

VOLNÉ RADIKÁLY, ANTIOXIDANTY, JEJICH ÚČINKY A MOŽNOST JEJICH SLEDOVÁNÍ METODAMI FORT A FORD

MUDr. Václav Holeček CSc.

Volné dusíkaté radikály byly na naší zemi již v době, kdy zde ještě neexistoval život. Se vznikem života pak se objevily volné kyslíkové radikály. Není tedy divu, že volné radikály zasahují do mnoha životních funkcí i do vzniku mnoha nemocí. Na druhé straně pak se organismus naučil je i využívat ke svému prospěchu.

Co jsou to volné radikály? Definice zní, že jsou to molekuly, které mají ve své valenční sféře jeden nebo více nepárových elektronů. Taková molekula však bývá značně nestabilní a rychle se snaží získat ze svého okolí jiný elektron do páru. Molekula, která ztratila elektron, se však stává novým volným radikálem, rychle se oxiduje (peroxiduje) a tak ztrácí některé své potřebné vlastnosti. Reakce probíhají značně rychle, např. volný hydroxylový radikál ($\text{OH}\cdot$ – tečka značí volný elektron) má poločas svého trvání jen 10^{-9} s, radikál superoxid ($\text{O}_2^{\cdot-}$) 10^{-5} s. Řetězová reakce trvá tak dlouho, dokud se volný radikál nesetká s tzv. antioxidantem, který reakci výrazně zpomalí, až zastaví, nebo s jiným volným radikálem, s nímž pak vytvoří elektronový pár. Volné radikály se mohou rovněž zachytit na molekuly, které jejich volný elektron kryjí, takže reakce neprobíhá (quenching) nebo se vyloučit z organismu např. močí.

Látky, které mají podobné vlastnosti jako volné radikály, ale nemají nepárový elektron, společně s volnými radikály patří pod název **ROS** (reactive oxygen species). Mezi OS patří např. peroxid vodíku nebo singletový kyslík. Peroxid vodíku poškozuje molekuly i vzdálenější, protože proniká i přes membrány a zaniká až potom, co provede oxidaci. V přítomnosti transičních kovů (Cu, Fe, Ni, Al aj.) Fentonovou reakcí z něj vzniká volný hydroxylový radikál. Singletový kyslík ($^1\text{O}_2$) je energeticky bohatý. Ukazuje se, že singletový kyslík je příčinou arytmií po infarktu myokardu.

Poločasy volných radikálů ve zdrcující většině jsou nesmírně krátké, proto řetězová reakce probíhá velice rychle. Příklady poločasů:

Hydroxylový radikál ($\text{OH}\cdot$) 10^{-9} s

Superoxidový radikál ($\text{O}_2^{\cdot-}$) 10^{-6} s

Singletový kyslík ($^1\text{O}_2$) 10^{-6} s

Alkoxylový radikál ($\text{RO}\cdot$) 10^{-6} s

Volných radikálů je mnoho druhů a proto není žádný antioxidant, který by chránil před všemi. Proto při antioxidační terapii se musí využívat směsi antioxidantů.

Jak vznikají volné radikály?

VR vznikají jednak exogenně, jednak endogenně v organismu. Příčinou vzniku exogenních VR jsou x-paprsky, UV světlo, radiace, rtg záření, zplodiny aut, kouření, znečištění vzduchu, ozón, ale i příjem a úprava některých potravin, oxidační, ale i psychický stres, některé chemikálie, vzestup transičních kovů v prostředí aj. Endogenní VR vznikají v organismu při metabolismu řady látek (puriny, katecholaminy, při vzniku prostaglandinů aj.). Hlavním zdrojem se jeví jednoelektronová oxidace vodíku na vodu. Sice hlavní oxidační dráha vodíku vede přes cytochromový systém, ale v závažných onemocněních jako je sepse, probíhá jednoelektronová oxidace jako hlavní cesta. Velké množství volných radikálů se uvolňuje např. rozpadem fagocytů, účinkem tzv. AGE-látek, v reperfuční fázi po předchozí ischemii, u hyperglykemie (diabetes), u renální nedostatečnosti aj.

Některé reakce působené volnými radikály

Lipoperoxidace: postihuje lipidy, které mají tzv. konjugované dvojně vazby (tj. alespoň dvě dvojně vazby mezi vazbou jednoduchou, obecně bývají označovány PUFA – více (poly)-nenasyčené mastné kyseliny). Vznikají z nich metabolity, z nichž jsou významné některé aldehydy (malondialdehyd, 4-hydroxynonenal aj.). Aldehydy mají kancerogenní účinky. Malondialdehyd se však rychle odbourává a váže na aminoskupiny bílkovin, čímž pevně spojí dvě části bílkovin a tím poškodí jejich funkci. V krvi jeho hladina kolísá rychle podobně jako glykemie. Lipofusciny se hromadí např. pod kůží a vytváří její stařecké zabarvení. Oxidovaný LDL-cholesterol podporuje vznik aterosklerózy atd.

Volné radikály uvolňují z membránových lipidů kyselinu arachidonovou, z níž vznikají prostaglandiny, prostacykliny, leukotrieny, tromboxany podporující srážení krve, ale i malondialdehyd.

Oxidace proteinů: probíhá podobně jako lipoperoxidace. Lze ji sledovat stanovením karbonylů. Oxidované proteiny jsou v těle jakoby označeny k odbourání, což provádí polypeptid ubiquitin.

Vznik AGE látek: AGE-látky (advanced glycosylation end-products, látky pokročilé glykace) vznikají reakcí proteinů s glukózou za současné oxidace volnými radikály. Rovněž dochází ke spojení mezi řetězci bílkovin (křížové vazby), ale i ke vzniku některých nových sloučenin. Vazbou AGE na receptor (RAGE) dochází k odbourávání AGE-látek, ale to je pomalejší než jejich vznik, navíc vzniká oxidační stres. (Oxidačním stresem nazýváme stav, kdy převažují volné radikály nad antioxidační obranou). AGE-látky se hromadí hlavně v bílkovinách, které mají dlouhou dobu přežívání v organismu jako nervový myelin, sítnice, glomerulární membrána v ledvinách a cévní endotel. (Tomu odpovídají komplikace diabetu – záněty nervů, slepota, ledvinná nedostatečnost a gangrény dolních končetin). Vznik AGE-látek brzdí např. guanidin, kyselina acetylosalicylová nebo fosfopyridoxal.

Mutace DNA a RNA: Oxidací aminoskupiny např. na adeninu vznikne OH- skupina, na kterou se místo tyminu váže cytosin a tak dochází k mutacím, které mohou vést ke zhoubnému bujení.

Vznik kyseliny chlorné a chloraminů: Z peroxidu vodíku účinkem myeloperoxidázy vzniká silně oxidační kyselina chlorná, která reakcí s aminy tvoří chloraminy. Kyselina chlorná zabíjí mikroorganismy, aktivuje proteázy, ale oxiduje i LDL-cholesterol, čemuž nezabrání

ani vitamin C a E. Reakcí s peroxidem vodíku vytváří singletový kyslík. Účinek kyseliny chlorné inhibuje např. methionin. Chloraminy působí cytotoxicky, oxidují SH-skupiny, inaktivují cytochromy a zvyšují permeabilitu.

Příznivé účinky volných radikálů: Za statisíce let se organismus naučil i využívat volné radikály ke svému prospěchu. V bílých krvinkách, zvláště v makrofagách a T-lymfocytech je nahromaděno velké množství volných radikálů, které zabíjí bakterie, kvasinky, viry a parazity, T-lymfocyty pak i nádorové buňky. Osteoklasty remodelují kosti, volné radikály ve spermiích umožňují fertilizaci vajíčka apod.

Antioxidantů je velké množství, lze je rozdělit různým způsobem, např. na hydrofilní (rozpustné ve vodě), lipofilní (rozpustné v tucích), intracelulární, extracelulární, na přirozené nebo uměle vyrobené (např. některé léky) atd. Podle preventivních účinků je lze rozdělit na:

1. odstraňující neradikálové hydroperoxydy a peroxid vodíku (např. kataláza, glutathionperoxidáza, glutathion-S-transferáza)
2. chelátově vážící kovy (např. transferin, haptoglobin, hemopexin, ceruloplazmin, albumin aj.)
3. blokující aktivní kyslík (např. SOD – superoxid dismutáza (enzymaticky zpracovává superoxid na peroxid vodíku), karotenoidy, vitamin E (blokuje singletový kyslík-¹O₂).
4. scavengery zastavující řetězové reakce vzniku volných radikálů. Volné radikály atakují okolní molekuly a odebráním elektronu, aby získaly chybějící elektron, vytváří z nich nové radikály, takže vzniká řetězová reakce. Jsou to např. lipofilní- vitamin E, ubichinol, karotenoidy-, hydrofilní- vitamin C, kyselina močová, bilirubin, albumin-.
5. enzymy opravující a rekonstruující poškozené membrány (např. lipáza, proteázy, enzymy opravující DNA, transferázy).
6. adaptační enzymy, které jsou generovány podle potřeby a účinkují na potřebném místě v pravý čas a v potřebné koncentraci.

Důležitý je termín **oxidační stres**, což je relativní převaha volných radikálů (FORT) nad oxidační obranou (FORD).

Metody a význam stanovení FORT a FORD

Metod stanovení volných radikálů a antioxidační kapacity je těch více. Nejpřesnější, ale i nejdražší, je stanovení pomocí EPR (elektronové paramagnetické rezonance). Každá z dalších metod je založena na jiném principu a lze je tedy jen těžko srovnávat. Teprve metody **FORT pro stanovení volných radikálů a FORD pro stanovení antioxidační kapacity** představují relativně levnou a rychlou metodu stanovení oxidačního stresu, kterou lze provádět i u lůžka pacienta. Metody FORT a FORD nevyžadují drahé přístrojové vybavení, metody jsou standardizované (CE), vyžadují malé množství biologického materiálu, je možnost i bed-side analýzy. Výsledné interpretace mohou přinést úspory léků či potravinových doplňků, včas upozornit na nebezpečí vzniku nebo rozvinutí řady chorob a na včasné nasazení terapie.

FORT metoda je založena na schopnosti transientních kovů v přítomnosti hydroperoxidů katalyzovat tvorbu kyslíkových radikálů a pak s CrNH₂ vytvářet barevný děletrvající kation, jehož intenzita zabarvení je úměrná oxidačnímu stavu vzorku a lze ji měřit fotometricky.

FORD metoda používá dodané barevné kyslíkové radikály, které antioxidanty ve měřeném vzorku redukují, což se projeví ekvivalentní úbytkem zabarvení, které lze měřit fotometricky. Tímto způsobem není stanovována kyselina močová.

Fyziologické rozmezí výsledků v krvi je zatím stanoveno u metody FORT < 310 (= 2,35 mmol/l H₂O₂), u metody FORD pak 1,07 – 1,53 mmol/l ve vodě rozpustného vitamínu E (Troloxu). Určitou interpretaci poskytuje následující tabulka:

OS = oxidační stres

Závažnost OS stoupá →	OS v progresi	
Kompenzovaný OS	Zvýšené riziko OS	330
Normální stav	Latentní OS	310

FORT (jednotky) ↓

← FORD v mmol/l Troloxu

1,53 1,07

Vedle normálního nálezu lze tedy uvažovat podle výsledků na

- latentní* (př. FORT -200 F.U.= 1,52 mmol/l H₂O₂, FORD – 0,90 mmol/l Troloxu),
- kompenzovaný oxidační stres* (př. FORT – 320 F.U.=2,43, mmol/l H₂O₂, FORD – 1,35 mmol/l Troloxu),
- na zvýšené riziko oxidačního stresu* (př. FORT – 320 F.U. =2,43 mmol/l H₂O₂, FORD – 0,90 mmol/l) či
- na oxidační stres v progresi* (př. FORT – 370 F.U.= 2,80 mmol/l H₂O₂, FORD -1,1 mmol/l Troloxu).

Vysoký oxidační stres nejčastěji nalzáme v těhotenství, u HRT, vytrvalostním výkonu, ihned po fyzické námaze u netréovaných osob, u farmakoterapie (např. antibiotiky, cytostatiky, analgetiky), u zánětů, kouření a nevyvážené dietě s nesprávnými návyky.

Po podání antioxidantů též může sice stoupat FORD, ale pokles FORT mívá určité zpoždění. Při málo účinné byt' vysoké antioxidační hladině může být FORT zvýšený. Je třeba vzít v úvahu, že náhlý vzestup volných radikálů (např. v reperfuční fázi po předchozí ischemii) může poškodit mnoho biomolekul a tkání, ale v časovém odstupu se mohou hladiny FORT a FORD normalizovat, dříve FORT.

Oxidační stres má základní důležitost pro preventivní medicínu a péči o zdraví, pro rozhodnutí o způsobu terapie a její kontrolu. Je třeba brát v úvahu individuální rozdíly lidí způsobené dědičností, dietou, okolním prostředím atd., což má pochopitelně vliv i na délku života, vznik nemocí apod. Sledování hodnot FORT a FORD po určitých časových intervalech má tedy své oddůvodnění.

Nízké hladiny FORD mají nejčastěji příčinu v:

sníženém příjmu (dieta, hypovitaminóza, malabsorpce, coeliakie)

snížené absorpci (genetické deficity)

snížené utilizaci (neúčinný enzymatický systém)

zvýšené produkci volných radikálů

metabolické nevyrovnanosti

Jaké hodnoty FORT nalézáme u některých stavů:

Chronická venózní insuficience – u mužů 388 F.U. = 2,94 mmol/l H₂O₂, u žen – 299 F.U. = 2,27 mmol/l H₂O₂

Chronická bronchitida – 338 ± 42 F.U. = 2,56 ± 0,32 mmol/l H₂O₂

Astma – 350 F.U. = 2,65 mmol/l H₂O₂

CHOPN – 386 ± 59 F.U. = 2,93 ± 0,45 mmol/l H₂O₂

Kuřáci – 340 ± 52 F.U. = 2,58 ± 0,39 mmol/l H₂O₂

Karcinom plic – 500 ± 50 F.U. = 3,79 ± 0,38 mmol/l H₂O₂

Solidní tumory – 496 ± 92 F.U. = 3,76 ± 0,70 mmol/l H₂O₂

Kontracetivní pilulky – 590 ± 30 F.U. = 4,473 ± 0,23 mmol/l H₂O₂

Novorozenci – 140 (v umbilikální krvi) = 1,06 mmol/l H₂O₂

Absorpce antioxidantů a jejich vylučování

Podávání antioxidantů však nemusí být účinné, pokud jejich absorpce z gastrointestinálního traktu není dostatečná. Někteří autoři doporučují nízké dávky antioxidantů 5x denně. Pokud to není možné, pak dodávat antioxidanty suplementací. U některých nemocí se antioxidanty vyplavují do krve ze tkání, kde je jejich nedostatek. Důležité jsou interference při vstřebávání, jejich metabolismus v organismu, který může snižovat jejich hladinu, ale i zvyšovat jejich účinnost, ovlivňovat do kterých orgánů se ukládají, jak dlouho se udrží zvýšená antioxidační kapacita. Antioxidanty rozpustné ve vodě je možné podávat kdykoliv s vodou. Antioxidanty rozpustné v tucích je lépe dávat po jídle, aminokyseliny na lačno (cca 3 hodiny), minerály -s výjimkou zinku- při jídle, není vhodné kombinovat podání vitamínu C se železem, rostlinné antioxidanty jsou vhodné zapít čajem. I rychlost vylučování močí a stolicí je důležitá. Původ antioxidantů bývá důležitý, přirozené antioxidanty bývají účinnější než syntetické. První antioxidant, který je při

oxidačním stresu spotřebován je redukováný glutathion. Buňky jako obrannou reakci zvýší jeho syntézu, ale ta často nestačí. Stárnutím klesá schopnost tenkého střeva vstřebávat mastné kyseliny, cukry, ale i některé antioxidanty. Stanovením FORD se můžeme přesvědčit, jak podání antioxidantů je účinné.

Stanovení oxidačního stresu pomocí FORT a FORD je důležité pro mnoho nemocí. V následujícím se budeme zabývat onemocněním **diabetes mellitus**.

Volné radikály, antioxidanty a diabetes mellitus

O tom, že volné radikály a tím i antioxidanty jsou u diabetu významné nelze pochybovat. Použijeme-li na PubMed heslo „Diabetes and free radicals“ objeví se více než 3250 citací!

Pochopitelně tedy v následujícím článku nelze ani zdaleka vyčerpat tuto problematiku, takže se alespoň pokusíme mínit nejdůležitější fakta, týkající se oxidačního stresu.

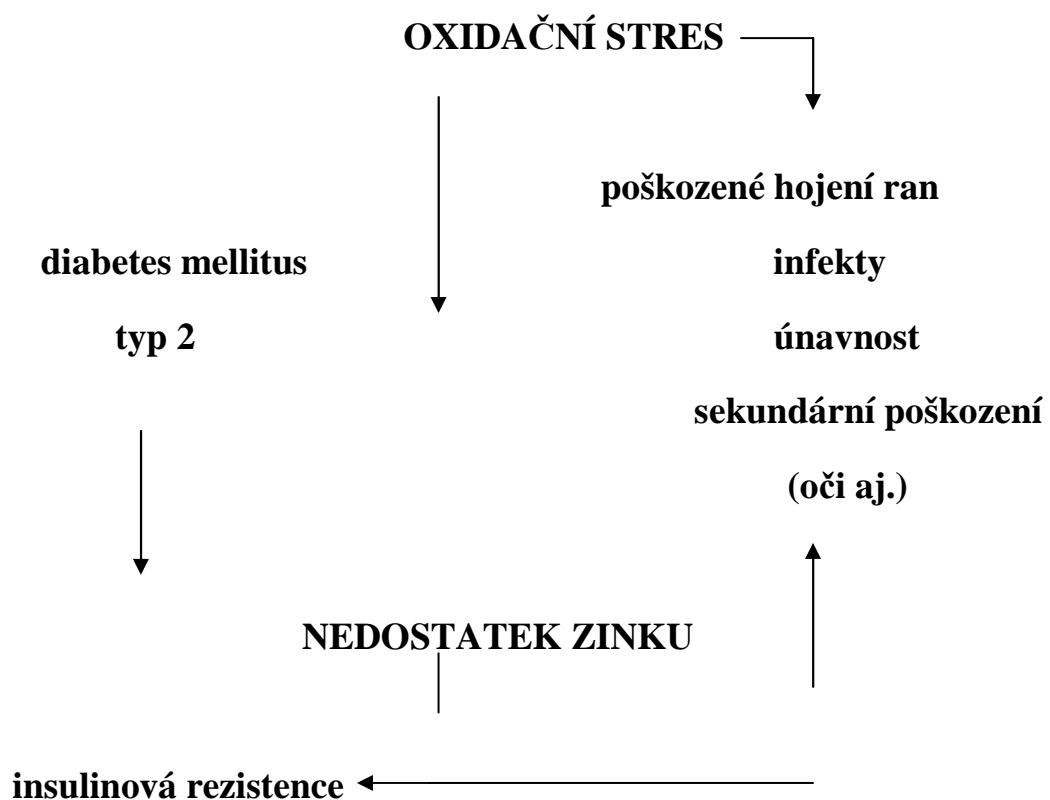
Hyperglykemie podporuje vznik oxidačního stresu a vzestup volných radikálů. Vysoká hladina superoxide stimuluje produkci enzymu superoxid dismutázy. Je známo, že u diabetu je zvýšená lipoperoxidace (hladina TBARS a malondialdehydu), vznikají AGE-látky advanced glycosylation end-products) tzv. glykoxidací (účinkem glukosy a VR). Protože je extrémně snížena aktivita glutathionperoxidázy (GPx), vážne odbourávání H_2O_2 , který poškozují β -buňky pankreatu, které jsou nedostatečně chráněny před oxidačním stresem. I protilátky proti β -buňkám pankreatu působí vznik volných radikálů. Pokles pH zvyšuje účinek volných radikálů (hromaděním neoxidovaných organických kyselin klesá pH). V prediabetickém stadiu bývá vysoká hladina kyseliny močové, při vzniku DM klesá. IL-1 z makrofágů zvyšuje selektivně (NO.) v β -buňkách \rightarrow poškození enzymů, obsahujících Fe a S \rightarrow \downarrow produkce energie. Antioxidanty snižují glykovaný Hb, ale ne glykemii. AGE látky se hromadí v proteinech s dlouhým poločasem, které jsou v retině, myelinu, cévním endotelu, v glomerulární membráně. Diabetické komplikace následují. Tvorbě glykovaných proteinů brání fosfopyridoxal, guanidin, kyselina acetylsalicylová, D-lysin (jeho glykací však vzniká karcinogen). Extrakt z česneku a S-allylcystein jsou antioxidanty a též chrání před tvorbou AGE látek. Vznik AGE-látek je rychlejší než jejich odbourávání, které probíhá po vazbě na receptor (RAGE). Tato vazba však podporuje produkci dalších volných radikálů. AGE-látky působí lipoperoxidaci, křížové vazby (ty mohou ovšem vznikat i jiným způsobem, např. vazbou malondialdehydu na zbytky lysinu), inaktivují (NO.), stimulují tvorbu cytokinů, podporují vznik VR, působí proliferaci buněk, podporují koagulopatii. DM je rizikovým faktorem pro vznik Alzheimerovy choroby. Interakce AGE látek – zvláště odvozených od glycerinaldehydu - s receptory pro AGE (RAGE) působí vzestup ROS látek, což zřejmě hraje roli v patogeneze této choroby.

U DM paradoxně při hyperglykemii je nedostatek energie pro její nedostatečné využívání a hypoxie, která působí pokles aerobní glykolýzy. Současně je nedostatek redukčního potenciálu, hlavně NADPH, který je intracelulárně spotřebováván volnými radikály a metabolickými pochody. Ztráty NADPH souvisí s endotelovou buněčnou dysfunkcí. Mechnizmy ztráty jsou např.:

1. Oxidovaný glutathion (GSSG) je redukován glutathion reduktázou pomocí NADPH na redukovaný glutathion (GSH)
2. Z argininu NO syntázou pomocí NADPH vzniká nitroxid (NO.)
3. Z prostaglandinu G₂ (PGG₂) oxidací NADPH vzniká prostaglandin H₂ (PGH₂)
4. Z fruktózy enzymem aldoso reduktázy pomocí NADPH vzniká sorbitol aj.

U diabetu tedy je obvykle zvýšená hladina FORT a snížená hladina FORD. Podání antioxidantů sice snižuje glykovaný hemoglobin, ale nikoliv glykemii, protože antioxidanty snižují jen glykaci proteinů.

Důležitý je i zinek. Je to intracelulární prvek, který se zvýšenou měrou při stresu z buněk vyplavuje do extracelulární tekutiny. U diabetu je vylučován zvýšenou měrou močí, je zhoršená jeho rezorpce z potravy, proto je zvýšená jeho potřeba. Zinek se váže na fytyáty ze zeleniny, tím je blokován a jeho hladina v organismu klesá. Vztah mezi Zn, oxidačním stresem a diabetem mellitus vyjadřuje tabulka:



Další důvody pro stanovování FORT a FORD u diabetu:

Těž u diabetiků 1. typu je snižená hladina GSH v erytrocytech. Hyperglykemie i po normalizaci hladiny glukózy zanechává po týdny ještě zvýšené hladiny některých markerů oxidačního stresu. Antioxidační kyselina α -lipoová tyto markery snižuje. Dále u diabetu je nadbytek superoxidu, který reaguje s oxidem dusnatým, tím snižuje jeho hladinu, vzniká vazokonstrikce a hypertenze. U diabetu bývá poškozena erektilní funkce vlivem zvýšeného oxidačního stresu a poklesem oxidu dusnatého. Oxidační stres je klíčový pro vznik diabetické nefropatie. Ovšem ukazuje se, že podávání vitaminů není ideální, je třeba vytipovat antioxidanty, které pronikají v dostatečné míře intracelulárně. Antioxidanty snižují i proteinurii u diabetu.

Některé teratogeny působí oxidační stres u rozvíjejícího se embrya zvláště v období organogeneze. Nízká hladina antioxidantů u diabetu zvyšuje nebezpečí vážného poškození plodu, antioxidanty mohou efektivně snížit nebezpečí kongenitálních anomálií.

U gestačního diabetu bývá zvýšená hladina železa, což podporuje Fentonovu reakci pro vznik volného hydroxylového radikálu.

Závěr

Stanovení oxidačního stresu pomocí metod FORT a FORD může mít nepochybně velký význam jak pro posouzení diabetu, tak pro případnou terapii antioxidanty. Absence oxidačního stresu ušetří zbytečné podávání antioxidantů, naopak přítomnost oxidačního stresu a následné podání vhodné směsi antioxidantů může pomoci zabránit některým diabetickým komplikacím.