

Antioxidanty, volné radikály, mechanismus působení a využití při terapii yperitem navozených poškození

KOLEČKÁŘ V.^{1,2}, BROJEROVÁ E.¹, OPLETAL L.¹, JUN D.^{2,3}, KUČA K.^{2,3}

¹Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra farmaceutické botaniky a ekologie

²Univerzita obrany, Fakulta vojenského zdravotnictví, Centrum pokročilých studií, Hradec Králové

³Univerzita obrany, Fakulta vojenského zdravotnictví, Katedra toxikologie, Hradec Králové

Došlo: 28. 2. 2007 / Přijato: 14. 3. 2007

SOUHRN

Antioxidanty, volné radikály, mechanismus působení a využití při terapii yperitem navozených poškození

Antioxidanty plní důležitou roli v udržení integrity živých organismů. V posledních letech jsou antioxidanty podrobeny vysokému zájmu z důvodu jejich léčebného využití. Je to dáno spojováním vývoje řady lidských nemocí s oxidačním stresem. Tato práce dává základní přehled o různých typech antioxidantů, reaktivních forem kyslíku a dusíku a popisuje obecné mechanismy jejich působení. Dalším tématem je využití antioxidantů při terapii poškození navozených yperitem, způsoby-
řující chemické látky použité již v první světové válce.

Klíčová slova: antioxidant – volný radikál – yperit

Čes. slov. Farm., 2007; 56, 73–76

SUMMARY

Antioxidants, free radicals, mechanism of action and application in the therapy of the sulfur mustard caused injury

Antioxidants perform an important role in the maintenance of the integrity of the living organisms. Recently, great attention has been given to antioxidants by a reason of their medical use. It is due to the association of many human diseases with oxidative stress. The present study briefly surveys the types of antioxidants, reactive oxygen and nitrogen species and describes the basic mechanisms of their activity. The application of antioxidants in the therapy of the injury caused by sulfur mustard, a vesicant type chemical warfare agent introduced in World War I, is also given.

Key words: antioxidant – free radical – sulfur mustard

Čes. slov. Farm., 2007; 56, 73–76

Má

Antioxidanty, volné radikály a jejich role v organizmu

Podle jedné z definic jsou antioxidanty látky, které při působení v nízkých koncentracích ve srovnání s látkami, jež by měly chránit, signifikantně inhibují nebo zpomalují oxidační destrukci těchto látek. Díky spojování vývoje a vzniku řady lidských nemocí s působením volných radikálů a oxidačním stresem, získaly antioxidanty

velkou vědeckou pozornost zejména z důvodu jejich potencionálního léčebného využití^{1, 2}. Volné radikály mají zejména důležitý fyziologický význam (prostředníci přenosu energie, faktory imunitní ochrany, signální molekuly buněčné regulace), ale za určitých okolností (oxidační stres) se mohou stát škodlivými a organismus poškozovat. Jejich role v patogenezi různých chorobných stavů je však do značné míry proměnlivá a mnohdy

Adresa pro korespondenci:

Mgr. Vít Kolečkář
Katedra vojenského zdravotnictví UO
Třebešská 1575, 500 01 Hradec Králové
e-mail: koleckar@pmfhk.cz

nedostatečně objasněná. Všeobecně se předpokládá, že pro správnou funkci biologických systémů je nutné udržet rovnováhu mezi tvorbou a zánikem reaktivních forem kyslíku (ROS) a dusíku (RNS) ³⁾.

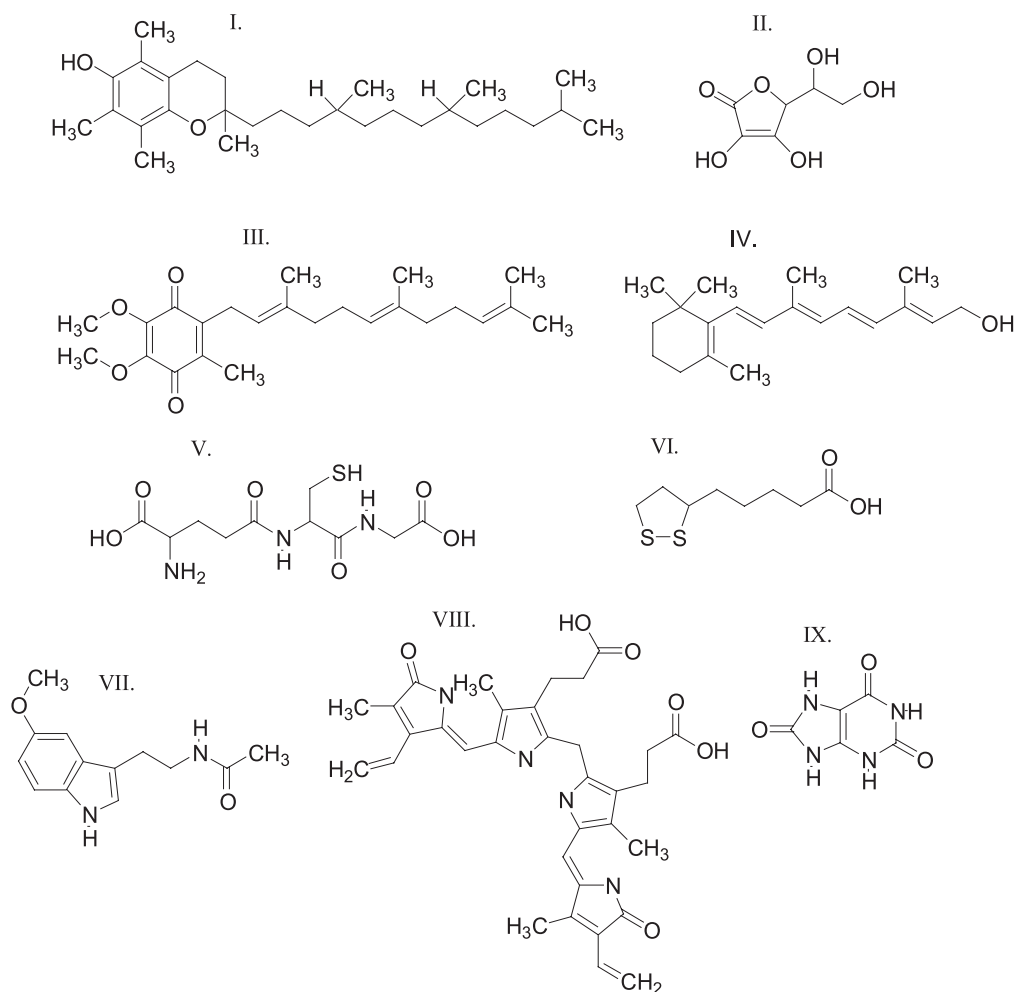
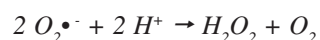
Některé nemoci mohou být přímo způsobeny oxidačním stresem. Jedná se například o rakovinu vyvolanou radiačním zářením, které generuje vysoce reaktivní hydroxylové radikály štěpením molekul vody. U nemocí, jako jsou ateroskleróza nebo revmatoidní artritida, není oxidační stres prvotním vyvolávajícím faktorem, ale přispívá k jejímu rozvoji. Existuje také řada nemocí, u kterých se oxidační stres sice vyskytuje, ale nepřispívá k jejich patologii ⁴⁾. Volné radikály hrají také důležitou úlohu například v patogenezi stárnutí, různých kardiovaskulárních chorob, diabetu druhého typu nebo rakoviny ⁵⁻⁷⁾.

Zdrojem ROS a RNS jsou biochemické, fotochemické nebo radiační reakce endogenního i exogenního původu. Mohou to být například léky (některá chemoterapeutika). Významnými iniciátory vzniku radikálů jsou také přechodné prvky (železo, měď), jelikož snadno podléhají redoxním reakcím. Mezi ROS a RNS se řadí jednak volné radikály, např. oxid dusnatý (NO•), superoxidový (O₂•), hydroxylový (OH•), peroxylový (ROO•) nebo

alkoxylový radikál (RO•) a jednak látky neradikálové povahy, např. nitroxid (NO), peroxid vodíku (H₂O₂), kyselina chlorná (HOCl) nebo ozon (O₃). K zachování oxidoredukční rovnováhy a zamezení zvýšené tvorby ROS a RNS využívá organismus různých mechanismů umožňujících vychytávání již existujících ROS (RNS), zamezování jejich novotvorby regulací enzymů, které je tvoří, využití podpory antioxidantních enzymů nebo inaktivaci přechodných kovů podporujících tvorbu radikálů. Na antioxidantní ochraně se podílejí také obecné reparační mechanismy poškozených biomolekul ³⁾.

Antioxidantní enzymy

Systém antioxidantní ochrany využívá enzymatické i neenzymatické antioxidanty tělu vlastní, tzv. endogenní antioxidanty, tak i antioxidanty exogenní. Mezi hlavní enzymy antioxidantní ochrany se řadí superoxiddismutasa, glutathionperoxidasa, glutathiontransferasa a katalasa. Superoxiddismutasa se podílí na odstranění přebytečného superoxidového radikálu podle následující reakce:

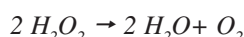


Obr. 1. Nízkomolekulární endogenní antioxidanty

(I.) α-tokoferol, (II.) kyselina askorbová, (III.) koenzym Q, (IV.) retinol, (V.) glutathion, (VI.) kyselina lipoová, (VII.) melatonin, (VIII.) bilirubin, (IX.) kyselina močová

Deaktivace superoxidového radikálu je důležitá zejména z důvodu jeho možné redukce na velmi reaktivní hydroxylový radikál⁸⁾.

Oxidačním stresem vzniklé intracelulární hydroperoxydy mastných kyselin a fosfolipidové hydroperoxydy jsou odstraňovány glutathionperoxidasami: cytosolovou GSH-glutathion-peroxidasou a fosfolipidhydroperoxid-GSH-peroxidasou. Skupina enzymů zvaných glutathiontransferasy se podílí nejen na detoxifikaci některých xenobiotik, ale také na odstraňování produktů lipidové peroxidace. Katalasa je enzym zajišťující dismutaci peroxidu vodíku na vodu a kyslík podle rovnice^{3, 9, 10)}:



Na antioxidační ochraně organismu se také podílí stopové prvky. Významnou roli má například zinek, selen nebo měď. Zinek a měď jsou kofaktory enzymu superoxid-dismutasy, selen je kofaktorem glutathionperoxidasy³⁾.

Antioxidační neenzymové proteiny

Do skupiny vysokomolekulárních neenzymových endogenních antioxidantů lze zařadit proteiny schopné vázat přechodné prvky (železo, měď). V tomto smyslu jsou jako antioxidanty chápány transferrin, laktoferrin, ferritin, ceruloplazmin a albumin. Prooxidačně aktivní hem a hemoglobin jsou vychytávány hemopexinem, resp. heptaglobinem, které je proto možno také považovat za antioxidanty¹¹⁻¹³⁾.

Nízkomolekulární endogenní antioxidanty

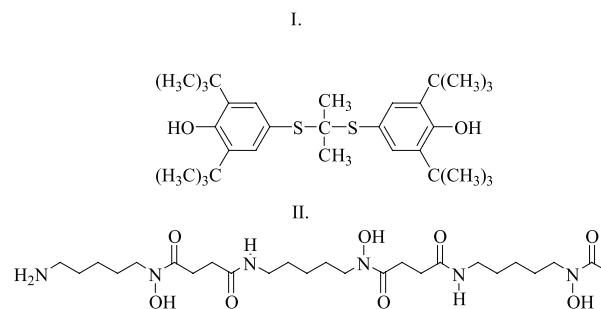
Nízkomolekulárními endogenními antioxidanty jsou například kyselina askorbová (vitamin C), α -tokoferol (vitamin E), ubiquinon (koenzym Q), retinol (vitamin A), thiole (tripeptid glutathion), kyselina lipoová, melatonin, kyselina močová nebo bilirubin (obr. 1). Tyto antioxidanty působí převážně jako lapače radikálů, přičemž samy tvoří stabilnější, méně nebezpečné radikálové struktury. Jednotlivé složky antioxidačního systému často podmiňují účinek dalších složek, například kyselina askorbová vychytává radikály, ale také regeneruje tokoferol. Vzniklý méně reaktivní askorbylový radikál je přeměněn za účasti glutathionu zpět na askorbát. Tokoferol chrání lipidy membrán tím, že přeměňuje lipidové alkylperoxydy na hydroperoxydy, a ty jsou pak odstraněny glutathionperoxidasou. Ubichinon vychytává peroxylový a alkoxylový radikál a podobně jako askorbát regeneruje tokoferol. Glutathion, kromě důležité role v regeneraci tokoferolu a askorbátu, chrání sulfhydrylové skupiny cysteinu, ubiquinonu a proteinů. Je také nezbytným substrátem glutathionperoxidasy³⁾. Kyselina lipoová jako antioxidant zhasí různé typy radikálů a podílí se rovněž na regeneraci tokoferolu, askorbátu nebo glutathionu¹⁴⁾. Melatonin je hormon, který vykazuje kromě jiných funkcí také silnou antioxidační aktivitu. Snadno prochází hematoencefalickou bariérou a na rozdíl například od vitamínu C nepodléhá opakovaným redoxním reakcím a nepůsobí tak prooxidačně^{15, 16)}. Kyselina močová

vychytává alkoxylový radikál a kyselinu chlornou, a váže železo a měď tak, aby nekatalyzovaly radikálové reakce³⁾. Bilirubin, konečný produkt metabolismu hemu, je silným lapačem RNS¹⁷⁾. Z uvedených příkladů je zřejmé, že systém antioxidační ochrany organismu je tvořen řadou vzájemně se ovlivňujících složek a funguje velmi komplexně.

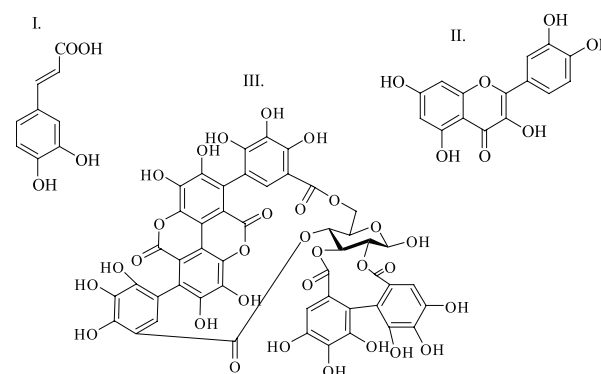
Exogenní antioxidanty

Součástí systému antioxidační ochrany mohou být také antioxidanty exogenní, a to jak syntetické, tak přírodní. Mezi syntetické antioxidanty patří například potravní aditiva BHA (směs izomerů 2-*t*-butyl-hydroxyanizolu a 3-*t*-butyl-hydroxyanizolu), BHT (3,5-di-*t*-butyl-4-hydroxytoluen), PG (propylgallát) a některá léčiva, např. hypolipidemikum probucol, nebo chelátor železa deferoxamin (obr. 2)³⁾.

Existuje mnoho typů látek rostlinného původu, které vykazují rozmanité biologické účinky. Velký zájem je zejména o polyfenoly, které byly a jsou široce zkoumány z důvodu potencionálního použití ve zdravotnictví jako účinné antioxidanty. Polyfenoly jsou rozsáhlá skupina sloučenin, která zahrnuje více než 8000 látek od jednoduchých struktur, jako jsou fenolické kyseliny (např. kyselina kávová), přes flavonoidy (např. quercetin), až po polymerní látky charakteru tříslovin (např. punicalagin, obsažený v granátových jablcích) (obr. 3)¹⁸⁻²¹⁾. Mezi základní mechanismy působení polyfenolů se řadí zhasení volných radikálů, chelatace přechodných kovů, inhi-



Obr. 2. Syntetické antioxidanty
(I.) probucol, (II.) deferoxamin



Obr. 3. Přírodní polyfenoly
(I.) kyselina kávová, (II.) quercetin, (III.) punicalagin

bice prooxidačních enzymů a podpora antioxidačních enzymů ²²⁾.

Antioxidanty vs. yperit

Netradiční sférou využití antioxidantů je jejich potencionální aplikace ve vojenském zdravotnictví, a to při terapii zranění způsobených zpuchýřujícími látkami. Typickým a nejznámějším představitelem těchto látek je yperit, chemicky bis(2-chlorethyl)sulfid. Tato bojová látka byla poprvé použita německou armádou v 1. světové válce. K relativně nedávnému bojovému použití yperitu došlo také během iránsko-irácké války a také první války v Perském zálivu. V poslední době se znovu zvýšil zájem o úplné objasnění mechanismu působení yperitu a potlačení jeho toxických účinků, a to hlavně z důvodu možného zneužití teroristy. Primárním důvodem intenzivního výzkumu je pak doposud neuspokojivě vyřešená optimální terapie ²³⁾.

Mezi hlavní molekulární mechanismy působení yperitu se řadí alkylace, kdy dochází k reakci yperitu s nukleofilními skupinami, jako jsou karboxylová, hydroxylová nebo aminoskupina v proteinech nebo nukleových kyselinách. Dochází tak k destrukci buněčných struktur až k celkovému zániku buněk. Jedním z projevů probíhajících patologických jevů je zvýšená tvorba ROS a RNS. K oxidačnímu stresu přispívá také indukce deplece glutathionu a následně zvýšená lipidová peroxidace. Jedním z přístupů jak optimalizovat terapii yperitem navozených poškození by tak mohlo být podávání antioxidantů ²⁴⁾.

Při hledání optimální terapie yperitem navozených poškození byl zjištěn pozitivní vliv různých antioxidantů. Ve studii, která se zabývala léčebnými účinky několika antioxidantů proti toxickému působení inhalačně a perkutánně podaného yperitu myším, bylo uvedeno, že podání flavonoidu quercetinu, glutathionu a analogu vitamínu E zvýšilo dobu přežití myší a chránilo játra a plíce před oxidačním poškozením. Docházelo také ke snížené akumulaci metabolitů purinu, které jsou významným markrem alkylace DNA po intoxikaci yperitem ²⁴⁾.

Existuje studie, která prokázala protektivní účinek extraktu z rakytníku řešetlákového (*Hippophae rhamnoides*) proti oxidačním účinkům yperitu. Bylo zjištěno, že perkutánní aplikace yperitu testovaným zvířatům vyvolala oxidační stres, který byl následně potlačen podáním extraktů bohatých na flavonoidy. Bylo tak docíleno snížení úbytku hmotnosti, znovuvyrovnění hladin glutathionu a snížení hladin malondialdehydu, produkovaného během oxidačního stresu ²⁵⁾.

Jiná studie potvrdila zmírnění negativních účinků yperitu na plíce krys působením antioxidačních enzymů PEG-katalasy, PEG-superoxiddismutasy a redukujících sloučenin N-acetylcysteinu, glutathionu a resveratrolu (polyfenol vyskytující se hojně ve vínu) ²⁶⁾.

Léčba zraňujícího poškození králíků po aplikaci yperitu byla testována u komplexu deferoxaminu se zinkem. Deferoxamin, chelátotvorná sloučenina používaná běžně při otravách železem, zmenšil svým antioxidačním působením

poškození zraku při samostatném podání a zejména pak v kombinaci s protizánětlivě působícími steroidy ²⁷⁾.

Podávání antioxidantů při poraněních způsobených yperitem je jedním z přístupů jak mírnit jeho toxické účinky. Tato potencionální léčiva působila příznivě jak při místním, tak systémovém podání, a to jak v preventivní tak v léčebné aplikaci. Kromě antioxidantů použitých v uvedených studiích lze předpokládat pozitivní vliv také u ostatních látek zabraňujících zvýšené tvorbě volných radikálů. Otevírá se tak možnost pro výzkum a testování širokého spektra antioxidantů jak přírodního, tak syntetického původu jako potencionálních léčiv otrav yperitem.

LITERATURA

1. Vaya, J., Aviram, M.: Curr. Med. Chem. Immunol. Endocr. Metab. Agents, 2001; 1, 99-118.
2. Kolečkář, V., Jun, D., Opletal, L. et al.: J. Appl. Biomed., 2007; 5 (v tisku).
3. Štípek, S.: In: Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci. (Štípek S. ed.). Praha, Grada, 2000.
4. De Bruyne, T., Pieters, L., Deelstra, H.: Biochem. Syst. Ecol., 1999; 27, 445-459.
5. Gutteridge, J. M. C.: Free Radic. Res. Commun., 1993; 19, 141-158.
6. Kehrer, J.: Crit. Rev. Toxicol., 1993; 23, 21-48.
7. Storz, P.: Front. Biosci., 2005; 10, 1881-1896.
8. Racek, J., Holeček, V.: Chem. Listy, 1999; 93, 774-780.
9. Ursini, F., Maiorino, M., Brigelius-Flohe, R. et al.: Meth. Enzymol., 1995; 252, 38-53.
10. Marinho, H. S., Antunes, F., Pinto, R. E.: Free Radic. Biol. Med., 1997; 22, 871-883.
11. Attieh, Z. K., Mukhopadhyay, C. K., Seshadri, V. et al.: J. Biol. Chem., 1999; 274, 1116-1123.
12. Reilly, C. A., Aust, S. D.: Arch. Biochem. Biophys., 1998; 359, 69-76.
13. Aust, S. D.: Toxicol. Lett., 1995; 82-83, 941-944.
14. Packer, L., Witt, E. H., Tritschler, H. J.: Free Radic. Biol. Med., 1995; 19, 227-250.
15. Hardeland, R.: Endocrine, 2005; 27, 119-130.
16. Tan, D., Manchester, L., Reiter, R. et al.: Biol. Signals Recept., 2005; 9, 137-159.
17. Mancuso, C., Pani, G., Calabrese, V.: Redox Rep., 2006; 11, 207-213.
18. Bravo, L.: Nutr. Rev., 1998; 56, 317-333.
19. Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S.: Food Chem., 2006; 99, 191-203.
20. Seeram, N. P., Adams, L. S., Henning, S. M. et al.: J. Nutr. Biochem., 2005; 16, 360-367.
21. Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., Paganga, G.: Free Radic. Biol. Med., 1996; 20, 933-956.
22. De Bruyne, T., Hermans, N., Apers, S. et al.: Curr. Med. Chem., 2003; 11, 1345-1359.
23. Naghii, M. R.: Mil. Med., 2002; 167, 573-575.
24. Kumar, O., Sugendran, K., Vijayaraghavan, R.: Chem. Biol. Interact., 2001; 134, 1-12.
25. Vijayaraghavan, R., Gautam, A., Kumar, O. et al.: Indian J. Exp. Biol., 2006; 44, 821-831.
26. McClintock, S. D., Hoesel, L. M., Das, S. K. et al.: J. Appl. Toxicol., 2006; 26, 126-131.
27. Morad, Y., Banin, E., Averbukh, E. et al.: Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 2005; 46, 1640-1646.