuje, odnosno aktivira, pri čemu reaguje sa jonima vodonika gradeći vodu. Nastanak vode u respiratornom lancu najvažnija je egzotermna reakcija u metabolizmu. Energija oslobođena u ovoj reakciji se koristi za stvaranje visokoenergetskih veza, tj. u fosforilaciji ADP-a u ATP.

U fiziološkim uslovima se oko 1% elektrona koji prolaze kroz respiratorni lanac direktno prebacuje na molekularni kiseonik i stvara superoksidni anjon koji antioksidantnim sistemima organizma biva odmah redukovan. Usled raznih patoloških procesa može doći do poremećaja u sistemu za transport elektrona u mitohondrijama koji prevazilazi mogućnosti antioksidante odbrane, što se može dramatično odraziti na produkciju slobodnih radikala (Acker *et al.* 2006).

Slobodni radikali su atomi, joni ili molekuli, koji u spoljašnjoj orbitali sadrže jedan ili više nesparenih elektrona. Veoma su reaktivni i osobina im je da izazivaju niz lančanih reakcija u kojima nastaju novi slobodni radikali, koji nastavljaju reakciju i pri tom oštećuju materiju. Ispoljavanju njihovih štetnih dejstava se suprotstavljaju enzimski i neenzimski antioksidansi. U uslovima u kojima produkcija slobodnih radikala prevazilazi kapacitet antioksidativne zaštite nastaje stanje koje se naziva *oksidativni stres* i dolazi do oštećenja brojnih molekula u ćeliji.

Lipidna peroksidacija je najizraženiji negativni fenomen delovanja slobodnih radikala. Osim lipida, može doći i do oštećenja tercijarne strukture konstitutivnih i funkcionalnih proteina što se loše odražava na njihove funkcije u organizmu. Posledice ataka slobodnih radikala na DNK su odvajanje i cepanje lanaca DNK i hidrosilacija konstitutivnih baza. Ishod može biti smrt ćelije ili mutacija (Mimić 1998).

Povećano stvaranje slobodnih radikala u mitohondrijama može uzrokovati i promene u proteinskoj strukturi enzima citohrom c oksidaze, što uslovljava smanjenje aktivnosti ovog enzima. Posledična smanjena produkcija ATP-a u ovim uslovima doprinosi daljem oksidativnom oštećenju ćelije.

Dorđe Đorović (1990), Beograd, Gočka 10, učenik 1. razreda XV beogradske gimnazije

MENTOR:
doc. dr Nataša Petronijević, Institut za biohemiju Medicinskog fakulteta u Beogradu

Zeleni čaj (*Camellia Sinensis*) se smatra odličnim izvorom polifenolnih antioksidanasa, posebno katehina. Pokazano je da zeleni čaj smanjuje gvoždem indukovanu lipidnu peroksidaciju u homogenatima tkiva mozga i kulturi atrocita (Lin *et al.* 1998). Istraživanja su pokazala da ostvaruje i određeni neuroprotektivni efekat na oštećenje mozga izazvano ishemijom/reperfuzijom. Takođe, postoje podaci iz epidemioloških studija koji ukazuju da konzumiranje zelenog čaja smanjuje rizik od nastanka srčanih oboljenja i karcinoma (Khan *et al.* 1992).

Cilj rada je da se odredi uticaj slobodnih radikala na aktivnost citohrom *c* oksidaze i da se ispituju antioksidativna svojstva zelenog čaja.

Materijal i metode

Osnovna aktivnost citohrom *c* oksidaze je određivana u neprečišćenoj mitohondrijalnoj frakciji kore mozga Wistar pacova po metodi Hess and Pope (1960). Princip metode je da citohrom *c* oksidaza u prisustvu kiseonika oksiduje ferocitohrom *c* u ferocitohrom *c*. Pad koncentracije ferocitohroma *c* je proporcionalan smanjenju ekstinkcije u toku 3-5 minuta, mereno spektrofotometrijski na 550 nm. Nakon određivanja osnovne aktivnosti citohrom *c* oksidaze, ispitivao se uticaj slobodnih radikala na njenu aktivnost. Korišćen je *free radicals generating medium* koji je u prethodnim istraživanjima pokazao da ima uticaja na aktivnost Na, K-ATP-aze u *in vitro* uslovima (Stojadinović i sar. 1996). Za izračunavanje aktivnosti ovog enzima potrebno je i poznavanje koncentracije proteina u mitohondrijama koje je rađeno po Lowry metodi.

U eksperimentu su formirane tri grupe. U prvoj grupi je u uzorcima neprečišćene mitohondrijalne frakcije mozga pacova određivana osnovna aktivnost citohrom *c* oksidaze. U drugoj grupi je aktivnost citohrom *c* oksidaze određivana nakon izlaganja neprečišćene mitohondrijalne frakcije dejstvu sistema koji indukuje stvaranje slobodnih radikala (*free radicals generating medium* – 0.1 mM FeSO₄ i 5 mM askorbinska kiselina). U trećoj grupi ispitivan je antioksidanti uticaj ekstrakta čaja: uzorcima neprečišćene mitohondrijalne frakcije pre inkubacije dodat je sistem za generisanje slobodnih radikala i 0.02 mL ekstrakta zelenog čaja. Za svaku grupu urađena su po četiri ponavljanja.

Aktivnost citohrom *c* oksidaze računata je prema formuli:

$$A [\mu\text{M cyt. C} / \text{mg prot}] =$$

$$= \frac{\Delta E_{3\text{min}} \cdot 20 \cdot 10^6}{1.96 \cdot 10^4 \cdot \gamma}$$

gde je $\Delta E_{3\text{min}}$ – promena apsorbance merena u toku tri minuta na 550 nm, $\Delta E_{3\text{min}} \cdot 20$ – promena apsorbance za 60 minuta, 10^6 – odnosi se na pre-računavanje u μM , $1.96 \cdot 10^4$ – razlika molarnih apsorpcionih koeficijenata redukovanog ($2.80 \cdot 10^4$) i oksidovanog ($0.84 \cdot 10^4$) citohroma C, γ – količina proteina u uzorku.

Ekstrakt zelenog čaja pripreman je na sledeći način: 2.0 g suvih listova zelenog čaja zagrevano je u 100 mL vode, 10 minuta na 80°C. Dobijeni ekstrakt je prvobitno propušten kroz Whatman No. 1 filter papir (Whatman International Ltd., Maidstone, Kent, UK) a zatim kroz elulozni filter promera pora 0.45 μm . Ekstrakt je upotrebljavan istog dana zbog nestabilnosti (Srichairatanakool *et al.* 2006).

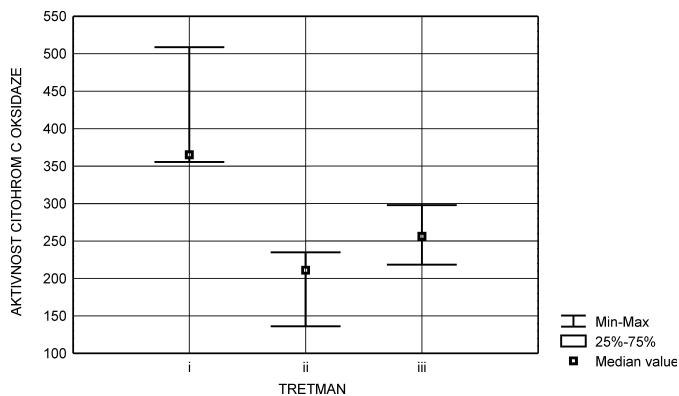
Rezultati i diskusija

Poređenjem osnovne aktivnosti citohrom *c* oksidaze i aktivnosti nakon izlaganja dejstvu slobodnih radikala, dobijeno je da sistem za generisanje slobodnih radikala u *in vitro* uslovima dovodi do izrazitog smanjenja aktivnosti citohrom *c* oksidaze (tabela 1, slika 1).

Tabela 1. Aktivnost citohrom *c* oksidaze u uzorcima neprečišćene mitohondrijalne frakcije korteksa mozga Wistar pacova: I grupa – uzorak neprečišćene mitohondrijalne frakcije; II grupa – uzorak neprečišćene mitohondrijalne frakcije izlagan dejstvu *free radicals generating medium*-a; III grupa – uzorak neprečišćene mitohondrijalne frakcije izlagan dejstvu *free radicals generating medium*-a u prisustvu zelenog čaja; izražena u $\mu\text{mol cyt. C/mg prot}$.

	I grupa	II grupa	III grupa
proba 1	508.9	235.0	297.9
proba 2	355.5	136.3	218.5
proba 3	373.4	224.0	288.0
proba 4	356.8	198.2	244.6

Dodavanjem zelenog čaja uzorku neprečišćene mitohondrijalne frakcije sa *free radicals generating medium*-om neposredno pre inkubacije, pokazan je



Slika 1.

Aktivnost citohrom *c* oksidaze u uzorcima neprečišćene mitohondrijalne frakcije kore mozga Wistar pacova: i – uzorak neprečišćene mitohondrijalne frakcije; ii – uzorak neprečišćene mitohondrijalne frakcije izlagan dejstvu *free radicals generating medium*-a; iii – uzorak neprečišćene mitohondrijalne frakcije izlagan dejstvu *free radicals generating medium*-a u prisustvu zelenog čaja

Figure 1.

Activity of cytochrome *c* oxidase in samples of unpurified mitochondrial fractions of Wistar rats' cerebral cortex:

i – sample of unpurified mitochondrial fraction; ii – sample of unpurified mitochondrial fraction influenced by the free radicals generating medium; iii – sample of unpurified mitochondrial fraction influenced by the free radicals generating medium in the presence of green tea

statistički značajan ($p = 0.05$) antioksidativni protektivni efekat u odnosu na grupu u kojoj nije bio dodat (tabela 1, slika 1). Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da je korišćeni ekstrakt zelenog čaja pokazao antioksidativna svojstva.

Zaključak

U sistemu neprečišćene mitohondrijalne frakcije mozga pacova slobodni radikali ostvaruju značajno smanjenje aktivnosti enzima citohrom *c* oksidaze. Ispitivani ekstrakti zelenog čaja pokazali su da zeleni čaj ima antioksidativna svojstva, odnosno postoji statistički značajno povećanje aktivnosti citohrom *c* oksidaze u odnosu na grupu kojoj čaj nije bio dodat.

Zahvalnost. Zahvaljujem se doc. dr Nataši Petrović koja je izvršila ekspertizu rada u idejno-problemskom i praktično-laboratorijskom domenu; Aleksandru Obradoviću na savesno vođenom mentorstvu i bezrezervnoj podršci i pomoći; Sonji Čučulanović na pomoći pri finalnom sređivanju rada. PRIZNANJE ODAJEM SEBI KOJI SAM IZGA-

RAO CELO LETO U LABORATORIJI PORED LONCA SA ZELENIM ČAJEM.

Literatura

Acker T., Fandrey J., Acker H. 2006. The good, the bad and the ugly in oxygen-sensing: ROS, cytochromes and prolyl-hydroxylases. *Cardiovasc. Res.*, **71**: 195.

Hess H. and Pope A. 1960. Intralaminar distribution of cytochrome oxidase activity in human frontal isocortex. *Journal of Neurochemistry*, **5**: 207.

Hong J. T., Ryu S. R., Kim H. J., Lee J. K., Lee S. H., Yun Y. P., Lee B. M., Kim P. Y. 2001. Protective effect of green tea extract on ischemia/r-perfusion-induced brain injury in Mongolian gerbils. *Brain Res.*, **5**: 11.

Khan G., Katiyar S. K., Agarwal R., Mukhtar H. 1992. Enhancement of antioxidant and phase II enzymes by oral feeding of green tea polyphenols in drinking water to SKH-1 hairless mice: possible role in cancer chemoprevention. *Cancer Res.*, **52**: 4050.

Lee S.Y., Lee J.W., Lee H., Yoo H. S., Yun Y. P., Oh K. W., Ha T.Y., Hong J. T. 2005. Inhibitory effect of green tea extract on

h-amyloid-induced PC12 cell death by inhibition of the activation of NF- κ B and ERK/p38 MAP kinase pathway through antioxidant mechanisms. *Molecular Brain Research*, **140**: 45.

Levites Y., Youndim M. B., Maor G., Mandel S. 2002. Attenuation of 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-induced nuclear factor- κ B cognitive (NF- κ B) activation and cell death by tea extracts in neuronal cultures. *Biochem. Pharmacol.*, **1**: 21.

Lin A. M., Chyi B. Y., Wu L. Y., Hwang L. S., Ho L.T. 1998. The antioxidative property of green tea against iron-induced oxidative stress in rat brain. *Chin. J. Physiol.*, **41**: 189.

LHEM 0363-0269 1532-432X Hemoglobin, Vol. 30, No. 02, March 2006: pp. 0–0 Hemoglobin

Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. L. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**: 265.

Srichairatanakool S., Ounjaijean S., Thephinlap C., Khansuwan U., Phisalpong C. and Fucharoen S. 2006. Iron-chelating and free-radical scavenging activities of microwave-processed green tea in iron overload. *Hemoglobin*, **30** (2): 311.

Stojadinović N. D., Petronijević M. R., Pavićević M. H., Miršulja B. B., Kostić M. M. 1996. Alteration of erythrocyte membrane Na, K-ATPase in children with borderline or essential hypertension. *Cell biochemistru and funkcion*, **14**: 79.

Dorđe Đorović

Influence of Free Radicals on Activity of Cytochrome *c* Oxidase and Protective Characteristics of Green Tea

Free radicals are atoms, molecules or ions that have unpaired electrons in the last energetic orbital. They emerge in various physiological and pathological processes and they are known by their high reactivity. They easily interact with lipids and proteins leading to changes in their structure and function. Cytochrome *c* oxidase is a participator enzyme of the respiratory chain which catalyses the transfer of electrons from cytochrome onto molecular oxygen. This reaction is highly exergonic and released energy is used for ATP synthesis. Considering that oxidative damage of enzyme cytochrome *c* oxidase can have fatal consequences by further congregating of oxidative stages and building an energetic lose, the purpose of this research was to determine the protective effect of green tea on the influence of free radicals on cytochrome *c* oxidase. The results have shown protective antioxidative effects of green tea. ☺