

OKSIDATIVNI MEHANIZMI TOKSIČNOSTI METALA

VESNA MATOVIĆ, SANJA MILOŠEVIĆ*, DANIJELA ĐUKIĆ

Institut za toksikološku hemiju, Farmaceutski fakultet u Beogradu

Kratak sadržaj

Mehanizmi toksičnosti metala su još uvek nedovoljno proučeni. Poslednjih decenija dokazano je da određeni metali indukuju i povećanu produkciju slobodnih radikala koji reaguju sa lipidima, proteinima i nukleinskim kiselinama organizma, što rezultira različitim oštećenjima, pa i smrću ćelija. Metali sa promenljivom valencom, kao što su gvožđe, bakar, hrom i dr. direktno katalizuju produkciju slobodnih radikala u reakcijama redoks-ciklusa, dok kadmijum, živa, nikl, olovo i neki drugi metali deluju indirektno tako što inhibiraju antioksidativne mehanizme organizma. U radu su izneta osnovna saznanja o slobodnim radikalima, njihovom dejstvu na organizam i antioksidativnom sistemu organizma. Posebno su obrađeni oksidativni mehanizmi kojima metali gvožđe, bakar, hrom, kadmijum, živa i olovo ostvaruju ulogu u nastanku slobodnih radikala i oksidativnog stresa, za razliku od cinka koji ima značajnu ulogu u antioksidativnoj zaštiti ćelija.

Ključne reči: slobodni radikali, metali, oksidativni stres.

* Autor diplomskog rada »Uticaj toksičnih metala na oksidativni stres« urađen u Institutu za toksikološku hemiju Farmaceutskog fakulteta u Beogradu

Uvod

Metali su jedni od „najstarijih“ otrova, a od drugih toksičnih supstanci se razlikuju po tome što ih čovek nije niti stvorio niti može da ih uništi. Štetni efekti olova, arsena, žive i nekih drugih metala opisani su još p.n.e., a do danas je napisano nebrojeno mnogo radova na ovu temu. Toksični metali prvenstveno oštećuju jetru, bubrege, pluća, skeletni i nervni sistem. Specifične razlike u toksičnosti metalnih jona su rezultat različite rastvorljivosti, apsorpcije, distribucije, hemijske reaktivnosti i kompleksa koje grade u organizmu, kao i interakcije sa bioelementima. Međutim, mehanizmi toksičnosti metala su nedovoljno poznati, te se samo delimično može objasniti njihovo kompleksno delovanje na organizam. Poznavanje i razumevanje mehanizama toksičnosti ima fundamentalni, teorijski, ali i praktični značaj. Teorijski značaj se ogleda u potpunijem upoznavanju fizioloških i biohemijskih procesa, kao i patoloških stanja organizma. U praksi, ova saznanja obezbeđuju osnovu za interpretaciju rezultata testova toksičnosti, i od posebnog su značaja za profilaksu i terapiju trovanja.

Poslednjih decenija je ukazano na uticaj metala na nastanak slobodnih radikala koji izazivaju oštećenja lipida, proteina i nukleinskih kiselina, čime se može objasniti i njihov efekat na smrt ćelije i citotoksičnost (1,2,3). U cilju objašnjenja mehanizama toksičnosti metala, u radu su dati osnovni podaci o slobodnim radikalima i antioksidativnoj zaštiti organizma, i podaci o uticaju određenih metala na nastanak oksidativnog stresa.

Slobodni radikali i antioksidativni sistem

„Aerobni način života nudi mnoge prednosti, ali je ispunjen opasnostima” (Irvin Fridovich)

Osim onih koji su prilagođeni životu u anaerobnim uslovima, svi organizmi koriste kiseonik za efikasnu proizvodnju energije. Međutim, odavno je poznato da povećane koncentracije kiseonika izazivaju toksične efekte, koji su prvenstveno objašnjavani inhibicijom celularnih enzima. Već 1954. godine R. Gershman i D.L. Gilbert (SAD) su zaključili da se većina štetnih efekata kiseonika može pripisati stvaranju slobodnih kiseoničnih radikala (4).

Reaktivne vrste kiseonika (engl. reactive oxygen species - ROS) su produkti fizioloških procesa u ćelijama, od kojih je najznačajniji proces

transporta elektrona u mitohondrijama (oksidativna fosforilacija). Smatra se da oko 90% ukupno unetog kiseonika kod sisara dospeva u mitohondrije, u kojima se odvija redukcija O_2 do H_2O , pri čemu se oslobađa energija neophodna za održavanje različitih fizioloških procesa (5,6) a da je oko 2% kiseonika odgovorno za nastanak slobodnih radikala. Superoksidni anjonski radikal - $O_2^{\cdot -}$ nastaje jednoelektronskom redukcijom O_2 , dok vodonik peroksid - H_2O_2 , nastao dvoelektronskom redukcijom O_2 , homolitičkim kidanjem slabe kovalentne veze HO – OH generiše najreaktivniji ROS, hidroksilni radikal HO^{\cdot} , koji se može generisati i troelektronskom redukcijom O_2 .

Iako su derivati kiseonika najvažniji slobodni radikali u biološkom sistemu, i druge reaktivne forme sa azotom, ugljenikom i sumporom mogu da posreduju u nastanku i razvoju procesa oksidativnog oštećenja ćelije (7).

Slobodni radikali reaguju sa raznim biomolekulima: lipidima (nezasićene masne kiseline, fosfolipidi membrane), proteinima (enzimski, strukturni, receptorski) i nukleinskim kiselinama izazivajući strukturne i funkcionalne promene biomolekula. Oštećenje biomolekula remeti funkciju ćelije, jonsku homeostazu i aktivnost ključnih enzima metabolizma (8), a može dovesti i do smrti ćelije usled nekroze i apoptoze ili usloviti neoplastičnu transformaciju.

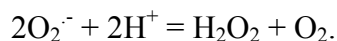
Glavnu ulogu u zaštiti ćelije od oštećenja koja izazivaju slobodni radikali ima antioksidativni sistem.

Prema Halliwell-u glavni kriterijum po kome neko jedinjenje pripada antioksidativnom sistemu je mogućnost da u malim koncentracijama, u poređenju sa supstratom koji se oksidiše, značajno odloži ili spreči njegovu oksidaciju (7).

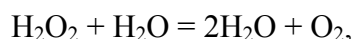
Antioksidativni sistem kod ljudi objedinjuje više nivoa zaštite koji se mogu podeliti na:

1. *primarne* - enzimske (superoksid dizmutaza, katalaza, glutathion peroksidaza, glutathion reduktaza, glutathion-S-transferaza) i neenzimske komponente (glutathion, vitamin C, vitamin E, β -karoten, koenzim Q).
2. *sekundarne* - protein - specifične oksidoreduktaze (tiol-transferaza, protein-ADP-ribozil-transferaza i ATP i Ca^{2+} -nezavisna transferaza) (6,9).

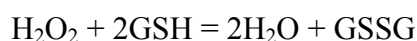
Primarni antioksidansi sprečavaju stvaranje kiseoničnih radikala i predstavljaju prvu liniju odbrane ćelija od oksidativnog stresa. Posebno su značajni tzv. antioksidativni enzimi. Superoksid dismutaza (SOD) ubrzava dismutaciju superoksidnog anjona:



Katalaza katalizuje razgradnju nastalog H_2O_2 :



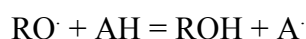
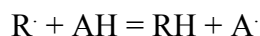
dok glutation peroksidaza redukuje H_2O_2 i reaktivne hidroperokside masnih kiselina:



Glutation reduktaza učestvuje u transformaciji oksidovanog glutationa (GSSG) u redukovani, aktivni oblik (GSH), a glutation-S-transferaza katališe reakciju konjugacije GSH sa slobodnim radikalima, što rezultuje njihovom inaktivacijom.

Sekundarni antioksidansi uglavnom deluju tako što uklanjaju već stvorene slobodne radikale, služe kao donori elektrona, razgrađuju lipidne perokside nastale u procesu LP-e, inhibišu neke enzime i deluju sinergistički sa drugim antioksidansima.

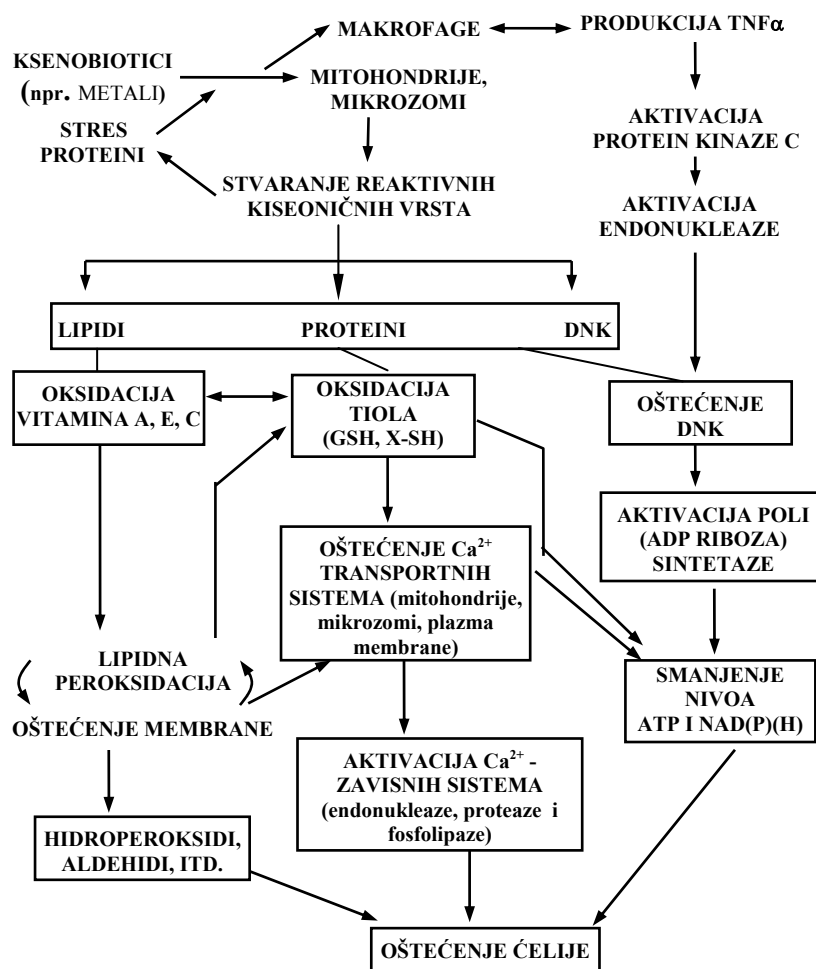
Većina antioksidanasa deluje tako što u pojedinim fazama prekida lančane slobodno-radikalske reakcije. Interakcija nekog antioksidansa (AH) sa slobodnim radikalima ($\text{R}\cdot$ ili $\text{RO}\cdot$) može se predstaviti na sledeći način:



U normalnim fiziološkim uslovima, aerobni način života karakteriše ravnoteža prooksidanata i antioksidanata. Kada dođe do poremećaja u ravnoteži prooksidanata naspram antioksidanata u korist prooksidanata, nastupa poremećaj poznat kao oksidativni stres koji može izazvati različita oštećenja ćelije (3).

Brojna patofiziološka stanja mogu biti uzročnici povećanog nastanka slobodnih radikala i oksidativnog stresa, uključujući posledice nuklearnog i UV zračenja, ali i izloženost brojnim egzogenim supstancama kao što su rastvarači, pesticidi i metali (2).

Na Slici 1. je dat prikaz nastanka slobodnih radikala, kao i njihove interakcije sa ćelijskim molekulama koje pokreću čitav niz procesa koji vode do oštećenja ćelija.



Slika 1. Sumarni prikaz nastanka slobodnih radikala i oštećenja ćelija uzrokovanih metalnim jonima

Figure 1. Summary of free radical production and tissue damage by metal ions

Uloga metalnih jona u nastanku slobodnih radikala

Gvožđe (Fe)

U okviru problematike ispitivanja uloge metala u nastanku oksidativnog stresa, gvožđe je sigurno jedan od najviše istraživanih jona. Na ulogu gvožđa u inicijaciji lipidne peroksidacije (LP) ukazali su Aust, Minotti, Alleman i Ryan sa sar. (10,11,12,13,14) i dokazali da katalitički aktivno gvožđe katalizuje redoks reakcije između kiseonika i bioloških makromolekula.

Ispitivanja Halliwell-a, Gutteridge-a, Imlay-a i saradnika, (15,16,17) iz osamdesetih godina, ukazuju da helatizovano gvožđe deluje kao katalizator Fentonove reakcije, olakšavajući konverziju superoksid anjona i vodonik peroksida u hidroksil radikal, koji je najznačajniji inicijator LP-e.

Fentonova reakcija:



I pored sumnji da se Fentonova reakcija može odvijati *in vivo* i sugestija da je proizvod Fentonove reakcije feril (gvožđe-kiseonik kompleks), većina dokaza podržava teoriju nastanka hidroksil radikala u Fentonovoj reakciji (17).

Da bi gvožđe ispoljilo efekat u nastanku ROS neophodno je da bude u slobodnom ili katalitički aktivnom obliku. Na to ukazuju i ispitivanja nasledne hemohromatoze i raznih oblika sekundarne hemohromatoze za koje je dokazano da izazivaju cirozu jetre kao rezultat povećane apsorpcije gvožđa iz hrane (18).

Ima podataka i da brojni ksenobiotici, kao što su veoma toksični parakvat i dikvat, nitrofurantoin itd., mogu da dovedu do oslobađanja gvožđa iz njegovog glavnog depo proteina – feritina ili transferina krvi, što vodi povećanom stvaranju slobodnih radikala (19,20). U okviru ispitivanja interakcija gvožđa i drugih toksičnih supstanci neophodno je istaći ulogu gvožđa u nastanku mikrozomalne LP-e dejstvom 2,3,7,8-tetrahlrodibenzo-p-dioksina (TCDD) – izuzetno potentnog karcinogena (21), kao i ispitivanja japanskih naučnika koji su, ispitujući karcinogenost

nitrilotriacetata, dokazali da helat gvožđa sa nitrilotriacetatom inicira lipidnu peroksidaciju, nekrozu tkiva i renalni kancer (22,23).

Literaturni podaci ukazuju da gvožđe potencira i toksičnost etanola. Stal i Hulterantz (24) su ispitali ulogu gvožđa u hepatocelularnim oštećenjima izazvanim etanolom i, ogledima na pacovima, dobili biohemijske i morfološke dokaze povećanog hepatocelularnog oštećenja pri istovremenom davanju gvožđa i etanola. Povećanje toksičnosti etanola se može objasniti povećanom produkcijom redukujućeg agensa nikotinamid adenin dinukleotida (NADH), koji je kofaktor u generisanju hidroksil radikala ovisnom o gvožđu, kao i činjenicom da NADH olakšava mobilizaciju gvožđa iz feritina.

Brojne studije su vršene i u ispitivanju uloge aluminijuma i gvožđa u Alchajmerovoj bolesti. Pretpostavka je da aluminijum indukuje neurotoksičnost indirektno putem gvožđa koje izaziva promenu strukture membranskih lipida i olakšava lipidnu peroksidaciju (25), a ima indikacija i da se aluminijum može vezati za feritin mozga čime se povećava nivo katalitički aktivnog gvožđa (26).

Uloga gvožđa u toksičnosti raznih ksenobiotika je *in vitro* ispitivana i korišćenjem deferoksamina (DFX), efikasnog helatnog agensa za Fe³⁺ (27). Ima dokaza da DFX, helirajući gvožđe, deluje kao antioksidans koji prekida lanac LP-e (28), pri čemu se enzimski oksidiše u nitroksid slobodni radikal (29).

Bakar (Cu)

Slično gvožđu, bakar deluje kao katalizator u formiranju ROS-a i katalizuje peroksidaciju membranskih lipida (30).

Cu⁺ jon učestvuje u Fentonovoj reakciji kao katalizator homolitičkog kidanja H₂O₂, pri čemu nastaje hidroksil radikal-najreaktivniji oksidans u biološkom sistemu:



O ulozi bakra u nastanku slobodnih radikala govore ispitivanja njegove uloge u oksidaciji hidrohina u benzohinon (31). Dokazano je da bakar dodat primarnim stromalnim ćelijama koštane srži znatno

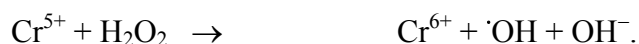
povećava citotoksičnost izazvanu hidrohinsonom i da je taj efekat doznno zavisian. Glutation i ditiotreitol, kroz svoja dejstva kao antioksidanasa i/ili metal-helatizujućih agenasa, sprečavaju povećanje citotoksičnosti hidrohinsona izazvano bakrom, dok katalaza u tom slučaju nije pokazala efikasnost. Dalja ispitivanja su pokazala da bakar izrazito povećava raskidanje DNK veza izazvano hidrohinsonom, za razliku od drugih metalnih jona, poput Fe^{3+} , Mn^{2+} , Cd^{2+} i Zn^{2+} , koji nisu indukovali značajno povećanje oksidacije hidrohinsona ili raskidanje DNK veza (32). Rezultati ovih ispitivanja ukazuju na značaj bakra u generisanju ROS-a, što predstavlja prilog objašnjenju citotoksičnosti i oštećenja DNK u ciljnim ćelijama pod uticajem hidrohinsona.

Milne i saradnici su ispitili efekte glutaciona i drugih helatnih agenasa na DNK oksidaciju posredovanu bakrom i dokazali da glutacion ostvaruje zaštitni efekat tako što sprečava oksidaciju Cu^+ jona, sprečava ciklus redoks reakcija i generisanje slobodnih radikala (33).

Hrom (Cr)

Dosadašnji rezultati sugerišu da su Cr^{6+} i Cr^{3+} biološki aktivna oksidaciona stanja hroma koja su uključena u ciklus redoks reakcija u kojima nastaju ROS.

Redukcijom Cr^{6+} (toksikološki najznačajnijeg valentnog stanja hroma) pomoću glutacion reduktaze u prisustvu NADPH formiraju se dugoživeći Cr^{5+} joni koji zatim reaguju sa H_2O_2 . U ovoj reakciji, sličnoj Fentonovoj, nastaju hidroksil radikali, čime bi se mogla objasniti i citotoksičnost Cr^{6+} (34). Iako se ranije tvrdilo da je Cr^{5+} konačna karcinogena forma hroma, Kawanishi i saradnici su, na osnovu svojih eksperimentalnih studija, pokazali da Cr^{5+} nije sam po sebi karcinogen, već da su nosioci dejstva najverovatnije kiseonične reaktivne vrste poput superoksid anjona, „singlet” kiseonika i hidroksil radikala koji nastaju dekompozicijom $\text{Cr(V)(O}_2)_4^{3-}$ (35):



Donedavno se smatralo da je Cr^{3+} relativno netoksičan. Ipak, dokazano je da Cr^{3+} (prvenstveno značajan kao bioelement) može biti

redukovan do Cr^{2+} pomoću bioloških reduktanata, npr. L-cisteina u prisustvu NADH. Novoformirani Cr^{2+} reaguje sa vodonik peroksidom dajući hidroksil radikale (36):



Rezultati ispitivanja ukazuju da je Cr^{3+} u stanju da produkuje slobodne radikale i iz lipidnih peroksida i da generisanje tih radikala može biti od značaja za objašnjenje mehanizama karcinogenosti hroma (37), a Sugden i saradnici su dali pretpostavku da mehanizam mutagenosti Cr^{3+} kompleksa uključuje kiseonične radikale kao aktivne posrednike (38).

Vršena su i ispitivanja uloge fizioloških antioksidanasa u ćelijskim oštećenjima indukovanim hromom(VI). Razmatrani su efekti »scavenger-a« kiseonika, GSH, vitamina B_2 , vitamina E i vitamina C na oštećenja indukovana hromatima, uključujući oštećenja DNK, LP-u, enzimsku inhibiciju, citotoksičnost i mutagenezu (39). Zapaženo je da vitamin E smanjuje citotoksičnost izazvanu hromatima, kao i LP-u i DNK oštećenja, dok vitamin B_2 nije pokazao te efekte (40).

Kadmijum (Cd)

U okviru ispitivanja uticaja toksičnosti kadmijuma na hepatocite pacova, Muller je 1986. godine izneo zapažanje da kadmijum izaziva poremećaj normalne funkcije mitohondrija i da dovodi do povećanja LP-e u tkivima (41).

Do indukcije nastanka slobodnih radikala dolazi brzo po izlaganju ovom metalu. Pri akutnom trovanju kadmijumom dokazano je povećanje LP-e, naročito u plućima, mozgu i jetri (42), kao i u krvi već posle nekoliko sati od intoksikacije (43). Ozbiljna hemoragična oštećenja testisa uočena su već 12 h po davanju jednokratne, karcinogene doze kadmijuma (44). Mehanizam nastanka slobodnih radikala dejstvom jednokratnih, visokih doza kadmijuma je teško objasniti obzirom da je metal koji ne može učestvovati u redoks reakcijama. Pretpostavka je da kadmijum ispoljava svoje dejstvo indirektno, bilo inhibicijom

antioksidativnog sistema (45,46,47) ili kao rezultat interakcije sa gvožđem (44).

Dalja istraživanja su ukazala na doznu zavisnost efekta kadmijuma na nastanak oksidativnog stresa, kao i na značaj dužine ekspozicije ovom izuzetno toksičnom metalu (48,49). U ogledima vršenim na kulturama fibroblasta kineskog hrčka koje su izlagane različitim koncentracijama kadmijuma, zapaženo je da su vremenom neke ćelije razvile otpornost na kadmijum, a posredno, i otpornost na oksidativni stres. Pojava ove otpornosti može se objasniti paralelnim povećanjem sadržaja glutaciona, koji deluje kao antioksidans i kao metal-helatizujući agens, pa gradi helate sa kadmijumom i drugim metalima čije je premeštanje izazvano kadmijumom (50).

Različiti efekti kadmijuma pri akutnom i hroničnom trovanju se mogu objasniti činjenicom da pri visokim koncentracijama kadmijuma dolazi do deplecije glutaciona, jer je generacija ROS-a suviše brza u odnosu na regeneraciju glutaciona u redukovanom obliku, dok je pri nižim dozama antioksidativni sistem, posebno glutation, u stanju da »obavi« svoju zaštitnu ulogu (45).

Poznato je da kadmijum izaziva morfološke kao i funkcionalne poremećaje testisa, što može rezultirati i karcinogenezom. Novija istraživanja ukazuju na vezu kadmijuma i nivoa LP-e, sadržaja gvožđa, ćelijske produkcije H_2O_2 (značajno povećanim u testikularnim Leydigovim ćelijama) (51). Važnu ulogu u inicijaciji karcinogeneze izazvane kadmijumom imaju povećanje LP-e, porast nivoa gvožđa i celularna produkcija vodonik peroksida. Do povećanja nivoa gvožđa dolazi usled premeštanja gvožđa sa mesta vezivanja, a to rezultuje stimulacijom LP-e posredovane ovim metalom. Pored toga, zapaženo je povećanje aktivnosti glutation peroksidaze, i smanjenje aktivnosti glutation reduktaze i katalaze (44).

Mnogi hemijski i fizički agensi, izazivači oksidativnog stresa, povećavaju i sintezu grupe proteina koji su nazvani stres ili proteini toplotnog šoka, a za koje se smatra da predstavljaju odbrambeni mehanizam organizma. Goering i saradnici su ispitivali sintezu stres proteina pod uticajem kadmijuma i došli su do zaključka da kadmijum izaziva povećanu sintezu stres proteina pre vidljivog oštećenja jetre.

Takođe su zapazili da se povećana sinteza stres proteina javlja kao kompenzatorni odgovor organizma u ciljnim tkivima, poput jetre, a nema dokaza o povećanju sinteze ovih proteina u bubrezima, niti su zapažena oštećenja ovog organa (52).

Živa (Hg)

Neorganska jedinjenja žive izazivaju smanjenje nivoa slobodnih sulfhidrilnih grupa i tako indukuju pojavu oksidativnog stresa (53) što rezultuje oštećenjem tkiva, posebno bubrega, koji je i ciljni organ toksičnog dejstva jona žive. Ima dokaza da u bubrežnim tubulima živin jon izaziva smanjenje nivoa glutaciona i redukciju aktivnosti superoksid dizmutaze, katalaze i glutation peroksidaze, enzima odgovornih za zaštitu ćelija od štetnog dejstva superoksid anjona i vodonik peroksida. Ispitivanja na pacovima su pokazala da živin jon indukuje LP-u i izaziva smanjenje sadržaja vitamina C i E u bubrezima već 12 h po davanju žive (54). U istom radu, autori ukazuju na protektivan efekat cinka: u bubrezima pacova prethodno tretiranih cinkom dolazi do smanjenja lipidne peroksidacije i povećanja sadržaja glutaciona. Lund i sar. (55) su takođe dokazali da HgCl_2 (1,25 ili 2,25 mg/kg) indukuje povećanje produkcije vodonik peroksida i lipidne peroksidacije u mitohondrijama bubrega pacova, smanjenje glutaciona, ali i da izaziva promenu homeostaze mitohondrijalnog kalcijuma. Sve ove promene koje izaziva jon žive (Hg^{2+}) dovode do promena integriteta membrana ćelija tubula, što rezultira oštećenjem bubrega. Nefrotoksičnost žive se, dakle, može objasniti nastankom reaktivnih vrsta kiseonika, kao i poremećenom funkcijom antioksidativnih odbrambenih mehanizama organizma.

Za organska jedinjenja žive, od kojih je metil-živa od posebnog značaja sa aspekta ekotoksikologije, karakteristično je oštećenje nervnog sistema. Većina autora objašnjava neurotoksičnost organskih jedinjenja žive njihovom interakcijom sa gvožđem i drugim metalima koji katalizuju produkciju slobodnih radikala (56,57,58,59). Nerazjašnjen je uticaj organskih, ali i neorganskih jedinjenja žive na homeostazu kalcijuma i eventualnu ulogu kalcijuma u nastanku oksidativnog stresa (60,61,62).

Olovo (Pb)

U okviru ispitivanja mehanizama toksičnosti olova, kao uzročnika profesionalnih trovanja, a uz živu i kadmijum, i najznačajnijeg zagađivača čovekove sredine, brojna istraživanja ukazuju da olovo može indukovati i nastanak slobodnih radikala (63,64,65).

Neurološki efekti trietilolova se mogu objasniti povećanom lipidnom peroksidacijom u mozgu pacova (66,67,68). Rezultati ovih istraživanja ukazuju da i niska doza olova (1,75 mg/kg) već posle pet dana izaziva značajno povećanje lipidne peroksidacije u frontalnom korteksu mozga pacova, iako u membranama hipokampusa i cerebeluma nisu zapažene ove promene.

Ima podataka da olovo izaziva oštećenja i drugih ćelija oksidativnom modifikacijom lipida (64,65). Kao odgovor na povećano unošenje olova, konstatovan je porast nivoa peroksida u hepatičkim mikrozomalnim membranama i arahidonske kiseline (64), a Ramstoeck i sar. (65) su, takođe *in vivo* ispitivanjima, dokazali da vitamin E može redukovati lipidnu peroksidaciju izazvanu olovom.

Može se zaključiti da se toksični efekti olova, metala koji ne spada u prelaznu grupu, bar delimično mogu objasniti mehanizmom nastanka slobodnih radikala. Sa druge strane, teško je objasniti činjenicu da olovo, slično kadmijumu koji je prelazni metal, dovodi do povećanja glutaciona (kao jednog od oksidativnih sistema odbrane) u tkivima kao što su jetra, bubrezi i eritrociti (1).

Cink (Zn)

Za razliku od većine metala, koji favorizuju nastanak oksidativnog stresa, smatra se da cink deluje kao stabilizator membrana, da ima značajnu ulogu u antioksidativnoj zaštiti i inhibiciji oksidativnog stresa, o čemu govore i brojne studije:

- nedostatak cinka u ishrani povećava osetljivost hepatičkih mikrozoma na lipidnu peroksidaciju (69);
- deficit cinka izaziva otpuštanje vodonik peroksida iz citohrom P₄₅₀ enzimskog sistema ovisnog o NADPH (70) i narušavanje funkcije citohroma P₄₅₀ u mikrozomima jetre kroz mehanizam koji uključuje posredovanje slobodnih radikala (71).

- posledica nedostatka cinka je fragmentacija DNK. Cink reguliše fragmentaciju DNK kroz direktan mehanizam i kroz mehanizam koji uključuje endonukleazu, koja može biti inaktivirana cinkom, verovatno kompeticijom sa kalcijumom (72). Interakcijom cinka sa bakrom i gvoždem se takođe može objasniti zaštitni efekat ovog bioelementa na DNK (73).

Rezultati mnogih ispitivanja sugerišu da ovaj metal sprečava formiranje ROS-a, što se može objasniti njegovom protektivnom ulogom u sprečavanju oksidacije sulfhidrilnih grupa (74) i zamenom redoks metala, drugim rečima interakcijom cinka sa metalima - uzročnicima oksidativnog stresa.

Zaključak

U cilju objašnjenja mehanizama toksičnosti metala, u radu su iznete osnovne postavke o uticaju nekih metala na nastanak slobodnih radikala. Ispitivanja iz ove oblasti su pokazala složenost oksidativnih mehanizama kojima metali, poput gvožđa, bakra, hroma, kadmijuma, žive i olova, ostvaruju svoju ulogu u nastanku i razvoju procesa oksidativnog stresa. Oksidativna oštećenja lipida, proteina i DNK nastaju kao rezultat povećane produkcije slobodnih radikala i/ili usled inhibitornog uticaja metala na antioksidativne odbrambene mehanizme organizma. Metali sa promenljivom valencom, kao što su gvožđe, bakar i hrom katalizuju stvaranje superoksid anjon radikala i hidroksilnog radikala, a gvožđe i bakar su značajni ko-faktori u Fentonovoj reakciji. Neki metali, kao što je kadmijum, izazivaju povećanje sadržaja gvožđa u tkivima i time indirektno indukuju nastanak slobodnih radikala. Znatan broj metala, poput kadmijuma, žive i olova, izazivaju oksidativna oštećenja inhibicijom enzimskih i neenzimskih komponenti antioksidativne zaštite, posebno glutaciona, glutation reduktaze i katalaze, i superoksid dizmutaze, dok živa smanjuje i nivoe askorbata i tokoferola u organizmu. Za razliku od navedenih metala povećano unošenje cinka čak ima protektivnu ulogu u nastanku oksidativnog stresa indukovano određenim metalima. To ukazuje na činjenicu da interakcije metala u organizmu mogu biti od posebnog značaja za objašnjenje celularnih i

molekularnih mehanizama toksičnosti metala, koji mogu dovesti do različitih oštećenja ćelija u organizmu usled nastanka slobodnih radikala.

Naša prethodna ispitivanja su pokazala da povećano unošenje magnezijuma ima terapijski i profilaktički efekat u uslovima hroničnog trovanja olovom, a ukazuju i na antagonizam drugih toksičnih metala i magnezijuma (75,76,77,78,79). Ostaje da se ustanovi da li magnezijum opisana dejstva ostvaruje i zaštitom ćelija od oksidativnog stresa izazvnog toksičnim metalima.

Zahvalnica

Ovaj rad je delimično finansiran sredstvima sa projekta br. 1432 Ministarstva za nauku, tehnologiju i razvoj Republike Srbije.

OXIDATIVE MECHANISMS IN METAL TOXICITY

VESNA MATOVIĆ, SANJA MILOŠEVIĆ*, DANIJELA ĐUKIĆ

Institute of Toxicological Chemistry, Faculty of Pharmacy, Belgrade

Summary

Mechanisms of metal toxicity have not been fully understood. It was proven in the last decades that certain metals induce increased generation of free radicals, which react lipids, proteins and nucleic acids in the organism, inducing tissue-damaging effects and cell death. Metals such as iron, copper, chromium, etc. undergo redox cycling and directly catalyze production of free radicals, while mercury, nickel, lead and some others act indirectly by inhibition of antioxidative mechanisms. This paper presents basic understanding of free radicals, their influence on the organism and antioxidative system. Particular attention is given to oxidative mechanisms in which iron, copper, chromium, mercury and lead play role in generation of free radicals and oxidative stress, contrary to zinc which has a significant role in antioxidative cell protection.

Key words: free radicals, metals, oxidative stress.

* Author of the final examination »Influence of toxic metals on oxidative stress« done in the Institute of Toxicological Chemistry, Faculty of Pharmacy, Belgrade

Literatura

1. Stohs SJ, Bagchi D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic Biol Med* 1995; 18 (3): 321-6.
2. Kass GEN. Free-Radical-Induced Changes in Cell Signal Transduction. In: Wallace KB. ed. *Free Radical Toxicology*. Taylor & Francis, 1997: 349-59.
3. Kang YJ, Enger MD. Cellular and molecular mechanism of metal toxicities. In: Massaro EJ. ed. *Human Toxicology*. NewYork: CRC Press, 1997: 256-75.
4. Halliwell B, Gutteridge JMC. Oxygen is poisonous - an introduction to oxygen toxicity and free radicals. In: Halliwell B, Gutteridge JMC. ed. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford: Clarendon press, 1985: 1-18.
5. Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolisam in mammalian organs. *Physiol Rev* 1979; 59: 527-605.
6. Cadenas E. Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu Rev Biochem* 1989; 58: 79-110.
7. Halliwell B. Free radicals, antioxidants and human diseases: Curiosity, cause or consequence? *Lancet* 1994; 344: 721-724.
8. Yasuda H, Shimada O, Nakajima A, Asano T. Cerebral protective effects and radical scavenging action. *J Neurochem* 1981; 37 (4): 934-7.
9. Brigelius R. Mixes disulfides: biologicaly functione and increase in oxidative stress, In: *Oxidative stress*, ed. (H. Sies), Academic Press, New York 1985: 243-71.
10. Minotti G, Aust SD. The role of iron in radical mediated lipid peroxidation. *Chem Biol Interact* 1989; 71: 1-19.
11. Aust SD. Metal ions, oxygen radicals and tissue damage. *Bibl Nutr Dieta* 1989; 43: 266-77.
12. Minotti G, Aust SD. The role of iron in the initiation of lipid peroxidation. *Chem Phys Lipids* 1987; 44: 191-208.
13. Alleman MA, Koster JF, Wilson JHP, Edixhoven-Bosdijk A, Slee RG, Kross M et al. The involvement or iron and lipid peroxidation in the pathogenesis of HCB-induced porphyria. *Biochem Pharmacol* 1985; 34: 161-6.
14. Ryan TP, Aust SD. The role of iron in oxygen-mediated toxicities. *Crit Rev Toxicol* 1992; 22: 119-41.
15. Imlay JA, Chin SM, Linn S. Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction in vivo ind in vitro. *Science* 1988; 240: 640-2.
16. Halliwell B, Gutteridge JMC. Iron and free radicals reactions: Two aspects of antioxidant protection. *Trends Biochem Sci* 1986; 11: 372-5.
17. Halliwell B, Gutteridge JMC. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. *Meth Enzymol* 1990; 186: 1-85.
18. Bacon BR, Barton RS. Hepatic injury in chronic iron overload. Role of lipid peroxidation. *Chem Biol Interact* 1989; 70: 183-226.

19. Puntarulo S, Cederbaum AI. Interactions between paraquat and ferric complexes in the microsomal generation of oxygen radicals. *Biochem Pharmacol* 1989; 38: 2911-8.
20. Burkitt MJ, Kadiiska MB, Hanna PM, Jordan SJ, Mason RP. Electron spin resonance spin-trapping investigation into the effects of paraquat and desferrioxamine on hydroxyl radical generation during acute iron poisoning. *Mol Pharmacol* 1993; 43: 257-63.
21. Al-Bayati ZAF, Stohs SJ. The role of iron in 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-induced lipid peroxidation in rat liver microsomes. *Toxicol Lett* 1987; 38: 115-21.
22. Toyokuni S, Sagripanti JL. DNA single - and double-strand breaks produced by ferric nitrilotriacetate in relation to renal tubular carcinogenesis. *Carcinogenesis* 1993; 14: 223-7.
23. Okada S, Minamiyama Y, Hamazaki S, Toyokuni S, Sotomatsu A. Glutathione cycle dependency of ferric nitrilotriacetate-induced lipid peroxidation in mouse proximal renal tubules. *Arch Biochem Biophys* 1993; 301: 138-42.
24. Stal P, Hulcrantz R. Iron increases ethanol toxicity in rat liver. *J Hepatol* 1993; 17: 108-15.
25. Gutteridge JMC, Quilan GJ, Clarke I, Halliwell B. Aluminium salts accelerate peroxidation of membrane lipids stimulated by iron salts. *Biochem Biophys Acta* 1985; 835: 441-7.
26. Johnston HB, Thomas SM, Atterwill CK. Aluminium and iron induced metabolic changes in neuroblastoma cell lines and rat primary neural cultures. *Toxic In Vitro* 1993; 7: 229-33.
27. Rosenthal RE, Chanderbhan R, Marshall G, Fiskum G. Prevention of postischemic brain lipid conjugated diene production and neurological injury by hydroxyethyl starch-conjugated deferoxamine. *Free Radic Biol Med* 1992; 12: 29-33.
28. Hartley A, Davies M, Rice-Evans C. Desferrioxamine as a lipid chain-breaking antioxidant in sickle erythrocyte membranes. *FEBS Lett* 1990; 264: 145-8.
29. Morehouse KM, Flitter WD, Mason RP. The enzymatic oxidation of desferal to a nitroxide free radical. *FEBS Lett* 1987; 222: 246-50.
30. Chan PC, Peller OG, Kesner L. Copper(II)-catalyzed lipid peroxidation in liposomes and erythrocyte membrane. *Lipids* 1982; 17: 331-7.
31. Li Y, Trush MA. Oxidation of hydroquinone by copper: Chemical mechanism and biological effects. *Arch Biochem Biophys* 1993a; 300: 346-55.
32. Li Y, Trush MA. DNA damage resulting from the oxidation of hydroquinone by copper. Role for a Cu(II)/Cu(I) redox, cycle and reactive oxygen generation. *Carcinogenesis* 1993b; 7: 1303-11.
33. Milne L, Nicotera P, Orrenius S, Burkitt MJ. Effects of glutathione and chelating agents on copper-mediated DNA oxidation: Pro-oxidant and antioxidant properties of glutathione. *Arch Biochem Biophys* 1993; 304: 102-9.

34. Shi X, Dalal NS. Chromium(V) and hydroxyl radical formation during the glutathione reductase-catalyzed reduction of chromium(VI). *Bochem Bophys Res Commun* 1989; 163: 627-34.
35. Kawanishi S, Inoue S, Sano S. Mechanism of DNA cleavage induced by sodium chromate(VI) in the presence of hydrogen peroxide. *J Biol Chem* 1986; 261: 5952-8.
36. Ozawa T, Hanaki A. Spin-trapping studies on the reactions of Cr(III) with hydrogen peroxide in the presence of biological reductants: Is Cr(III) nontoxic? *Biochem Int* 1990; 22: 343-52.
37. Shi X, Dalal NS, Kasprzak KS. Generation of free radicals from hydrogen peroxide and lipid hydroperoxides in the presence of Cr(III). *Arch Biochem Biophys* 1993; 302: 294-9.
38. Sugden KD, Geer RD, Rogers SJ. Oxygen radical-mediated DNA damage by redox-active Cr(III) complexes. *Biochemistry* 1992; 31: 11620-31.
39. Sugiyama M. Role of physiological antioxidants in chromium(VI)-induced cellular injury. *Free Radic Biol Med* 1992; 12: 397-407.
40. Sugiyama M. Effects of vitamins on chromium(VI)-induced damage. *Environ Health Perspect* 1991; 92: 63-70.
41. Muller L. Consequences of cadmium toxicity in rat hepatocytes: Mitochondrial dysfunction and lipid peroxidation. *Toxicology* 1986; 40: 285-92.
42. Manca D, Ricard AC, Trottier B, Chevalier G. Studies on lipid peroxidation in rat tissues following administration of low and moderate doses of cadmium chloride. *Toxicology* 1991; 67: 303-23.
43. Matović V, Černak I, Plećaš B, Stojanović Z. Acute cadmium intoxication and oxidative stress in rabbit plasma. *Jugoslav Med Biochem* 1998; 17 (3): 326-7.
44. Koizumi T, Li ZG. Role of oxidative stress in single-dose, cadmium-induced testicular cancer. *J Toxicol Environ Health* 1992; 37: 25-36.
45. Chin TA, Templeton DM. Protective elevations of glutathione and metallothionein in cadmium-exposed mesangial cells. *Toxicology* 1993; 77: 145-56.
46. Shukla GS, Chandra SV. Cadmium toxicity and bioantioxidants: status of vitamin E and ascorbic acid of selected organs in rat. *J Appl Toxicol* 1989; 9: 119-22.
47. Shukla GS, Hussain T, Srivastava RS, Chandra SV. Glutathion peroxidase and catalase in liver, kidney, testis and brain regions of rats following cadmium exposure and subsequent withdrawal. *Ind Health* 1989; 27 (2): 59-69.
48. Karmakar R, Chatterjee M. Cadmium-induced time-dependent oxidative stress in liver of mice: a correlation with kidney. *Environ Toxicol Pharmacol* 1998; 6: 201-7
49. Nigam D, Shukla GS, Agarwal AK. Glutathione depletion and oxidative damage in mitochondria following exposure to cadmium in rat liver and kidney. *Toxicol Lett* 1999; 106: 151-7

50. Chubatsu LS, Gennari M, Meneghini R. Glutathione is the antioxidant responsible for the resistance to oxidative stress in V79 Chinese hamster fibroblasts rendered resistant to cadmium. *Chem Biol Interact* 1992; 32: 99-110.
51. Matović V, Plečaš B, Stojanović Z. Effect of acute cadmium intoxication on rabbit testis. *Arch Toxicol Kinet Xenobiot Metab* 1999; 7 (1-2): 19-24.
52. Goering PL, Fisher BR, Kish CL. Stress protein synthesis induced in rat liver by cadmium precedes hepatotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 1993; 122: 139-48.
53. Gstraunthaler G, Pfaller W, Kotanko P. Glutathione depletion and in vitro lipid peroxidation in mercury or maleate induced acute renal failure. *Biochem Pharmacol* 1983; 32: 2969-72.
54. Fukino H., Hirai M., Hsueh Y.M., Moriyasu S., Yamani Y. Effect of zinc pretreatment on mercuric chloride-induced lipid peroxidation in the rat kidney. *Toxicol Appl Pharmacol* 1984; 73: 395-401.
55. Lund BO, Miller DM, Woods JS. Studies on Hg(II)-induced H₂O₂ formation and oxidative stress in vivo and in vitro in rat kidney mitochondria. *Biochem Pharmacol* 1993; 45: 2017-24.
56. LeBel CP, Ali SF, Bondy SC. Deferoxamine inhibits methyl mercury-induced increases in reactive oxygen species formation in rat brain. *Toxicol Appl Pharmacol* 1992; 112: 161-5.
57. Sarafian T, Verity MA. Oxidative mechanisms underlying methyl mercury neurotoxicity. *Int J Dev Neurosci* 1991; 9: 147-53.
58. Woods JS, Ellis ME. Up-regulation of glutathione synthesis in rat kidney by methyl mercury : Relationship to mercury-induced oxidative stress. *Biochem Pharmacol* 1995; 50(10): 1719-24.
59. Lebel CP, Bondy SC. Oxygen radicals: Common mediators of neurotoxicity. *Neurotoxicol Teratol* 1991; 13 (3): 341-6.
60. Nicotera P, Bellomo G, Orrenius S. The role of calcium in cell killing. *Chem Res Toxicol* 1990; 3: 484-94.
61. Reed DJ. Review of the current status of calcium and thiols in cellular injury. *Chem Res Toxicol* 1990; 3: 495-502.
62. Farber JL. The role of calcium in lethal cell injury. *Chem Res Toxicol* 1990; 3: 503-8.
63. Donaldson WE, Knowles SO. Is lead toxicosis a reflection of altered fatty acid composition of membranes? *Comp Biochem Physiol* 1993; 104C: 377-9.
64. Lawton LJ, Donaldson WE. Lead-induced tissue fatty acid alterations and lipid peroxidation. *Biol Trace Elem Res* 1991; 28: 83-97.
65. Ramstoeck ER, Hoekstra WG, Ganther HE. Trialkyllead metabolism and lipid peroxidation in vivo in vitamin E - and selenium-deficient rats as measured by ethane production. *Toxicol Appl Pharmacol* 1980; 54: 251-7.
66. Gerber GM, Maes J, Gilliavod N, Casale G. Brain biochemistry of infant mice and rats exposed to lead. *Toxicol Lett* 1978; 2: 51-63.

67. Rehman S. Lead-induced regional lipid peroxidation in brain. *Toxicol Lett* 1984; 21: 333-7.
68. Ali SF, Bondy SC. Triethyllead-induced peroxidative damage in various regions of the rat brain. *J Toxicol Environ Health* 1989; 26: 235-42.
69. Bettger WJ, O'Deal BL. A critical physiological role of zinc in the structure and function of biomembranes. *Life Sci* 1981; 28: 1425-38.
70. Hammermueller JD, Bray TM, Bettger WJ. Effect of zinc and copper deficiency on microsomal NADPH-dependent active oxygen generation in rat lung and liver. *J Nutr* 1987; 116: 894-901.
71. Xu Z, Bray TM. Effects of increased microsomal oxygen radicals on the function and stability of cytochrome P450 in dietary zinc deficient rats. *J Nutr Biochem* 1992; 3: 326-32.
72. McCabe MJ Jr, Nicotera P, Orrenium S. Calcium-dependent cell death: Role of the endonuclease, protein kinase C, and chromatin conformation. *Ann N.Y. Acad Sci* 1992; 663: 269-77.
73. Har-El R, Chevion M. Zinc(II) protects against metal-mediated free radical induced damage: Studies on single and double-strand DNA breakage. *Free Radic Res Commun* 1991; 13: 509-15.
74. Bray TM, Bettger WJ. The physiological role of zinc as an antioxidant. *Free Radic Biol Med* 1990; 8: 281-91.
75. Soldatović D, Matović V, Vujanović D. Prophylactic effect of high magnesium intake in rabbits exposed to prolonged lead intoxication. *Magnesium Research* 1993; 6: 145-8.
76. Matović V, Soldatović D, Vujanović D. Magnesium against lead: new approach to prophylaxis and therapy of chronic lead intoxication. In: Kotsaki-Kovatsi VP, Vafiadu AJ, editors. *Aspects on Environmental Toxicology*. Thessaloniki: Technika Studio, 1995: 78-82.
77. Soldatović D, Matović V, Vujanović D, Stojanović Z. Contribution to interaction between magnesium and toxic metals: the effect of prolonged cadmium intoxication on magnesium metabolism in rabbits. *Magnesium Research* 1998; 11 (4): 283-8.
78. Soldatović D, Matović V. Influence of magnesium on the urinary lead excretion in rabbits submitted to chronic lead intoxication. In: *Magnesium Research New Vistas*, eds. B. Chhapparwal & J. Durlach. Indora, India. 1999: 125-31.
79. Soldatović D, Matović V, Vujanović D, Guet-Bara A, Bara M, Durlach J. Metal pollutants and bioelements: retrospective of interactions between magnesium and toxic metals. *Magnesium Research* 2002; 15 (1-2): 67-72.