

OKSIDATIVNI STRES U PATOGENEZI NEURODEGENERATIVNIH OBOLJENJA

Zorica Jovanović

Katedra za Patološku fiziologiju, Medicinski fakultet, Kragujevac

OXIDATIVE STRESS IN THE PATHOGENESIS OF NEURODEGENERATIVE DISEASES

Zorica Jovanovic

Department of Pathophysiology, Medical Faculty, Kragujevac, Serbia

SAŽETAK

Mozak je veoma osetljiv na oksidativna oštećenja posredovana reaktivnim oblicima kiseonika i azota zbog velike metaboličke aktivnosti, značajne količine polinezasićenih masnih kiselina i sadržaja metala, a sa druge strane slabe antioksidativne zaštite sa niskim aktivnostima glutathion peroksidaze i katalaze. Veliki broj eksperimentalnih podataka ukazuje na to da oksidativni stres ima značajnu ulogu u starenju i patogenezi neurodegenerativnih oboljenja, kao što su Alchajmerova bolest, Parkinsonova bolest i amiotrofična lateralna skleroza. Patogeneza neurodegenerativnih oboljenja povezana je sa poremećajima mitohondrija, oksidativnim stresom, prisustvom patoloških agregata proteina, poremećajima gvožđa, ekscitotoksičnošću i neuroinflamacijom. Ova oboljenja se odlikuju patološkom akumulacijom oksidativno modifikovanih makromolekula u neuronima i vanćelijskom prostoru. Prekomerno aktivisane mikroglijalne ćelije proizvode proinflamatorne citokine, hemokine, komplement i reaktivne oblike kiseonika. U ovom radu prikazuju se nova saznanja o ulogama oksidativnog stresa u patogenezi neurodegenerativnih oboljenja, sa posebnim osvrtom na poremećaje funkcije mitohondrija, oksidativna oštećenja, prisustvo patoloških agregata proteina, poremećaj gvožđa i odgovor mikroglije.

Ključne reči: neurodegenerativne bolesti; oksidativni stres; neuroni; mikroglija; mitohondrije.

UVOD

Reaktivni oblici kiseonika uzrokuju oksidativna oštećenja biomolekula (lipidi, proteini, DNA), dovodeći do mnogih akutnih i hroničnih oboljenja kao što je ateroskleroza, karcinom, starenje, neurodegenerativna oboljenja, dijabetes melitus, postishemična reperfuziona oštećenja, infarkt miokarda, apopleksija, hronična zapaljenja, septični šok (1, 2). S druge strane, dokazano je da su radikali kiseonika uključeni u biohemijske aktivnosti ćelija kao što je signalna transmisija, genska transkripcija i regulacija aktivnosti solubilne gvanilat ciklaze. Ovi molekuli su intraćelijski i međućelijski glasnici u mozgu. Od svih reaktivnih oblika kiseonika jedino vodonik-peroksid (H_2O_2) poseduje sve osobine sekundarnog glasnika (3). U fiziološkim koncentracijama reaktivni

ABSTRACT

Oxidative stress is a deleterious condition leading to neuronal cell death. The brain is particularly vulnerable to damage mediated by reactive oxygen and reactive nitrogen species, due to their high concentrations of unsaturated fatty acids, high rate of oxygen consumption, high content of metals catalyzing free radical formation. And finally, the brain is relatively deficient in antioxidant systems with lower activity of glutathione peroxidase and catalase compared to other organs. There is a lot of evidence indicating that oxidative stress plays crucial role in aging as well as in the development and pathology of neurodegenerative diseases, including Alzheimer's disease, Parkinson's disease and amyotrophic lateral sclerosis. A number of ageing-related neurodegenerative diseases are associated with impaired mitochondrial function, increased oxidative damage, presence of abnormal, aggregated proteins, iron dyshomeostasis, and involvement of excitotoxicity and inflammation. Neurodegenerative disorders are characterized by an abnormal accumulation of oxidatively damaged macromolecules inside the cells and in the extracellular space.

The abnormal production by overactivated glial cells of pro-inflammatory cytokines, chemokines and the complement system, as well as reactive oxygen species, can disrupt nerve terminals activity and cause dysfunction and loss of synapses, which correlates with memory decline. This review discusses current knowledge about the involvement of oxidative stress in neurodegenerative diseases pathogenesis, focusing on impaired mitochondrial function, oxidative damage, presence of abnormal, aggregated proteins, iron dyshomeostasis, and functional responses of microglia.

Key words: neurodegenerative diseases; oxidative stress; neurons; microglia; mitochondria

oblici kiseonika učestvuju u regulaciji sinaptičke plastičnosti i memorije (4). Mreže antioksidanasa u mozgu dovoljno su blage da omoguće slanje poruka, a istovremeno, pruže adekvatnu zaštitu ćelija od oksidativnog oštećenja. Reaktivni oblici kiseonika imaju ključnu ulogu u patogenezi starenja i sa starenjem povezanih oboljenja, kao što su Parkinsonova bolest, amiotrofična lateralna skleroza i Alchajmerova demencija. Oksidativni stres nastaje zbog povećane proizvodnje reaktivnih oblika kiseonika (Parkinsonova i Alchajmerova

bolest) ili smanjene sposobnosti ćelija da ga neutrališu preko svojih unutrašnjih antioksidanasa (mutacija gena za superoksid dizmutazu kod amiotrofične lateralne skleroze). Jedna od najprihvaćenijih teorija starenja koju je 1956. godine postavio Harman (5) jeste teorija „slobodnih radikala“ koja podrazumeva akumulaciju oksidativnih oštećenja biomolekula sa starenjem, što narušava ravnotežu između prooksidanasa i antioksidanasa u korist prvih i dovode do oksidativnog stresa. Neurodegenerativna oboljenja odlikuju se patološkom akumulacijom oksidativno modifikovanih makromolekula u ćelijama i ekstraćelijskom prostoru. Proteini uključeni u stvaranje agregata su β -amiloid, tau, α -sinuklein, parkin, prionski proteini i proteini koji sadrže poliglutamin. Ovi patološki agregati proteina dovode do poremećaja normalnih ćelijskih funkcija (6, 7).

OKSIDATIVNA OŠTEĆENJA NERNVIH ĆELIJA

Značajna količina polinezasićenih masnih kiselina koje su veoma osetljive na peroksidaciju, velika metabolička aktivnost (troši oko 20% ukupnog kiseonika), a sa druge strane slaba antioksidativna zaštita čine mozak pogodnim za stvaranje slobodnih radikala i osetljivim na njihovo dejstvo (8). Neki delovi mozga, posebno bazalne ganglije (substancija nigra, globus palidus, putamen) akumuliraju gvožđe, tako da su veoma osetljivi na hronični oksidativni stres. S druge strane, cerebrospinalna tečnost ima mali kapacitet za vezivanje gvožđa. Antioksidativni kapaciteti mozga su skromni. Aktivnost katalaze je niska u većini delova mozga. Hipotalamus i substancija nigra sadrže nešto veće koncentracije od kore i malog mozga (9). Sistem glutationa je manje efikasan u detoksikaciji peroksida u neuronima nego u astrocitima (10).

Reaktivni oblici kiseonika imaju značajnu ulogu u nekim patološkim stanjima centralnog nervnog sistema, bilo da direktno oštećuju tkiva bilo da je njihovo stvaranje posledica oštećenja tkiva. Najčešće opisivani slobodni radikali su hidroksilni radikal (OH^{\bullet}), superoksidni radikal ($\text{O}_2^{\bullet-}$) i azotni monoksid (NO^{\bullet}). Neki drugi molekuli kao što je singlet kiseonik, vodonik peroksid (H_2O_2), peroksinitrit (ONOO^-), sadrže reaktivne funkcionalne grupe sa kiseonikom, a po definiciji nisu slobodni radikali jer ne poseduju nesparene elektrone. Oni različitim hemijskim reakcijama generišu slobodne radikale (11), pa je uveden pojam reaktivnih oblika kiseonika. Organizam čoveka proizvodi slobodne radikale i druge reaktivne oblike kiseonika preko brojnih fizioloških i biohemijskih procesa. Pošto su ovi intermedijeri previše reaktivni da bi se tolerisali u ćelijama, kontrola njihovog formiranja, kao i efikasno otklanjanje kroz potrošnju od strane antioksidanasa, verovatno je od prioritarnog značaja u toku

procesa evolucije od trenutka kada se molekularni kiseonik prvi put pojavio u atmosferi. Antioksidativni enzimi, superoksid dismutaza, katalaza, glutation reduktaza i glutation peroksidaza pomažu čistačima (eng. *scavengers*) slobodnih radikala i ispoljavaju sinergističko delovanje u njihovom otklanjanju (12).

PATOGENEZA NEURODEGENERATIVNIH OBOLJENJA

Neurodegenerativna oboljenja su stanja gubitka nervnih ćelija u mozgu i kičmenoj moždini što je praćeno funkcionalnim padom (ataksija) ili senzornom disfunkcijom (demencija). Poremećaj mitohondrija, ekscitotoksičnost i na kraju apoptoza su patološki uzroci starenja i neurodegenerativnih oboljenja. U patogenezi neurodegenerativnih bolesti prepliću se genetski faktori i faktori spoljašnje sredine. Neurodegenerativna oboljenja ispoljavaju različite simptome, zahvataju različite delove mozga i imaju različite uzroke, ali imaju i neke zajedničke karakteristike: smanjena funkcija mitohondrija (13, 14), oksidativni stres (15), prisustvo patoloških agregata proteina, poremećaji metabolizma gvožđa, poremećaji sistema ubikvitin-proteazoma (16), a prema mišljenju nekih istraživača, i ekscitotoksičnost i inflamacija. Halliwell (2006) je ukazao na to da ovi događaji u neurodegeneraciji čine začarani krug, a da svaki od njih može da pokrene drugi i dovede do oštećenja i smrti neurona (17).

Oksidativna oštećenja neurona manifestuju se povećanjem krajnjih proizvoda lipidne peroksidacije, proizvoda oksidacije DNA baza (a često i RNA), kao i proizvoda oksidacije i oksidativnog oštećenja proteina (18). Agregati proteina često sadrže i nitrirane proteine (19).

Neurodegenerativna oboljenja odlikuju se sličnom molekularnom osnovom: promenama konformacije i taloženjem proteina sa nastajanjem toksičnih oligomera i fibrila. Jedna od najvažnijih karakteristika neurodegenerativnih oboljenja jeste da većina proteina koji su uključeni u patogenezu ovih oboljenja pokazuje izraženu sklonost ka agregaciji. Ovi agregati pokreću kaskadu događaja u ćeliji koja se opisuje kao „amiloidna kaskada“. Druga moguća hipoteza Alchajmerove bolesti i drugih neurodegenerativnih oboljenja jeste „hipoteza jonskih kanala“. Ona podrazumeva da rastvorljivi oligomeri reaguju sa jonskim kanalima u ćelijskoj membrani, dovodeći do ulaska jona Ca^{2+} u ćeliju i do poremećaja neurotransmisije. Toksični faktori su i metalni joni (Zn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , Al^{3+}) što vodi do „metalne hipoteze“ neurodegenerativnih oboljenja. Održavanje ravnoteže metalnih jona značajno je za prevenciju oksidativnog stresa, jer sprečava modifikaciju proteina i smanjuje njihovu sklonost ka agregaciji (20).

Postoje četiri zajedničke karakteristike širokog spektra neurodegenerativnih bolesti, mada svako od ovih oboljenja ima i svoje specifičnosti. Najpre, današnja saznanja ukazuju na vezu između neuroinflamatorne komponente i hroničnog oksidativnog stresa. Povećanje koncentracije difuzibilnog azotnog oksida (NO) i superoksidnog radikala ($O_2^{\cdot-}$) koji se oslobađaju iz aktiviranih mikrogijalnih ćelija, dovodi do stvaranja peroksinitrita ($ONOO^-$). Peroksinitrit i srodna reaktivna jedinjenja azota učestvuju u reakcijama oksidacije i nitracije (21), a sve je više prihvaćena hipoteza da reaktivni oblici kiseonika i azota zajedno posreduju u oštećenjima kod neurodegenerativnih oboljenja (22, 23). Druga zajednička karakteristika neurodegenerativnih oboljenja je akumulacija patoloških proteina u nervnim ćelijama, tako da se Alchajmerova bolest, Parkinsonova bolest, Huntingtonova bolest i amiotrofična lateralna skleroza opisuju kao „konformacione bolesti proteina“. Treća zajednička karakteristika (posebno kod Alchajmerove bolesti, Parkinsonove bolesti i multiple skleroze) je poremećaj ravnoteže između redoks-aktivnih (gvožđe i bakar) i redoks-neaktivnih (cink) metalnih jona (24). Četvrta karakteristika neurodegenerativnih oboljenja je poremećaj mitohondrija (25), koje imaju ključnu ulogu u metabolizmu i regulišu životni ciklus ćelija, posredovanjem apoptoze.

Nesumnjivo je da oksidativni stres ima značajnu ulogu u neurodegeneraciji. Povećana proizvodnja reaktivnih oblika kiseonika povezana je sa smanjenjem kognitivnih funkcija. Oksidativna fosforilacija u mitohondrijama je glavni izvor reaktivnih oblika kiseonika, tako da postoji jasna veza između poremećaja mitohondrija i oksidativnog stresa kod neurodegenerativnih oboljenja. Unutrašnja membrana mitohondrija poseduje enzimske sisteme za otklanjanje reaktivnih oblika kiseonika i čistače slobodnih radikala. Međutim, u određenim patološkim stanjima (npr. mutacije gena za antioksidativne enzime) odbrambeni mehanizmi postaju slabiji ili se povećava proizvodnja slobodnih radikala u mitohondrijama što uzrokuje oksidativni stres. Kod Alchajmerove demencije i Parkinsonove bolesti postoje najjači dokazi o poremećajima mitohondrija, metaboličkom disbalansu i oksidativnom stresu koji proističe iz njih, a koji zajedno sa naslednim faktorima imaju značajnu ulogu u etiopatogenezi ovih oboljenja (26). Kod neurodegenerativnih oboljenja povećano je oslobađanje glutamata i drugih ekscitatornih aminokiselina koje povećavaju količinu intracelularnog kalcijuma, što je praćeno aktivacijom intracelularnih proteaza, fosfolipaza i endonukleaza, oštećenjem ćelijske membrane, padom energetske rezervi, jonskim disbalansom i oksidativnim stresom. S druge strane, poremećaj energetskog metabolizma i pojava izmenjenih mitohondrija smanjuju koncentraciju redukovano glutationa (GSH) i slabe

antioksidativnu zaštitu. Sve navedeno rezultuje oštećenjem neurona i proizvodnjom novih slobodnih radikala, što stvara začarani krug. Poremećaji mitohondrija, smanjenje energetske rezervi u ćelijama, apoptoza i povećana proizvodnja reaktivnih oblika kiseonika zajednički su patogeni mehanizmi starenja i neurodegenerativnih bolesti. Kaskada događaja koji dovodi do smrti neurona je složena. Ekscitotoksičnost i apoptoza su dva osnovna uzroka oštećenja i smrti neurona. U apoptozi je presudna uloga mitohondrija, jer višestruki putevi apoptoze proizlaze iz mitohondrija. Osim poremećaja mitohondrija (apoptoza), ekscitotoksičnosti, oksidativnog stresa i zapaljenja, mehanizmi od gena do bolesti uključuju i agregaciju proteina i poremećaje proteazoma (27). Genetska istraživanja naslednih oblika neurodegenerativnih oboljenja pomogla su da se razjasni patobiologija sporadičnih oblika ili starenja mozga.

ALCHAJMEROVA BOLEST I OKSIDATIVNI STRES

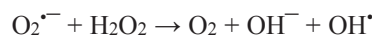
Hipoteza amiloidne kaskade je modifikovana poslednjih godina, ali se i dalje smatra centralnim mehanizmom Alchajmerove bolesti. Poremećaj metabolizma i nivoa β amiloidnog peptida ($A\beta$) pokreće kaskadu događaja koja se završava neurodegeneracijom i Alchajmerovom demencijom. Ovaj peptid nastaje cepanjem amiloidnog prekursora proteina (APP) enzimima β -sekretaza i γ -sekretaza. Ranije se smatralo da $A\beta$ ne nastaje u normalnim ćelijama, međutim novija istraživanja pokazala su da je on proizvod metabolizma, ali da se razgrađuje i otklanja iz ćelija. Poremećaj ravnoteže između sinteze i otklanjanja $A\beta$ je u osnovi neurodegeneracije kod Alchajmerove bolesti. Kod ove bolesti su pored selektivne neuronske degeneracije, prisutne dve lezije u mozgu, senilni plakovi (ovalne mikroskopske lezije u vanćelijskom prostoru mozga, sa centralnim proteinskim jezgrom sastavljenim od fibrilarnog proteina, β -amiloidnog peptida) i neurofibrilarna klubad koja su lokalizovana u samim neuronima, sastavljena uglavnom od hiperfosforilisanog tau proteina. Tau protein se normalno nalazi u aksonima vezan za mikrotubule i od izuzetnog je značaja za sinaptičku transmisiju. Hiperfosforilacija tau proteina dovodi do razgradnje mikrotubula i poremećaja sinapsi. Danas se sve više prihvata teorija da je povećano taloženje senilnih plakova i neurofibrilarne klubadi kompenzatorni odgovor mozga na različite toksične međuprodukte (28). Senilni plakovi i neurofibrilarna klubad verovatno su posledica, a ne uzrok bolesti (29). Mehanizmi preko kojih akumulacija β -amiloidnog peptida izaziva oštećenje i smrt neurona uključuju oksidativni stres i zapaljenske procese (30). Isto tako ovi agregati posredstvom receptora stimulišu proizvodnju slobodnih radikala. Vezivanje $A\beta$ za specifične receptore kao što su RAGE ili tip 2 receptora

čistača (eng. *scavenger receptor*), indukuje proizvodnju slobodnih radikala povećanjem aktivnosti nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH) oksidaze. Novije studije ukazuju na to da je A β fiziološki antioksidans i da se to svojstvo sa starenjem menja (31). Istraživanja mehanizama Alchajmerove demencije u poslednje dve decenije, bila su uglavnom usmerena na pronalaženje genskih mutacija familijarnog oblika, koje karakterišu rani početak i progredijentni tok, za razliku od kasnog početka kod sporadičnog oblika ovog oboljenja. Dakle, iako se dugo smatralo da je za nastanak i progresiju Alchajmerove demencije odgovorna agregacija A β u toksične depozite u ekstracelularnom prostoru mozga, mnogi dokazi upućuju na to da su zreli senilni plakovi netoksični (32). A β različitim putevima dovodi do proizvodnje reaktivnih oblika kiseonika (33). Jedan od ovih puteva je vezivanje metala kao što su cink, bakar i gvožđe (34). Akumulacija ekscitatornih aminokiselina (npr. glutamata) dovodi do oštećenja i smrti neurona aktivacijom specifičnih receptora ili indukcijom oksidativnog stresa. Isto tako dolazi i do smanjenja koncentracije redukovano glutationa (GSH) u neuronima. Poslednja meta A β je imunski sistem. A β 40 prisutan u amiloidnim plakovima aktivira mikroglijalne ćelije koje proizvode velike količine slobodnih radikala i proinflammatory citokina. Kliničke studije su ukazale na značaj zapaljenskih procesa kod Alchajmerove demencije.

Oksidativni stres ima značajnu ulogu u patogenezi Alchajmerove bolesti. Neurogeneza se javlja u mozgu odraslih, posebno u hipokampusu i povećana je kod bolesnika sa Alchajmerovom demencijom, a predstavlja kompenzatorni odgovor na gubitak neurona. Reaktivni oblici kiseonika utiču na novostvorene neurone i na taj način posreduju u patogenezi Alchajmerove bolesti. Antioksidansi bi mogli sa smanje štetna dejstva reaktivnih oblika kiseonika na ove neurone i sa poboljšaju regenerativne kapacitete mozga (35). Dokazano je da kod Alchajmerove bolesti postoji poremećaj regulacije metala (36), a posebno redoks-aktivnih prelaznih metala koji se nagomilavaju u citoplazmi neurona. Povećano stvaranje superoksidnog radikala kod Alchajmerove bolesti u korelaciji je sa povećanim koncentracijama superoksid dismutaze, što je praćeno oslobađanjem H₂O₂ iz mitohondrija u citoplazmu (H₂O₂ prolazi difuzijom kroz membrane mitohondrija i ćelija). Povećana koncentracija H₂O₂ u citoplazmi u prisustvu redoks aktivnih metala dovodi do stvaranja hidroksilnog radikala (37). U mozgu obolelih od Alchajmerove demencije povećane su koncentracije cinka, gvožđa i bakra (38). Metali su značajni jer katalizuju konverziju vodonik peroksida (H₂O₂) u hidroksilni radikal (OH•) putem Fentonove i Haber-Weisseve reakcije:



Kombinacija I i II reakcije:



(Fentonova reakcija)

Podaci iz literature ukazuju na to da oksidativni stres nije ograničen isključivo na poremećaj mitohondrija i Fentonovu reakciju. A β peptid se smatra jakim redukujućim agensom koji je sposoban da redukuje prelazne metale u citoplazmi i tako pretvori molekularni kiseonik u H₂O₂ (39). Bakar ima značajnu ulogu u patogenezi Alchajmerove bolesti, jer je dokazano da različitim putevima aktivira A β : izmenama sekundarne strukture A β , indukcijom oksidativnog stresa i regulacijom signalnih puteva u neuronima (40).

Pored neurona, u patogenezu Alchajmerove bolesti uključeni su astrociti i mikroglijalne ćelije. Ove ćelije proizvode proinflammatory citokine, hemokine, sistem komplementa, kao i reaktivna jedinjenja kiseonika i azota što je praćeno poremećajima nervnih završetaka. Posledica ovih događanja su gubitak i pad sinapsi i kognitivni poremećaji. Terapijska strategija usmerena na kontrolu oslobađanja proinflammatory faktora i prooksidanasa iz astrocita i mikroglije bi mogla biti od velike pomoći u kontroli neurodegeneracije kod Alchajmerove bolesti. Mikroglijalne ćelije aktiviraju dve vrste nadražaja. Prvo, mikrogliju mogu da aktiviraju pro-inflammatory okidači, kao što je A β , što je praćeno proizvodnjom reaktivnih oblika kiseonika i citokina koji su toksični za neurone. S druge strane, i signali oštećenih neurona mogu aktivirati mikrogliju. Ovaj kontinuiran i samoobnavljajući ciklus oštećenja i smrti neurona, praćen neurotoksičnom aktivacijom mikroglije, naziva se reaktivnom mikrogliozom i može biti osnovni mehanizam progresivne prirode različitih neurodegenerativnih bolesti, uključujući Alchajmerovu demenciju. NADPH oksidaza (koja se naziva i fagocitna oksidaza) je implicirana kao ključni mehanizam kojim mikroglija dovodi do oštećenja, odnosno smrti neurona u odgovoru na A β (41).

PARKINSONOVA BOLEST I OKSIDATIVNI STRES

Parkinsonova bolest je primarno neurodegenerativno oboljenje koje se karakteriše destrukcijom dopaminergičkih neurona u substanciji nigri bazalnih ganglija. Dopamin se normalno metaboliše aktivnošću monoamino oksidaze B. Međutim, na neutralnom pH dolazi do autooksidacije dopamina, a kao međuprodukti ove reakcije nastaju melanin i H₂O₂, koji u prisustvu gvožđa generiše veoma reaktivan hidroksilni radikal (OH•). Neki delovi mozga, posebno bazalne ganglije, akumuliraju gvožđe, što ih čini veoma osetljivim na hronični oksidativni stres. Novija istraživanja ukazuju na to da poremećaji mitohondrija, ekscitotoksičnost, neuro-

inflamacija, oksidativni stres i taloženje filamenata proteina u Lewy-evim telima doprinosi propadanju neurona kod Parkinsonove bolesti (42).

Kako je oksidativni stres blisko povezan sa drugim degenerativnim faktorima teško je utvrditi da li je oksidativni stres uzrok ili posledica tih događaja (43). Dopamin je neurotransmiter koji u određenim uslovima postaje metalni helator i donor elektrona i proizvodi reaktivne oblike kiseonika. U sklopu neurodegenerativnih procesa agregati proteina se talože u obliku Lewy-evih tela u dopaminergičkim neuronima. Lewy-eva tela su filametozne inkluzije u neuronima, koje se nalaze uglavnom u substanciji nigri i locus ceruleusu. Glavni sastavni deo Lewy-evih tela je α -sinuklein, protein koji je normalno lokalizovan presinaptički. Fiziološka funkcija α -sinukleina je održavanje plastičnosti sinapsi, a prekomerna ekspresija α -sinukleina veoma malo utiče na vitalnost ćelija. S druge strane, ekspresija mutiranog α -sinukleina je neurotoksična i indukuje apoptozu neurona (44). Moguća uloga α -sinukleina jeste modulacija aktivnosti dopamina koji zatim interakcijom sa gvožđem proizvodi H_2O_2 . Kod Parkinsonove bolesti je, više nego kod bilo kojeg drugog neurodegenerativnog oboljenja, dokazana uloga povećane koncentracije metala. Povećane koncentracije gvožđa nalaze se prilikom obdukcije u nigrostrijatnim degeneracijama i mogu povećati težinu neuropatoloških promena (45). Gvožđe je odgovorno za agregaciju α -sinukleina, bilo direktno bilo indirektno, povećanjem nivoa oksidativnog stresa, što ukazuje na značajnu ulogu gvožđa u stvaranju Lewy-jevih tela (46).

Razumevanje molekularnih mehanizama kojima genske mutacije dovode do familijarnog oblika Parkinsonove bolesti veoma je značajno za razjašnjenje neurodegeneracije u sporadičnim oblicima Parkinsonove bolesti. Otkriće gena za familijarne oblike bolesti (α -sinuklein, Parkin, DJ-1, PINK-1 i LRRK2), kao i eksperimenti na životinjama pružaju uvid u molekularne mehanizme sporadičnih oblika ove bolesti. Poremećaji mitohondrija, oksidativna oštećenja, fosforilacija i akumulacija patoloških proteina ključni su molekularni mehanizmi uključeni u degeneraciju dopaminergičkih neurona kod sporadičnih i familijarnih oblika bolesti. Faktori spoljašnje sredine, kao što su pesticidi i toksini izazivaju oksidativna oštećenja i poremećaje mitohondrija. Kao posledica patogenih mutacija ili oksidacije α -sinukleina dolazi do njegove agregacije što izaziva oksidativni stres i poremećaj funkcije ubikvitin proteozoma i mitohondrija. Sve veći broj eksperimentalnih dokaza ukazuje na to da poremećaj kompleksa I u mitohondrijama, smanjuje njegovu aktivnost u substanciji nigri, što može da bude centralni uzrok sporadičnih oblika Parkinsonove bolesti (47). Inhibitori kompleksa I, kao što su rotenon i MPP (*1-metil-4-phenylpyridin*), pomogli su da se dokaže da su reaktivni

oblici kiseonika poreklom iz mitohondrija značajni u patofiziologiji Parkinsonove bolesti (48). Oksidativna oštećenja DNA (49) i proteina (50) u nigrostrijatnim putevima govore u prilog tome da oksidativni stres ima značajnu ulogu u patogenezi Parkinsonove bolesti.

AMIOTROFIČNA LATERALNA SKLEROZA I OKSIDATIVNI STRES

Amiotrofična lateralna skleroza karakteriše se progresivnim propadanjem donjeg motornog neurona u kičmenoj moždini i moždanom stablu i gornjeg motornog neurona u kori mozga. Etiologija ovog oboljenja je multifaktorijalna, složena i još uvek nije sasvim razjašnjena. U 5–10% svih slučajeva reč je o familijarnom obliku, a 20% familijarnih oblika bolesti uzrokovano je mutacijom gena za bakar-cink superoksid dizmutazu (Cu-Zn SOD). Ovaj enzim ima značajnu ulogu u regulaciji oksidativnog oštećenja ćelija, jer katalizuje dizmutaciju superoksidnog radikala u vodonik peroksid. Mutirana SOD pokazuje manje aktivnih mesta za vezivanje bakra. Mutacija SOD vodi ka konverziji ovog enzima u prooksidans koji i sam učestvuje u stvaranju reaktivnih oblika kiseonika (51).

Mutacija Cu-Zn SOD dovodi do oštećenja neurona posredstvom programirane ćelijske smrti — apoptoze koja se odvija aktivacijom kaspaza: a) povećanjem količine superoksidnog radikala koji sa azotnim oksidom daje peroksinitril; b) mutirana SOD nije samo inaktivna, već je sposobna da inhibira funkciju normalne SOD ekspimirane na normalnom alelu (52); c) smanjena aktivnost SOD dovodi do povećanja koncentracije H_2O_2 i OH^{\bullet} radikala.

Eksperimentalni rezultati ukazuju na to da je u oštećenje motornog neurona uključeno više mehanizama: oksidativni stres, ekscitotoksičnost, poremećaj mitohondrija, agregacija proteina, kao i aktivnost drugih ćelije (neneuralnih). Oksidativni stres uključen je u mnoge od ovih procesa, bilo da je primarni uzrok bilo da je posledica oboljenja.

Oksidativni stres različitim putevima pogoršava druge neurodegenerativne mehanizme kod amiotrofične lateralne skleroze (53): 1) ekscitoksičnost povećava koncentraciju intracelularnog kalcijuma što dovodi do proizvodnje reaktivnih oblika kiseonika u mitohondrijama, koji blokiraju preuzimanje glutamata u gljalne ćelije i na taj način povećavaju ekstracelularnu koncentraciju glutamata; 2) velike zahteve motornih nerava za energijom obezbeđuju mitohondrije, ali se u njima povećava i proizvodnja reaktivnih oblika kiseonika; 3) prolongirani odgovor endoplazmatskog retikuluma u sintezi proteina praćen je povećanom proizvodnjom reaktivnih oblika kiseonika; 4) mutirana SOD katalizuje patološku oksidativnu reakciju koja dovodi do povećane

proizvodnje veoma reaktivnog peroksinitrita i hidrosilnog radikala, što je praćeno nitracijom i agregacijom proteina, uključujući i samu SOD; 5) reaktivni oblici kiseonika uzrokuju i agregaciju neurofilamenta; 6) reaktivni oblici kiseonika prolaze kroz ćelijsku membranu i aktiviraju mikroglijalne ćelije, koje odgovaraju proizvodnjom citokina i novih količina slobodnih radikala.

U aksonima i telu degenerativno izmenjenih neurona kod obolelih od amiotrofične lateralne skleroze nađene su inkluzije koje se sastoje od agregata neurofilamena proteina. Periferin je filament koji je normalno eksprimiran u autonomnim nervima i perifernim senzitivnim nervima, a koji je u malim količinama prisutan i u spinalnim nervima. Periferin je nađen u oko 90% inkluzija u motornim neuronima kod amiotrofične lateralne skleroze. Inkluzije periferina povezane su sa degeneracijom aksona, oštećenjem i smrću motornih neurona. Mehanizam ćelijske smrti nije razjašnjen, ali se smatra da inkluzije ili sekvencijacija ćelijskih komponenti (i mitohondrija) blokiraju intracelularni transport u aksonima (54).

Smanjena koncentracija drugog oblika SOD u mitohondrijama (Mn SOD) detektovana je u mišićima bolesnika sa sporadičnim oblicima amiotrofične lateralne skleroze. Poremećaj funkcije mitohondrija dovodi do deficita energije. S obzirom na to da su motorni neuroni veći od ostalih ćelija (ćelijsko telo oko 50–60 µm, a dužina aksona i do 1m), pa i većine nervnih ćelija, oni su i posebno osetljivi na nedostatak energije. Najveći deo energije u nervnom tkivu koristi se za funkcionisanje jonskih pumpi. Metabolički kompromitovani neuroni ne mogu da održavaju membranski potencijal, što je praćeno aktivacijom N-metil-D-aspartat (NMDA) receptora za glutamat i povećanjem koncentracije kalcijuma u neuronima (55). Osetljivosti motornih neurona doprinosi i nizak nivo kalcijum-vezujućih proteina u citoplazmi (56), kao i velike količine SOD u motornim neuronima, koja je dobar antioksidans u fiziološkim uslovima, međutim, mutirana SOD povećava oksidativni stres.

ZAKLJUČAK

Zajednička pitanja o ulozi oksidativnog stresa u patogenezi neurodegenerativnih oboljenja su očigledna. *Prvo* pitanje je, da li je oksidativni stres uzrok ili posledica bolesti? To je složeno akademsko pitanje, jer ako je oksidativni stres samo posledica, postavlja se pitanje da li oksidativni stres može biti terapijski cilj kod ovih oboljenja. *Drugo*, koja je etiologija oksidativnog stresa? Zajedničko za ova oboljenja su poremećaji mitohondrija i narušavanje homeostaze redoks-aktivnih metala. *Treće* pitanje je, kakav je odnos između oksidativnog stresa i drugih aspekata patogeneze neurodegenerativnih oboljenja?

Za većinu ovih bolesti pitanja su složena i uglavnom nerešena, etiologija multifaktorijalna, a oksidativni stres se prepliće sa drugim mehanizmima bolesti.

LITERATURA

1. Freidovich I. Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen? *NY Acad Sci* 1999;893:13.
2. Yun-Zhong F, Sheng Y, Guoyao W. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* 2002;18:872–9.
3. Forman H, Maiorino M, Ursini F. Signaling Functions of Reactive Oxygen Species. *Biochemistry* 2010;49(5):835–42.
4. Massaad CA, Klann E. Reactive Oxygen Species in the Regulation of Synaptic Plasticity and Memory. *Antioxid Redox Signal* 2010; (Epub ahead of print).
5. Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontology* 1956;11:298–300.
6. Grimm S, Hoehn A, Davies KJ, Grune T. Protein oxidative modifications in the ageing brain: consequence for the onset of neurodegenerative disease. *Free Radic Res* 2011;45(1):73–88.
7. Gundersen V. Protein aggregation in Parkinson's disease. *Acta Neurol Scand Suppl* 2010;(190):82–7.
8. Floyd RA, Carney JM. Free radical damage to protein and DNA: Mechanism involved and relevant observations on brain undergoing oxidative stress. *Ann Neurol* 1992;32:522–7.
9. Halliwell B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging* 2001;18:685–716.
10. Dringen R, Kussmaul L, Gutterer JM, Hirrlinger J, Hamprecht B. The glutathione system of peroxide detoxification is less efficient in neurons than in astroglial cells. *J Neurochem* 1999;72(6):2523–30.
11. Gilgun-Sherki Y, Melamed E, Offen D. Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. *Neuropharmacology* 2001;40:959–75.
12. Yun-Zhong F, Sheng Y, Guoyao W. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* 2002;18:872–9.
13. Reddy PH, Beal MF. Are mitochondria critical in the pathogenesis of Alzheimer's disease? *Brain Res Rev* 2005;49:618–32.
14. Zeevalk GD, Bernard LP, Song C, Gluck M, Ehrhart J. Mitochondrial inhibition and oxidative stress: reciprocating players in neurodegeneration. *Antioxid Redox Signal* 2005; 7:1117–39.
15. Jenner P. Oxidative stress in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2003;53:26–36.

16. Keller JN, Schmitt FA, Scheff SW, et al. Evidence of increased oxidative damage in subjects with mild cognitive impairment. *Neurology* 2005;64:1152–6.
17. Halliwell B. Proteasomal dysfunction: a common feature of neurodegenerative diseases? Implications for the environmental origins of neurodegeneration. *Antioxid Redox Signal* 2006;8(11-12):2007–19.
19. Ischiropoulos H, Beckman JS. Oxidative stress and nitration in neurodegeneration: cause, effect, or association? *J Clin Invest* 2003;111:163–9.
20. Zerovnik E. Protein conformational pathology in Alzheimer's and other neurodegenerative diseases; new targets for therapy. *Curr Alzheimer Res* 2010;7(1):74–83.
21. Alvarez B, Radi R. Peroxynitrite reactivity with amino acids and proteins. *Amino Acids* 2003;25:295–311.
22. Floyd RA. Neuroinflammatory processes are important in neurodegenerative diseases: an hypothesis to explain the increased formation of reactive oxygen and nitrogen species as major factors involved in neurodegenerative disease development. *Free Radical Biol Med* 1999;26:1346–55.
23. Chung KK, Dawson TM, Dawson VL. Nitric oxide, S-nitrosylation and neurodegeneration. *Cell Mol Biol* 2005;51:247–54.
24. Donnelly PS, Xiao Z, Wedd AG. Copper and Alzheimer's disease. *Curr Opin Chem Biol* 2007;11:128–33.
25. Lin MT, Beal MF. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* 2006;443:787–95.
26. Halliwell B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem* 2006;97:634–58.
27. Emerit M, Edeas FB. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Biomed Pharmacother* 2004;58:39–46.
28. Lee HG, Zhu X, Castellani RJ, Nunomura A, Perry G, Smith MA. Amyloid- β in Alzheimer Disease: The null versus the alternate hypothesis. *J Pharmacol Exp Ther* 2007;321:823–9.
29. Atwood CS, Obrenovich ME, Liu T, et al. Amyloid- β : a chameleon walking in two worlds: a review of the trophic and toxic properties of amyloid- β . *Brain Res Rev* 2003;43:1–16.
30. Galasko D, Montine TJ. Biomarkers of oxidative damage and inflammation in Alzheimer's disease. *Biomark Med* 2010;4(1):27–36.
31. Castellani RJ, Zhu X, Lee HG, Moreira PI, Perry G, Smith MA. Neuropathology and treatment of Alzheimer disease: Did we lose the forest for the trees? *Exp Rev Neurother* 2007;7:473–85.
32. Lee HG, Zhu X, Castellani RJ, Nunomura A, Perry G, Smith MA. Amyloid-beta in Alzheimer disease: The null versus the alternate hypotheses. *J Pharmacol Exp Ther* 2007;321:823–9.
33. Wolozin B, Behl C. Mechanisms of Neurodegenerative Disorders. Part 1: Protein Aggregates. *Arch Neurol* 2000;57:793–6.
34. Atwood C, Moir R, Huang X, et al. Dramatic aggregation of Alzheimer abeta by Cu(II) is induced by conditions representing physiological acidosis. *J Biol Chem* 1998;273:12817–26.
35. Taupin P. A dual activity of ROS and oxidative stress on adult neurogenesis and Alzheimer's disease. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem* 2010;10(1):16–21.
36. Smith MA, Wehr K, Harris PL, Siedlak SL, Connor JR, Perry G. Abnormal localization of iron regulatory protein in Alzheimer's disease. *Brain Res* 1998;788:232–6.
37. Lee HG, Zhu X, O'Neill MJ, et al. The role of metabotropic glutamate receptors in Alzheimer's disease. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 2004;64:89–98.
38. Gille G, Reichmann H. Iron-dependent functions of mitochondria-relation to neurodegeneration. *J Neural Transm* 2010. (Epub ahead of print).
39. Hayashi T, Shishido N, Nakayama K, et al. Lipid peroxidation and 4-hydroxy-2-nonenal formation by copper ion bound to amyloid-beta peptide. *Free Radic Biol Med* 2007;43:1552–9.
40. Lin CJ, Huang HC, Jiang ZF. Cu(II) interaction with amyloid-beta peptide: a review of neuroactive mechanisms in AD brains. *Brain Res Bull* 2010;82(5-6):235–42.
41. Agostinho P, Cunha RA, Oliveira C. Neuroinflammation, oxidative stress and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Curr Pharm Des* 2010;16(25):2766–78.
42. Gundersen V. Protein aggregation in Parkinson's disease. *Acta Neurol Scand Suppl* 2010;190:82–7.
43. Kikuchi A, Takeda A, Onodera H, et al. Systemic increase of oxidative nucleic acid damage in Parkinson's disease and multiple system atrophy. *Neurobiol Dis* 2002;9:244–8.
44. Lee M, Hyun D, Halliwell B, Jenner P. Effect of the overexpression of wild-type or mutant alpha-synuclein on cell susceptibility to insult. *J Neurochem* 2001;76:998–1009.
45. Gotz ME, Double K, Gerlach M, Youdim MB, Riederer P. The relevance of iron in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Ann NY Acad Sci* 2004;1012:193–208.
46. Kaur D, Andersen J. Does cellular iron dysregulation play a causative role in Parkinson's disease? *Ageing Res Rev* 2004;3:327–43.

47. Thomas B, Beal MF. Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* 2007;16(R2):R183–94.
48. Schmidt WJ, Alam M. Controversies on new animal models of Parkinson's disease pro and con: The rotenone model of Parkinson's disease (PD). *J Neural Transm* 2006; Suppl. 273–6.
49. Kikuchi A, Takeda A, Onodera H, et al. Systemic increase of oxidative nucleic acid damage in Parkinson's disease and multiple system atrophy. *Neurobiol Dis* 2002;9:244–8.
50. Floor E, Wetzel MG. Increased protein oxidation in human substantia nigra pars compacta in comparison with basal ganglia and prefrontal cortex measured with an improved dinitrophenylhydrazine assay. *J Neurochem* 1998;70:268–75.
51. Valentine JS, Hart PJ. Misfolded CuZnSOD and amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:3617–22.
52. Rosen DR, Siddique T, Patterson D, et al. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 1993;362(6415):59–62.
53. Barber SC, Shaw PJ. Oxidative stress in ALS: key role in motor neuron injury and therapeutic target. *Free Radic Biol Med* 2010;48(5):629–41.
54. Beaulieu JM, Nguyen MD, Julien JP. Late onset of motor neurons in mice overexpressing wild-type peripherin. *J Cell Biol* 1999;147(3):531–44.
55. Cluskey S, Ramsden DB. Mechanisms of neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *Mol Pathol* 2001;54(6):386–92.
56. Appel SH, Beers D, Siklos L, Engelhardt JI, Mosier DR. Calcium: the Darth Vader of ALS. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 2001;1: S47–54.