

RADIKALI IN OKSIDATIVNI STRES

FREE RADICALS AND OXIDATIVE STRESS

AVTOR / AUTHOR:

doc. dr. Janez Mravljak, mag. farm.

Fakulteta za farmacijo, Aškerčeva 7, 1000 Ljubljana

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: janez.mravljak@ffa.uni-lj.si

1 UVOD

Radikali so atomi, ioni ali nevtralne spojine, ki imajo vsaj en nesparsen elektron v zunanji (valenčni) orbitali. Število nesparsenih elektronov je v molekuli radikala lahko sodo ali liho, pri čemer je pri sodem številu elektronov vsak nesparsen elektron v svoji molekularni π -protivezni orbitali. Molekula s takšno razporeditvijo elektronov je v tripletnem stanju. Primer takšnega radikala je tripletni kisik ($^3\text{O}_2$), ki je v našem ozračju. Prisotnost nesparsenega elektrona podeli matični strukturi posebne kemične in fizikalne lastnosti. Radikali so zaradi nesparsenega elektrona paramagnetne snovi, ki običajno zelo hitro reagirajo s snovmi v svoji okolici, ker težijo k stanju, kjer so vsi elektroni v parih (1).

Kisik je nujno potreben za življenje vseh aerobnih organizmov, saj je končni prejemnik elektronov (je oksidant) in protonov v oksidacijskih procesih, s katerimi celica pridobiva energijo, hkrati pa je tudi vir težav, povezanih z radikali in drugimi reaktivnimi zvrstmi. Molekularni kisik v atmosferi je biogenega izvora. Neprestano nastaja iz vode v procesih fotosinteze, kjer rastline izkoriščajo energijo sončne svet-

POVZETEK

Prekomerna tvorba reaktivnih zvrsti, ki presega zmožnost antioksidativne obrambe, izzove oksidativni stres, ki vodi v oksidativne poškodbe biomolekul v celicah. Ravnovesje med tvorbo reaktivnih zvrsti in antioksidativno obrambo je v fizioloških razmerah pomaknjeno rahlo na stran oksidativnih procesov. Oksidativni stres je koristen in škodljiv za organizem, odvisno od obsega in trajanja. Stanje oksidativnega stresa v organizmu je težko merljivo.

KLJUČNE BESEDE:

reaktivne zvrsti, antioksidanti, oksidativni stres

ABSTRACT

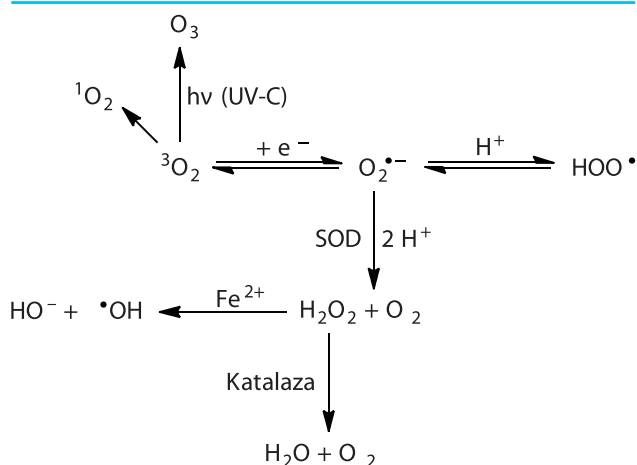
Excessive formation of reactive species, which exceed the ability of antioxidant defense, provokes oxidative stress that leads to oxidative damage of biomolecules in cells. The balance between the formation of reactive species and antioxidative defenses in physiological conditions is slightly shifted to the side of oxidative processes. Oxidative stress is beneficial and detrimental to the organism, depending on the extent and duration. The state of oxidative stress in the body is difficult to establish.

KEY WORDS:

reactive species, antioxidants, oxidative stress

lobe za redukcijo CO_2 , elektrone in protone pa pridobijo iz vode (oksidacija). Kisik se nato porablja v procesih celičnega dihanja, ko se reducira nazaj v vodo. Reaktivnost kisika izvira iz elektronske konfiguracije molekule O_2 . Ta ima v dveh p^*_{2p} protiveznih orbitalah dva nesparsena elektrona z enako usmerjenima spinoma, zato je biradikal. Molekula kisika s takšno razporeditvijo elektronov je v osnovnem tripletnem stanju, ki ima v tem primeru najnižjo energijo. $^3\text{O}_2$ je za večino neradikalnih spojin slabo reaktivna molekula, saj lahko zaradi enako usmerjenih spinov obeh nesparsenih elektronov v oksidacijskih procesih sprejme manjkajoča elektrona le postopoma, ne more pa sprejeti elektronskega para. Hitro lahko reagira le z radikali ali ioni prehodnih elementov, ki lahko ponudijo en elektron. Če pa pride do obrata enega od spinov v molekuli O_2 , nastane singletni kisik ($^1\text{O}_2$), ki ni radikal, a je bistveno bolj reaktiven. Ozon (O_3) je še en kisikov alotrop, ki pa je tudi reaktivnejši od kisika. Iz tripletnega kisika nastanejo vse ostale reaktivne ki-

sikove zvrsti (ROS, slika 1), ki so lahko radikali (npr. superoksidni anion ($O_2^{\bullet-}$), hidroperoksilni radikal (HOO^{\bullet}), hidroksilni radikal (HO^{\bullet}) ali pa ne-radikali (npr. vodikov peroksid (H_2O_2), peroksinitrit ($ONOO^-$)). Poleg kisikovih se v organizmu pojavljajo še dušikove (RNS), ogljikove, žveplove in halogenske reaktivne zvrsti (1, 2).



Slika 1: Medsebojna povezanost nekaterih predstavnikov ROS (1).
Figure 1: The interrelation of some representatives of ROS (1).

2 POZITIVNA VLOGA REAKTIVNIH ZVRSTI

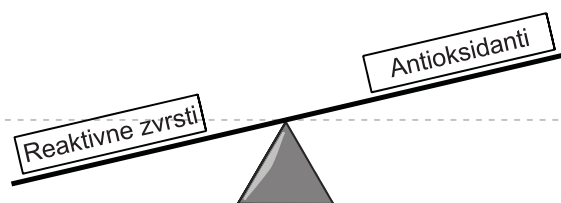
Reaktivne zvrsti v organizmu ne povzročajo samo škode (oksidirajo biomolekule), ampak so jih celice tekom evolucije vključile v svojo biokemijo, kjer opravljajo številne nepogrešljive naloge, kot je npr. redoks signaliziranje. Nekateri reaktivni zvrsti so pomembne signalne molekule (zlasti $\bullet NO$), druge so to le v nizkih koncentracijah (npr. H_2O_2), ki modulirajo razmnoževanje celic, apoptozo, in ekspresijo genov preko aktivacije prepisovalnih dejavnikov (npr. NF- κB). ROS so lahko signalni intermedijati za nekatere citokine (npr. TNF α in IL-1).

Reaktivne zvrsti so pomemben del obrambe imunskega sistema pred patogeni (virusi, bakterije, glivice), ki so vdrlji v telo. Aktivirani fagociti tako namenoma tvorijo večje količine $O_2^{\bullet-}$, HOCl in H_2O_2 , oksidativni stres pa je neizogiben spremljevalec vnetnega procesa. Zmerne količine $O_2^{\bullet-}$ in H_2O_2 , ki izhajajo iz mitohondrijev, imajo pomembno vlogo pri celi vrsti celičnih signalnih procesov (mitohondrijska hor-

meza). Lahko aktivirajo signalne poti, ki celici omogočijo preživetje in povečajo njeno odpornost v primeru bolezni, ali pa ob večjih koncentracijah sprožijo apoptozo celice (1, 3).

3 OKSIDATIVNI STRES

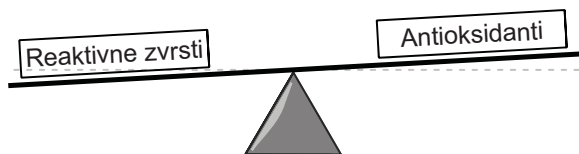
Pojem oksidativni stres je leta 1985 prvi uvedel Helmut Sies. Definira ga kot »motnjo v ravnovesju med prooksidanti in antioksidanti v korist prvih, kar vodi v možne poškodbe« (4). Oksidativni stres je torej presežek reaktivnih zvrsti, kar je posledica neravnovesja med njihovo tvorbo in odstranjevanjem, za kar skrbi antioksidativna zaščita (slika 2). Ravnovesje lahko poruši povečana tvorba reaktivnih zvrsti in/ali zmanjšana fiziološka aktivnost antioksidativne zaščite. Oksidativni stres povzroča oksidativne poškodbe biomolekul (3).



Slika 2: Oksidativni stres je porušeno dinamično ravnovesje med tvorbo reaktivnih zvrsti in antioksidativno zaščito. Precejšen porast spontan oksidacij vodi v oksidativne poškodbe celic.

Figure 2: Oxidative stress is the disruption of the dynamic balance between the formation of reactive species and antioxidative protection. The substantial growth of spontaneous oxidations leads to oxidative damage of cells.

Vse oblike življenja vzdržujejo v celicah reducirajoče notranje okolje, ki ga vzdržujejo številni encimi ob stalnem trošenju metabolne energije. Zaradi motenj v tem normalnem redoks stanju lahko pride do prekomernega nastanka reaktivnih zvrsti, ki povzročijo toksične učinke. Znatno oksidativni stres vodi v smrt celice. Stopnja oksidativnega stresa, ki ga celica občuti, je odvisna od tvorbe reaktivnih zvrsti na eni strani in zmoglosti obrambnega sistema na drugi strani, ki neprestano odstranjuje te reaktivne zvrsti. V fizioloških razmerah je ravnovesje med prooksidanti in antioksidanti nagnjeno rahlo na stran prooksidantov, kar omogoča blag oksidativni stres (Slika 3) (5).



Slika 3: Fiziološko ravnovesje med tvorbo reaktivnih zvrsti in antioksidativno obrambo prepreči kopičenje oksidativnih poškodb in zagotovi dovolj reaktivnih zvrsti za signaliziranje (5).

Figure 3: Physiological balance between the formation of reactive species and antioxidative defense to prevents the accumulation of oxidative damage and enables sufficient amount of reactive species for signaling (5).

Vzroke za povečan oksidativni stres lahko najdemo na strani povečane tvorbe reaktivnih zvrsti ali na strani zmanjšane antioksidativne zaščite. Lahko izvira iz okolja (npr. ionizirajoča sevanja, kajenje, onesnaženo okolje, ...) ali pa je prisoten v organizmu (vnetje, transport kisika s hemoglobinom, metabolizem, puščanje elektronov iz dihalne verige v mitohondrijih itd.). Zmanjšana antioksidativna zaščita je lahko posledica zmanjšane vnosa, biološke uporabnosti ali endogene sinteze antioksidantov.

Znaten oksidativni stres ob nezadostni antioksidativni obrambi pusti dolgotrajne posledice. V zgodnjem obdobju neravnovesja oksidativni stres ne kaže simptomov, oziroma nima tipične klinične slike, ki bi opozorila na njegovo prisotnost v organizmu (6). Oksidativnega stresa na začetku sploh ne diagnosticiramo, dokler ne nastane nepopravljiva škoda in se ne pokažejo simptomi kronične bolezni. Da bi preprečili razvoj bolezni, ki so povezane z radikali in odložili prezgodnje staranje, je potrebno prepoznati oksidativni stres in popraviti oksidativno neravnovesje. Predvsem pa je potrebno odpraviti vzroke za oksidativni stres.

ALI STE VEDELI?

- Radikali in ostale reaktivne zvrsti v organizmu ne povzročajo samo škode, ampak imajo tudi pomembno koristno vlogo. So hkrati »dobri« in »zli«.
- Tudi v fizioloških razmerah je stalno prisotna majhna količina reaktivnih zvrsti, ki pobegnejo antioksidativni zaščiti in povzročajo oksidativne poškodbe biomolekul.
- Prekomeren vnos antioksidantov lahko vodi v antioksidativni stres.

Količina poškodovanih biomolekul je v celici odvisna od hitrosti in obsega oksidativnih poškodb na eni in hitrosti popravilnih mehanizmov na drugi strani. Možne oksidativne poškodbe omejuje antioksidativna zaščita, ki pa ima omejeno kapaciteto. V fizioloških razmerah je ravnovesje nagnjeno rahlo na stran oksidativnih poškodb (Slika 3), kar pomeni, da je stalno prisotna majhna količina reaktivnih zvrsti, ki pobegnejo antioksidativni zaščiti in povzročajo oksidativne poškodbe. Tako so v celici stalno prisotne določene količine oksidiranih proteinov in nukleinskih kislin kot posledica delovanja reaktivnih zvrsti. Mehanizmi, ki ščitijo celice pred oksidativnim stresom (antioksidativna mreža, popravilni mehanizmi), so energijsko potratni, če se aktivirajo po vseh predelih celice za daljši čas. Popolna preprečitev oksidativnih poškodb bi od organizma zahtevala preveč energije. Zmanjšana zmožnost za popravilo poškodovanih biomolekul se tako odrazi v pospešenem staranju organizma (poškodovane biomolekule se kopičijo), kar posledično še dodatno okrne proizvodnjo energije v celicah (5).

Po drugi strani pa povišan nivo reaktivnih zvrsti poveča učinkovitost obrambnih in popravilnih mehanizmov, saj se preko redoks signaliziranja zviša raven izražanja encimov antioksidantov in encimov za popravilo DNA (3, 5). Tako ne preseneča ugotovitev, da je najboljša strategija za okrepitev nivoja antioksidativne obrambe prav sam oksidativni stres. To se sklada z ugotovitvami, da je spodbuditev porasta koncentracije endogenih antioksidantov z nekaterimi prooksidanti bolj učinkovita, kot pa uživanje dodatnih antioksidantov v obliki prehranskih dopolnil (7). Mnogi dejavniki, ki pripomorejo k zdravemu življenjskemu slogu, zmerno povečajo nastanek reaktivnih zvrsti, vključno z redno telesno vadbo, zmernim uživanjem etanola in nenasitjenih maščobnih kislin.

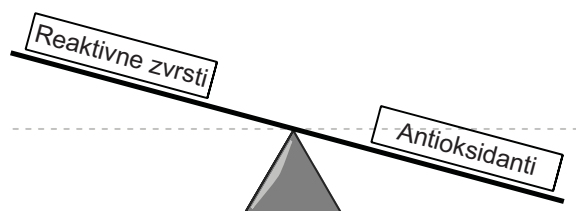
4 VLOGA ANTIOKSIDANTOV

Biološki antioksidant je vsaka snov, ki upočasni, prepreči ali odstrani možnost oksidativne poškodbe tarčne molekule (3). Antioksidanti odstranjujejo reaktivne zvrsti, ali pa preprečijo njihovo nastajanje in tako zmanjšajo oksidativni stres, kar pa glede na razvoj in potek bolezni ni vedno zaželeno (npr. pri raku z obsevanjem povzročimo nastanek reaktivnih snovi in s tem lokalizirani oksidativni stres). Antioksidanti namreč ne ločijo med reaktivnimi zvrstmi, ki

imajo koristno fiziološko vlogo in tistimi, ki povzročajo oksidativne poškodbe na biomolekulah. Obsežnejše zmanjšanje nivoja reaktivnih zvrsti vpliva na učinkovitost imunskega sistema, ki se bori s patogenimi mikroorganizmi, ali pa zavira nujno potrebne obrambne mehanizme (npr. vnetni proces), ki skrbijo za odstranjevanje poškodovanih celic vključno z rakavimi celicami. Velika količina določenih antioksidantov lahko učinkuje prooksidativno in poveča oksidativni stres. Kakšen bo učinek antioksidanta, je odvisno predvsem od odmerka in stanja v telesu, zato ne velja, da »je bolje več«. Za uravnoteženo prehrano bogato z zelenjavo in sadjem velja, da vsebuje varne količine antioksidantov, medtem ko prehranska dopolnila z visokimi odmerki antioksidantov lahko porušijo fiziološko ravnovesje med tvorbo in odstranjevanjem reaktivnih zvrsti (5).

5 ANTIOKSIDATIVNI STRES

Prekomeren vnos antioksidantov s prehranskimi dopolnili lahko vodi v »antioksidativni stres« (5, 8). S tem izrazom označujemo negativne učinke antioksidantov. Tako oksidativni kot antioksidativni stres sta škodljiva za organizem, saj pospešita staranje in lahko povzročita nastanek raka. Narašča namreč število kliničnih preizkušenj (enega ali kombinacije antioksidantov), s katerimi niso uspeli potrditi zaščitnih učinkov antioksidantov v obliki prehranskih dopolnil. V nekaterih primerih so celo ugotovili, da antioksidantna terapija nima učinka ali celo poveča smrtnost (9, 10). Rezultati kliničnih preizkušenj antioksidantov eksogene izvora so pogosto problematični in nasprotujoči. Prekomerno povečanje koncentracije enega antioksidanta



Slika 4: Huda motnja v ravnovesju med antioksidativno obrambo in reaktivnimi zvrstmi vodi v stanje antioksidativnega stresa, kjer je moteno celično signaliziranje in redoks regulacija (5).

Figure 4: Severe disruption in the balance between antioxidative defense and reactive species leads to a state of antioxidative stress with disrupted cell signaling and redox regulation (5).

pogosto povzroči zmanjšanje koncentracije drugih antioksidantov preko kompenzatornih mehanizmov, tako da ostane celokupna kapaciteta antioksidantov nespremenjena. Vnos večje količine enega samega antioksidanta v telo lahko spremeni zapleten sistem telesu lastne (endogene) antioksidativne zaščite celic ali pa vpliva na poti apoptoze v celici. Veliki odmerki eksogenih antioksidantov lahko zavrejo sintezo endogenih antioksidantov, tako da ostane celokupni antioksidativni potencial celice nespremenjen. Raziskovalci domnevajo, da je večina ljudi sposobna vzdrževati »nastavljeno vrednost« oksidativnega stresa tudi, če zaužijejo večje količine antioksidantov v obliki prehranskih dopolnil. Zaradi tega ne pride do dodatnega zmanjšanja oksidativnega stresa (11, 12).

Antioksidativna obramba mora zmanjšati količino najbolj škodljivih reaktivnih zvrsti, a hkrati zagotoviti dovolj reaktivnih snovi za njihove pozitivne učinke (npr. redoks signaliziranje). Celice običajno dobro prenašajo takšen blag oksidativni stres, ki lahko spodbudi popravilne mehanizme in ostale zaščitne sisteme v celici.

Že dolgo je znano, da kompleksne mešanice antioksidantov v zaužitem sadju in zelenjavi zmanjšajo verjetnost za nekatera rakava obolenja in pripomorejo k dobremu zdravju kardiovaskularnega sistema pri posameznikih, ki uživajo več tovrstne hrane. Celo pri starostnikih povezujejo uživanje sadja in zelenjave z izboljšanim antioksidativnim statusom v primerjavi z osebami, ki uživajo hrano brez sadja in zelenjave (13). Nasprotno pa s kliničnimi preskušnji, kjer so posamezniki prejeli višje odmerke antioksidantov, koristnega učinka niso uspeli potrditi (9, 13). Nekatero nedavno opravljeno študijo (z vitamini C, E in A), ki so spremljale smrtnost, so pokazale, da antioksidanti nimajo vpliva, ali celo povečajo smrtnost (kot npr. v študiji z visokimi odmerki β -karotena pri kadilcih) (9, 10). Uporaba prehranskih dopolnil z antioksidanti ne sme in ne more biti nadomestilo za redno uživanje uravnotežene prehrane bogate s sadjem in zelenjavo (13).

Prehranska dopolnila z antioksidanti so koristna in učinkovita pri zmanjševanju oksidativnega stresa le v primeru, če je začetni oksidativni stres pri posamezniku povišan oziroma je nad »nastavljeno vrednostjo«, na katero ga želijo uravnati mehanizmi homeostaze (11, 12). Tak posameznik to pogosto občuti kot splošno utrujenost oziroma pomanjkanje energije, saj so homeostazni mehanizmi energijsko potratni. Antioksidanti v obliki prehranskih dopolnil lahko v tem primeru pomagajo organizmu popraviti povišan oksidativni

stres, ki ga ne uspejo uravnati endogeni mehanizmi, posameznik pa to lahko občuti kot »vrnitev življenjske energije«.

Problematično je tudi odmerjanje eksogenih antioksidantov. Pojavljajo se trditve, da so priporočeni dnevni odmerki (RDA) vitaminov C in E prenizki, da bi preprečili oksidativni stres. Po drugi strani pa veliko ljudi nekontrolirano uživa velike količine prehranskih dopolnil z antioksidanti, kar lahko privede do pro-oksidativnih učinkov ali do »antioksidativnega stresa« (5). Zato je potrebno določiti stopnjo oksidativnega stresa pri posamezniku, še preden mu svetujemo prehranska dopolnila z antioksidanti (13). Žal pa referenčne vrednosti, ki bi opredelile oksidativni stres pri posamezniku še niso določene, merjenje oksidativnega stresa pa ostaja izziv.

6 MERJENJE OKSIDATIVNEGA STRESA

Mnogo lažje kot stanje oksidativnega stresa je v organizmu ugotoviti antioksidativni status. Zaščita celice pred neželenimi oksidacijami temelji predvsem na encimih-antioksidantih, kot so superoksidna dismutaza (SOD), katalaza in glutation peroksidaza, medtem ko so v plazmi pomembnejši neencimski antioksidanti. Ker se antioksidanti, ki odstranjujejo radikale, porabljajo v reakcijah z reaktivnimi vrstmi, lahko posredno uporabimo antioksidativni status za oceno aktivnosti reaktivnih vrst. Eden od možnih pristopov je določanje posameznih antioksidantov (npr. α -tokoferola, askorbata, koencima Q_{10}) v krvi, plazmi ali tkivnih homogenatih. Takšen pristop pa ima številne pomanjkljivosti: je časovno potraten, drag in tehnično zahteven; ne zazna nujno sinergističnih učinkov med antioksidanti; z njim ne zajamemo vpliva še nepoznanih antioksidantov. Drug pristop je določanje celokupne antioksidativne kapacitete ali aktivnosti ob izpostavitvi vzorca nadzorovanim pogojem oksidativnega stresa. V slednjem primeru določamo hitrost oksidacije ali pa čas, ki je potreben, da poteče oksidacija. Določitev antioksidativnega (redukcijskega) potenciala žal ne zadošča, ker vsi antioksidanti ne učinkujejo kot reducenti, ampak se razlikujejo v mehanizmu delovanja: lahko odstranjujejo radikale in druge reaktivne vrste (neposredni reducenti), preprečijo njihov nastanek (npr. kelatorji kovinskih ionov), vplivajo na signalne poti ali pa popravljajo oksidativne poškodbe. Pri celokupnem antioksidativnem statusu so tudi velike razlike med posamezniki (3, 5).

Za razliko od celokupnega antioksidativnega statusa pa statusa oksidativnega stresa še ne poznamo. Na voljo nimamo niti referenčnih vrednosti za optimalen nivo antioksidantov v telesnih tekočinah ali, še bolje, v celicah. Številni radikali so zaradi velike reaktivnosti tako kratkoživi, da je njihova difuzijska pot zanemarljivo kratka, ali pa ne prehajajo celičnih membran zaradi naboja (npr. superoksidni anion). Zato ne prehajajo v kri iz prizadetega območja ali organa. Ker ni neposredne povezave med kazalniki (markerji) oksidativnega stresa v krvni plazmi in njihovimi koncentracijami znotraj celic, lahko pripeljejo meritve njihovih koncentracij v telesnih tekočinah do napačnih zaključkov (5).

Praktično je nemogoče določiti vse reaktivne vrste v celici ali celičnem organelu (npr. mitohondriju), prav tako ne moremo določiti celotne antioksidativne zaščite in popravila celic in organov, saj je organizem živ sistem, ki se prilagaja spremembam. Vsaka določitev oksidativnega stresa je le približna ocena trenutnega stanja, ki se lahko hitro spremeni (6). Povečan oksidativni stres lahko izvira iz povečane tvorbe reaktivnih snovi ali zmanjšane antioksidativne obrambe. Poškodbe biomolekul so lahko posledica povečane tvorbe reaktivnih vrst, zmanjšane antioksidativne obrambe in/ali sprememb v popravilu poškodovanih biomolekul. Ker nobeden od kazalnikov (biomarkerjev) ne more napovedati razvoja bolezni kot posledice dolgotrajnega oksidativnega stresa, je potrebno uporabiti več metod za kvalitativno in kvantitativno določanje oksidativnega stresa, saj ima vsaka metoda svoje prednosti in slabosti. Z različnimi metodami lahko neposredno določamo posamezne reaktivne vrste ali pa posredno merimo različne produkte oksidacije, ki so bolj ali manj specifični za posamezno reaktivno vrsto. Najpogostejše metode, s katerimi lahko ocenimo t.i. prooksidantni status so:

- elektronska paramagnetna resonanca (EPR) z uporabo spinskih pasti za lovljenje zelo reaktivnih in kratkoživih radikalov,
- določanje malondialdehida in drugih reaktivnih elektrofilov kot sekundarnih produktov oksidacije lipidov (npr. s pomočjo tiobarbituricne kisline),
- določanje hidroperoksidov s pomočjo Fentonove reakcije in kromogena (d-ROMs test),
- določanje vsebnosti lipidnih peroksidov in izoprostanov kot produktov lipidne peroksidacije,
- določanje 8-hidroksideoksigvanozina kot kazalnika oksidacije nukleinskih kislin v urinu in drugih telesnih tekočinah,
- kemiluminiscenca za spremljanje sproščanja radikalov iz celic npr. iz nevtrofilcev (z uporabo luminola, luciferina ali cypridina luciferinskega analoga).

7 SKLEP

Zdrav organizem, ki je v dobri kondiciji, je sposoben omejiti škodljive učinke reaktivnih zvrsti. Mreža medsebojno povezanih encimskih in neencimskih antioksidantov predstavlja naravni obrambni sistem, ki upočasni, prepreči ali popravi oksidativne poškodbe biomolekul. V primeru oksidativnega stresa je potrebno prepoznati in odpraviti vzroke, ki so privedli do neravnovesja. Dodaten vnos antioksidantov je uspešen le, če selektivno okrepi obrambni sistem, ne da bi pri tem porušil delovanje antioksidativne mreže ali preprečil fiziološke funkcije reaktivnih zvrsti.

8 LITERATURA

1. Pečar S, Mravljak J. Šumi življenja ali radikali in druge reaktivne snovi v telesu. Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana, 2015.
2. Kreft S, Pečar S. Vloga radikalov pri obolenjih. *Farm Vestn* 1998; 49: 469–481.
3. Halliwell B, Gutteridge J. M. C. *Free radicals in biology and medicine*. 4th ed., Oxford University Press, Oxford; New York, 2007.
4. Sies H. *Oxidative Stress II. Oxidants and Antioxidants*. Academic Press, London, 1991.
5. Poljšak B, Šuput D, Milisav I. *Achieving the Balance between ROS and Antioxidants: When to Use the Synthetic Antioxidants*. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2013, 2013, 1-11.
6. Osredkar J. Oksidativni stres. *Zdrav Vestn* 2012, 81: 393-406.
7. Halliwell B. "Free radicals and antioxidants—quo vadis?" *Trends in Pharmacological Sciences* 2011; 32: 125–130.
8. Dundar Y in Aslan R. "Antioxidative stress," *Eastern Journal of Medicine* 2000; 5: 45–47.
9. Bjelakovic G, Nikolova D, Gluud L, et al. *Mortality in Randomized Trials of Antioxidant Supplements for Primary and Secondary Prevention: Systematic Review and Meta-analysis*. *JAMA* 2007; 297: 842-857.
10. Moyer M W. *The Myth of Antioxidants*. *Sci Am* 2013; 308: 62-67.
11. Cutler R G, Mattson M P. "Measuring oxidative stress and interpreting its relevance in humans," In: *Oxidative Stress and Aging*, Cutler R G, Rodriguez H, Eds., World Scientific, New Jersey, NJ, USA, 2003.
12. Cutler R G. "Genetic stability, dysdifferentiation, and longevity determinant genes," In: *Critical Reviews of Oxidative Stress and Damage*, Cutler R G, Rodriguez H, Eds., World Scientific, New Jersey, NJ, USA, 2003.
13. Cornelli U. *Antioxidant use in nutraceuticals*. *Clin Dermatol* 2009; 27: 175-194.