

Antioxidancia

prof. RNDr. Luděk Beneš, DrSc.

Antioxidancia jsou všeobecně látky, zabraňující oxidaci jiné sloučeniny tím, že se samy oxidují. V reakci s reaktivními toxickými metabolity kyslíku vytváří relativně stabilní a netoxické produkty a současně mohou zabránit oxidaci některé z cílových molekul. Antioxidační látka by neměla spouštět další radikálové reakce, při nichž se tvoří řetězovitě další produkty charakteru volných radikálů nebo šířeji nazvaných reaktivních forem kyslíku. Zabrzděním těchto procesů se zabrání iniciaci stavů, vedoucích k vývoji řady nemocí. Klíčová slova: volné radikály, reaktivní formy kyslíku, antioxidanta.

Úvod

Volné radikály představují spojení dvou slov, charakteristických pro řadu intenzivně zkoumaných oblastí. Slovo „volný“ zvýrazňuje reaktivitu porovnáním k vázaným radikálům ve stabilních molekulách. Gomberg v r. 1900 prokázal disociaci hexafenylethanu na dva trifenylmethyl radikály žlutého zbarvení, udržované v určité stabilitě rezonancí. Prokázal něco do té doby neskutečného – trojvazný uhlík. Laukamp (v r. 1968) definitivně uzavřel spor tím, že nejde o chemickou anomálii. Důkaz existence volných radikálů přinesli Paneth a Hofeditz (6) v r. 1929 termickým rozkladem alkylových, především tetramethylolova při teplotách 350–450 °C. Radikálové reakce jsou charakterizovány řetězovitým průběhem, nevyžadujícím téměř žádnou dodávku energie. Radikálové meziproducty mají společný rys. Radikál se regeneruje v posledním kroku reakce, takže se může zúčastnit reakce téhož typu. I když je reaktivnost radikálů značně rozdílná, lze říci, že platí tzv. „termodynamická pravda“: reakce probíhá tím samovolněji, čím více dochází ke vzniku pevnější vazby. Se vznikem vazeb dojde obvykle k zániku volných radikálů, neboť se dva radikály mohou spojit a vytvořit novou sloučeninu, která ovšem nemusí být pro organismus žádoucí a netoxická. Většinou volný radikál elektron odevzdá, vytvoří další radikál a zahájí řetězovou reakci. Iniciační molekula může teoreticky způsobit přeměnu nekonečného množství substrátu, a tak po iniciačním stadiu následuje stadium propagační a nakonec terminační.

Reaktivní toxické formy kyslíku a reakce volných radikálů

Uvolňování volných radikálů do prostředí a reakce s nízkou energetickou náročností

mohou řetězovitě poškozovat buňky organismu a následně vyvolávat patofyziologické změny. Peroxidace, zvláště vyšších mastných kyselin a lipidů, která je těmito reakcemi iniciována, je dnes nepochybně přiřazována ke vzniku mnohých chorob i k procesům stárnutí. Navíc dochází ke katalýze tvorby reaktivních forem kyslíku působením přechodných kovů. Tuto reakci první zachytil již v roce 1894 Fenton (3), po němž byla nazvaná, a dále Haber a Weiss (4), popisující reakci, při níž za přítomnosti stopových množství kovů (železa nebo mědi) a za účasti např. peroxidu vodíku a tzv. superoxidaniont radikálu ($O_2^{\cdot-}$) vznikají mnohem nebezpečnější a reaktivnější hydroxylové radikály ($\cdot OH$). Ty ovšem mají poločas životnosti 10^{-9} sec a mohou tedy působit pouze v bezprostředním okolí svého vzniku. Téměř ve všech buňkách přítomný plynný messenger oxid dusnatý ($NO\cdot$), který je z chemického hlediska též radikálem, vytváří ochotně peroxyinitrit aniont $ONOO^-$ s poločasem životnosti až několik vteřin. Ten se svou reaktivností řadí přibližně hned za $\cdot OH$. Nahromadění toxických metabolitů kyslíku (ROS-reactive oxygen species) v organismu a jejich vyšší hladiny vytváří tzv. oxidační stres.

Co jsou reaktivní formy kyslíku a co volné radikály? Tyto pojmy se většinou směřují, ač nejsou vždy totožné. Volné radikály jsou atomy, molekuly nebo sloučeniny, které mají jeden nebo i více nepárných elektronů, schopných samostatné existence, a to třeba i na krátký čas. Jak už bylo uvedeno, nesprávně se sem zařazují i sloučeniny kyslíku anebo dusíku, které volnými radikály nejsou, pouze se do řetězce těchto procesů velmi lehce zapojují anebo vznikají. Všechny jsou však charakterizovány vysokou reaktivností a většinou i toxicitou. Do skupiny neradikálů patří např. peroxid vodíku i jiné peroxidy. Neradikálového

charakteru je tzv. singletový kyslík: Δ -singletový a σ -singletový kyslík. Odlišují se tím, že Δ -singletový kyslík má elektrony opačného spinu na stejném orbitalu a σ -kyslík na rozdílných orbitalech. ROS však nepůsobí v organismu pouze patologicky. Naopak jsou i fyziologickou součástí organismu, která udržuje správnou rovnováhu organismu, zabíjí bakterie nebo viry. Cestou volnoradikálových reakcí probíhá celá řada pochodů, zvláště metabolických. Přirozeným volným radikálem je např. ($O_2^{\cdot-}$) přičemž jeho rovnováhu v organismu udržuje enzym superoxiddismutáza, podobně peroxidu vodíku enzym kataláza. Nejsou to však jediné systémy, které se podílejí na udržování fyziologických hladin reaktivních forem kyslíku nebo dusíku. Patří sem mnoho dalších látek-antioxidancií, tedy látek, zabraňujících oxidaci jiných sloučenin tím, že se samy oxidují. V reakci s reaktivními toxickými metabolity kyslíku vytváří relativně stabilní a netoxické produkty a současně mohou zabránit oxidaci některé z cílových molekul. Antioxidant by neměl spouštět další radikálové reakce, při nichž se tvoří řetězovitě další produkty charakteru volných radikálů nebo obecně reaktivních forem kyslíku a měl by zabránit stavům, vedoucím k vývoji některých nemocí.

Přirozené ochranné systémy

Proti působení reaktivních metabolitů kyslíku má organismus vybudovaný ochranný systém, který snižuje nebezpečí jejich působení, a to mechanismy, které brání tvorbě volných radikálů, mechanismy vychytávající již vytvořené volné radikály a opravné systémy, které odstraňují poškozené molekuly z organismu.

K první skupině lze přiřadit systémy fyziologicky zastoupené enzymy (kataláza nebo peroxidáza), dále enzymy inhibující katalyticky vytvářené volné radikály anebo ROS např. xanthioxidáza a systémy eliminující volné ionty přechodných prvků, např. železa nebo mědi tím, že je vážou do proteinů typu feritinu, transferinu, albuminu anebo přímo zabezpečují vychytání nevázaných kovů chelatačními činidly.

Další skupinu tvoří ochranné molekuly, které jsou schopné vychytávat ROS. Označují se jako vychytávače-scavengers, které volný radikál zachytí a přemění na neradikálovou formu, dále lapače-trappers, schopné zachytit radikál a přeměnit jej na stabilní formu a zhášeče – quenchers, které zhášejí reaktivitu např. singletového kyslíku.



Třetí skupinou jsou ochranné systémy, především reparační, které odstraňují molekuly, poškozené reaktivními formami kyslíku. Zde jsou zastoupeny některé peptidázy, které specificky likvidují poškozené (označené) molekuly nebo jejich štěpy, a to i prostřednictvím iniciace apoptózy například cestou aktivace kaspáz. Dále sem přináší lipofilní enzymy typu fosfolipáz, které odštěpují oxidačně poškozené vyšší karboxylové kyseliny a enzymy např. reparační endonukleázy. Výsledkem působení všech těchto antioxidačních systémů je účinná ochrana organismu před oxidačním působením ROS, a tím i před oxidačním stresem (2). Fyziologicky zastoupenená antioxidantancia obvykle nemůžeme přímo ovlivňovat. Též se prakticky nepoužívají ve formě léčiv i když pokusy např. se superoxidodismutázou se uskutečnily. Jinou věcí ovšem je dodávka látek v organismu deficientních anebo v období, kdy už je aktivita obranných enzymatických systémů snížena, jak je tomu při chorobných stavech, při zvýšené námaze i ve stárnoucím organismu anebo za určitých specifických podmínek, kdy některé mikroelementy v potravě i ve vodě chybí.

Antioxidanty nízkomolekulární

Kromě enzymových a neenzymových vysokomolekulárních antioxidantů, mezi které patří nejen feritin, albumin, ale též bilirubin, který je zařazován spíše do nízkomolekulárních antioxidantů, jsou předmětem zvýšeného, a to zvláště komerčního zájmu tzv. antioxidantů nízkomolekulární. K nejznámějším patří kyselina askorbová, vitamin C, který svými účinky dokáže odstraňovat hydroxylové radikály, superoxidy, singletový kyslík i organické radikály. Mnohem méně je známa jeho vlastnost prooxidační, která může působit v jistém smyslu opačně, zvláště jsou-li v organismu přítomné přechodné kovy (železo, měď) v „katalyticky účinné“ formě. Za určitých podmínek se mohou tyto ionty uvolňovat z fyziologicky přítomných proteinových struktur a katalyzovat tvorbu velmi agresivního hydroxylového radikálu. V tomto případě je dokonce nedostatek kyseliny askorbové výhodný. Je to pochopitelně závislé i na dávce. Organismus, který má všestranný příjem potravy, zvláště s dostatečným množstvím ovoce a zeleniny, hypovitaminózou tohoto typu prakticky netrpí. Proto zvláště dětský organismus, vystavovaný zejména v nápojích, kromě vysokých hladin cukru i značným dávkám vitaminu C, je při-

nejmenším nepřírozeně a zbytečně zatěžován. Řada vědeckých prací tuto situaci velmi kriticky posuzuje a důrazně nabádá k řešení vznikajícího zdravotního problému. „Klamná“ reklama zmíněnou situaci dále prohlubuje. Bez ohledu na rozpustnost jednotlivých antioxidantů, dalším nejznámějším a nejpoužívanějším antioxidantem je vitamin E resp. skupina osmi tokoferolů, z nichž nejúčinnější je α -tokoferol. Nejvyšší obsah je v rostlinných olejích, zvláště olivovém. Denní dávka vitaminu E by neměla překročit 200–600 mg. Tokoferoly jsou značně lipoidní látky, ve vodě prakticky nerozpustné, které jsou velmi dobrými odstraňovači např. hydroxylových radikálů, peroxylů a dalších reaktivních forem kyslíku a dusíku, přičemž se samy stávají radikály. Ochranný efekt vitaminu E se zřejmě projevuje především na lipidových složkách LDL. I zde se ukázalo, že za určitých okolností vytvořený α -tokoferolový radikál reaguje prooxidačně, a to se zbytky polynenasycených karboxylových kyselin za vzniku peroxidů. To je možné inhibovat látkami, které reagují s tokoferolovým radikálem, například s kyselinou askorbovou nebo ubichinolem-10, redukovanou formou koenzymu Q_{10} . Mnohem méně je známo, že díky fyzikálně chemickým vlastnostem, vitamin E prakticky neprochází hematoencefalickou bariérou. Z toho vyplývá, že nelze předpokládat jeho účinnost v mozku. Naštěstí máme i jiné antioxidanty, které tuto důležitou bariéru hladce překonávají. Jedním z nich je aminokyselina s thiolovou skupinou, L-cystein. Není esenciální aminokyselinou, neboť je snadno syntetizována z L-methioninu cestou transsulfurace v játrech zdravých lidí. Na druhé straně to znamená, že u lidí s poruchami jaterní funkce je omezen její zdroj. Podávání cysteinu je limitováno jeho nestabilitou a rozpustností. Vhodnou alternativou dodávky cysteinu je N-acetyl-L-cystein, (NAC) známý u nás spíše jako expektorans a mukolytikum. Je stabilnější, méně toxický a mnohem rozpustnější, než cystein. Patří do skupiny antioxidantů typu thiolů, snižujících například oxidačně nitrozační buněčné poškození při ulcerativní kolitidě (8), působí protektivně vůči lipoperoxidaci a vzniku nebezpečného aldehydu, 4-hydroxynonenalu, jednoho z konečných produktů tohoto procesu. Je i účinným inhibitorem hepatokarcinogeneze na hepatocytech (5), napravuje enzymatické systémy cytochromu P450 v metabolické detoxikaci a má řadu dalších účinků, včetně snižování oxidační zátěže během infekce *Helicobacterem pylori*, podíle-

jící se na vředové chorobě žaludku a duodena. Důležitou vlastností je i snižování hladiny lipoproteinů a též homocysteinu. Významný je jeho účinek zabraňující nebo odstraňující hepatotoxicitu vyvolanou acetaminofenonem a dalšími, zvláště antiflogisticky účinnými látkami. NAC je důležitým zdrojem cysteinu pro syntézu glutathionu, další látky se silným antioxidačním působením. Je jedním z hlavních faktorů ochraňujících organismus před oxidačními účinky reaktivních forem kyslíku a dusíku a jeho poškozením. Udrží oxidoredukční rovnováhu a napomáhá k eliminaci xenobiotik. Nepochybně se tímto antioxidačním mechanismem podílí i na zábraně vzniku některých neurodegenerativních onemocnění. Zvláště Alzheimerova choroba je kromě genetických a jiných faktorů, charakterizována mimo jiné oxidačním stresem, manifestací oxidace proteinů, lipoperoxidací, oxidací glutathionu a poklesem aktivity glutathion-S-transferázy (7). Při deficienci glutathionu je pravděpodobně narušena fyziologická obrana před vývojem řady nemocí, u kterých hladiny oxidačních toxických forem jsou zvýšeny (revmatoidní artritida, Parkinsonova nemoc, hepatitidy různého typu, cirhózy jater, septický šok, diabetes a další nemoci nebo patologické stavy (10). Glutathion je jedním z možných regenerátorů kyseliny askorbové z její oxidované formy – dehydroaskorbátu dvouelektronovou redukcí zpět na kyselinu askorbovou za současné tvorby mezi produktu, konjugátu glutathion-askorbátu (9). Glutathion a samotný NAC působí protektivně i u ischemicko-reperfučních stavů srdce. Tyto účinky jsou dokumentovány v mnoha pracích a nepochybně významný efekt těchto látek není dosud doceněn. Fyziologickým nízkomolekulárním antioxidantem je i „hormon spánku“ melatonin, epifyzární hormon, regulující denní rytmy a protektivně působícím proti oxidačnímu stresu a apoptóze. Představuje jakousi prastarou informační molekulu jednoduchých organismů a rostlin, ohlašující čas i roční časové změny, nesoucí informaci podle osvětlení. Je vychytávačem peroxidu vodíku, oxidu dusnatého, peroxynitrit aniontu a dalších reaktivních forem kyslíku, s výjimkou superoxidu. Stimuluje aktivitu glutathionperoxidázy v mozku, což je kombinovanou aktivitou s glutathionem a případně s NAC. Zajímavým účinkem je snížení abnormální nitrace β -amyloidních proteinů v mozku a inhibice jejich vzestupu při stárnutí, kdy je produkce melatoninu snížena. V této souvislosti s působením melatoninu vyvstává otázka případného protektivního

použití před vývojem Alzheimerovy choroby. Protektivně působí i před toxickými účinky různých léčiv. Výhodná je kombinace melatoninu a NAC, neboť jejich účinek vzájemně doplňuje ve spektru antioxidačních vlastností a zvyšuje regeneraci přirozených obranných systémů.

Mezi další nízkomolekulární antioxidanty patří karotenoidy, pigmenty rostlinného a mikrobiálního původu. Je jich několik set a jen asi 10% jsou provitaminy vitamínu A. Biologicky aktivní jsou především β -karoteny v konfiguraci trans. Předávkování, na rozdíl od vitamínu A, u karotenů nehrozí, neboť jejich vstřebávání ve střevě je nízké a přeměna z provitamínu A na vitamin A pomalá. Z hlediska antioxidačního účinku je významná schopnost reakce se singletovým kyslíkem a návrat excitované molekuly tohoto kyslíku do základního energetického stavu. Působí tedy jako zhašeč reaktivních forem kyslíku. Z řady prací vyplývá, že karotenoidy mohou sehrávat významnou úlohu při prevenci někte-

rých druhů rakoviny, ale řada dalších prací tuto schopnost popírá.

K antioxidantům náleží koenzym Q, ubiquinon, 2,3-dimethoxy-5-methyl-6-multiprenylbenzochinon. Působí nejen antioxidačně, ale i prooxidačně. Je významným antioxidantem nízkohustotních lipoproteinů (LDL) a často se používá jako látka zlepšující činnost srdce. Též při jeho nedostatku po intenzivní tělesné námaze anebo v průběhu stárnutí, kdy se jeho koncentrace snižuje, je vhodné potřebu doplnit. Strukturálně podobný je idebenon (2-(10-hydroxydodecyl)-5,6-dimethoxy-3-methyl-p-benzochinon, lapač volných radikálů zlepšující metabolické pochody v mozku a upravující defekty neurotransmiterového typu včetně zvyšování kapacity učení a paměti (1).

Antioxidantů je celá řada např. kyselina lipová je schopná nejen působit antioxidačně, ale chelátově vázat ionty přechodných kovů, podobně jako chelatační činidla desferoxamin B, EDTA (kyselina ethylendiaminotetra-

octová), penicilamin a další, které chelatačním účinkem váží volné železo, brání tvorbě ROS, a tím i poškození buňky a vývoji patogeních procesů. Chondroitin sulfát svými neuroprotektivními účinky, resveratrol zkoumaný jako léčivo nádorů, antioxidanty ze skupiny flavonoidů vyskytující se v barevných produktech rostlin (jahody, rybíz, ostružiny, brusinky, borůvky, hroznové víno, ale i v lékořici nebo kakaových bobech) a mnohé další obsahové látky vykazující nejen antioxidační, ale často i další účinky, které mohou zabraňovat vývoji nemoci, na jejichž tvorbě se zvýšené hladiny ROS, jejich metabolické produkty, lipoperoxidační procesy a jiné podílejí, podobně jako na procesech stárnutí.

prof. RNDr. Luděk Beneš, DrSc.

Ústav chemických léčiv
Farmaceutická fakulta VFU
Palackého 1/3, 612 42 Brno
e-mail: benesl@vfu.cz

Literatura

- Adkins JC, Noble S. Idebenone. A review of its use in mild to moderate Alzheimer's disease. *Drugs* 1998, 9: 403–419.
- Đuračková Z. Volné radikály a antioxidanty v medicíně (I), Slovak Academic Press Bratislava 1998.
- Fenton HJH. Oxidation of tartaric acid in the presence of iron. *J Chem Soc* 1894, 65: 899–910.
- Haber F, Weiss J. The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proc Roy Soc* 1934, 147: 332–351.
- Ogawa M et al. Inhibitory effects of N-acetylcysteine, S-methylcysteine, and cysteine on rats hepatocarcinogenesis by melQx. *Proc Amer Assoc Cancer Res* 2000, 42: Abstr. 4628.
- Paneth F, Hofeditz W. Über die Darstellung von freiem Methyl. *Chem Ber* 1929, 62: 1335.
- Pocernik CB, Lafontaine M, Butterfield DA. *Neurochem Intern* 2000, 36: 180.
- Seril DN, Liao J, Hoo KL, Yang CS, Yang GY. Inhibition of chronic ulcerative colitis-associated carcinogenesis in mice by N-acetyl-L-cysteine: Effects on oxidative/nitrosative damage and proliferation. *Proc Amer Assoc Cancer Res* 2001, 42: Abstr. 4647.
- Wang W, Ballatori N. Endogenous Glutathione Conjugates: Occurrence and Biological Function. *Pharmacol Rev* 1998, 50: 335–355.
- , ref.: *Drug Fut: N-Acetylcysteine*. 2001, 26: 578–579.