

REAKTYWNE RODNIKI TLENOWE - SKUTECZNOŚĆ ANTYOKSYDANTÓW W TERAPII

REACTIVE OXYGEN RADICALS – THE THERAPEUTIC EFFECTIVENESS OF ANTIOXIDANTS

РЕАКТИВНЫЕ ФОРМЫ КИСЛОРОДА - ЭФФЕКТИВНОСТЬ АНТИОКСИДАНТНОЙ ТЕРАПИИ

Marta Skiba, Agnieszka Pedrycz, Beata Cichacz

Department Histology and Embryology, Medical University in Lublin, Poland
Katedra i Zakład Histologii i Embriologii Uniwersytetu Medycznego w Lublinie

STRESZCZENIA / ABSTRACTS

Oxidative stress occurring in cells is a consequence of an excessive activity of reactive oxygen forms, resulting from an imbalance between the release of free oxygen radicals and their removal from the cell by antioxidant systems. 90% of reactive oxygen radicals emerge in mitochondrial respiratory chain during an incomplete four-electron oxygen reduction. The remaining 10% originate from different reactions occurring in the cell. The established compounds are characterised by a short half-life and are highly reactive. Sparse quantities of free oxygen radicals have a positive effect on cell functions. Oxidative stress leads to damage in cellular membranes, enzymatic and non-enzymatic proteins, as well as DNA. Therapy with antioxidants as exogenous dietary supplements aims at preventing or reducing the risk of development of diseases involving the presence of the oxygen radicals. Whether the antioxidant therapy will bring positive or negative effects depends on numerous factors that need to be considered before their inclusion in the applied treatment.

Key words: oxidative stress, free radicals, antioxidants.

Stres oksydacyjny w komórkach organizmu jest wynikiem nadmiernej aktywności reaktywnych form tlenu, wynikającym z zachwiania równowagi pomiędzy wydzielaniem wolnych rodników tlenowych, a ich usuwaniem z komórki przez systemy antyoksydacyjne. 90% reaktywnych rodników tlenowych powstaje w łańcuchu oddechowym mitochondrium, podczas niepełnej czteroelektronowej redukcji tlenu. Pozostałe 10% pochodzi z innych reakcje zachodzących w komórce. Związki które powstają mają krótki okres półtrwania i są wysoce reaktywne. Niewielkie ilości wolnych rodników tlenowych wpływają pozytywnie na funkcjonowanie komórek. Podczas stresu oksydacyjnego dochodzi do uszkodzenia błon komórkowych, białek enzymatycznych, nieenzymatycznych oraz DNA. Przyjmowanie antyoksydantów jako egzogennych suplementów diety ma na celu zapobieganie lub zmniejszenie ryzyka rozwoju chorób, w których patogenie biorą udział rodniki tlenowe. To czy terapia z zastosowaniem antyoksydantów przynosi pozytywne czy negatywne efekty zależy od wielu czynników, które należy wziąć pod uwagę podczas włączania antyoksydantów do leczenia.

Słowa kluczowe: stres oksydacyjny, wolne rodniki, antyoksydanty.

Окислительный стресс в клетках организма является эффектом чрезмерной активности реактивных форм кислорода, который получается в результате дисбаланса между секрецией свободных радикалов кислорода и выведения их из клетки через антиоксидантные системы. 90% активных форм кислорода образуется в дыхательной цепи митохондрий в течение неполного четырех электронового восстановления кислорода. Оставшиеся 10% поступает из других реакций, происходящих в клетке. Соединения, которые образуются, имеют короткий период полураспада и обладают высокой реакционной способностью. Небольшие количества свободных радикалов кислорода положительно влияют на функции клеток. Окислительный стресс приводит к повреждению клеточных мембран, белков, ферментов и неферментативного ДНК. Применение антиоксидантов в качестве экзогенных биологических активных добавок предназначено для предотвращения или снижения риска развития заболеваний, в патогенезе которых берут участие активные формы кислорода. Приносит ли терапия с антиоксидантами положительные или отрицательные эффекты зависит от многих факторов, которые необходимо учитывать при включении антиоксидантов в тактику лечения.

Ключевые слова: окислительный стресс, свободные радикалы, антиоксиданты.

ARTICLE INFO

PolHypRes 2016 Vol. 54 Issue 1 pp. 41-48

ISSN: 1734-7009 eISSN: 2084-0535

DOI: 10.1515/phr-2016-0006

Pages: 8, figures: 0, tables: 0

page **www** of the periodical: www.phr.net.pl

Typ artykułu: przeglądowy
Review article

Termin nadesłania: 20.12.2015r.

Termin zatwierdzenia do druku: 22.01.2016r.

Publisher

Polish Hyperbaric Medicine and Technology Society



WSTĘP

Aby komórka mogła funkcjonować, do wielu przeprowadzanych w niej procesów wymagana jest energia. W znacznej ilości komórka uzyskuje energię za pomocą tlenowego oddychania, które zachodzi w mitochondriach. W łańcuchach mitochondrialnych, dzięki białkom transportującym elektrony, dochodzi do redukcji cząsteczki tlenu do wody. Ponieważ jest to reakcja egzoergiczna, wytwarza się podczas niej energia, mogąca później być wykorzystana przez komórkę do innych procesów.

Cząsteczka tlenu nie zawsze ulega pełnej czteroelektronowej redukcji. Jeżeli zostanie zredukowana przez mniej niż cztery elektrony, powstają cząsteczki zawierające przynajmniej jeden niesparowany elektron na zewnętrznej powłoce elektronowej – rodniki tlenowe (reactive oxygen species ROS). Do reaktywnych substancji tlenowych zalicza się nie tylko wolne rodniki tlenowe ale również związki mające zdolność ich generowania. Reaktywne produkty tlenowe to: rodnik ponadtlenkowy (O_2^*), ozon (O_3), nadtlenek wodoru (H_2O_2) i rodniki hydroksylowe (OH^*). Do reaktywnych produktów azotu należą: tlenek azotu (NO), nitroksyl ($NO\cdot$), nitrosonium (NO^+), S-nitrozotiole (RSNOs), peroksynitraty ($OONO\cdot$) oraz kompleksy nitrozylu żelaza [1].

Wszystkie są wysoce reaktywne i mają krótki okres półtrwania, dążą do sparowania elektronów przez oddanie lub odebranie ich innym cząsteczkom. Reagują one w sposób niespecyficzny ze składnikami komórek, modyfikując je i uszkadzając. Prawie 90% z nich powstaje w łańcuchu oddechowym, natomiast pozostałych 10% źródłem są: reakcje katalizowane przez oksydazy, cytochrom P-450, procesy hydroksylacji niektórych ksenobiotyków, promieniowanie jonizujące, jony metali przejściowych, zanieczyszczenia środowiskowe, i wiele innych czynników [2].

ROLA RODNIKÓW TLENYCH W ORGANIZMIE-ZMIANY W BIAŁKACH

Zmiany oksydacyjne w białkach, spowodowane przez wolne rodniki i reaktywne formy tlenu oraz azotu obejmują: tworzenie wodoronadtlenków białek, hydroksylację reszt aminokwasów aromatycznych i alifatycznych, nitrowanie reszt aminokwasów aromatycznych, utlenianie grup $-SH$, utlenianie reszt metioniny, przekształcanie niektórych reszt aminokwasów w pochodne karbonylowe, fragmentację łańcucha polipeptydowego czy też tworzenie wiązań krzyżowych [3].

ROS w warunkach homeostazy, uwalniane w ilościach fizjologicznych odgrywają w komórce pozytywną rolę: biorą udział w procesie fosforylacji białek, regulacji ekspresji genów, uczestniczą w eliminacji drobnoustrojów. Tlenek azotu oraz nadtlenek wodoru biorą udział w sygnalizacji komórkowej, ich wysokie stężenie prowadzi do apoptozy, niskie natomiast do proliferacji komórki [4]. Reaktywne formy tlenu odgrywają też istotną rolę w immunologii. Granulocyty, monocyty oraz makrofagi wykorzystują je poprzez zjawisko „wybuchu tlenowego” do eliminacji patogenów.

Nazwa ta powstała ze względu na kilkudziesięciokrotny wzrost zużycia tlenu podczas tego procesu. W jego wyniku powstają duże ilości

INTRODUCTION

In order to ensure the correct functioning of a cell, a proper energy supply needs to be ensured for the numerous processes that take place in it. To a large extent a cell receives energy through oxygen respiration, which takes place in mitochondria. Within mitochondrial chains, thanks to electron transporting proteins, oxygen molecules are reduced to water. Since this is an exoergic reaction, it generates energy that may later be used by the cell for other processes.

An oxygen molecule is not always subject to complete four-electron reduction. If it is reduced by less than four electrons, molecules containing at least one unpaired electron in the external electron cover will emerge – reactive oxygen species (ROS). The ROS include not only free oxygen radicals but also compounds that are capable of their generation. The reactive oxygen species are: peroxide radical (O_2^*), ozone (O_3), hydrogen peroxide (H_2O_2) and hydroxyl radicals (OH^*). Reactive nitrogen products include: nitrogen oxide (NO), nitroxyl ($NO\cdot$), nitrosonium (NO^+), S-nitrozotiole (RSNOs), peroxynitratates ($OONO\cdot$) and iron nitrosyl complexes [1].

All of them are highly reactive and characterised by a short half-life, with an aim of achieving electron pairing by donating or obtaining them from other molecules. They react in a non-specific manner with cell components, thus causing their modification and damage. Nearly 90% of them emerge in the respiratory chain, whereas the remaining 10% are generated through: oxidase-catalysed reactions, P-450 cytochrome, hydroxylation processes of certain xenobiotics, ionising radiation, transition metal ions, environmental pollutants and many other factors [2].

THE ROLE OF OXYGEN RADICALS IN AN ORGANISM - CHANGES OCCURRING IN PROTEINS

The oxidative changes in proteins caused by free radicals and reactive oxygen and nitrogen forms include: generation of protein hydroperoxides, hydroxylation of aromatic and aliphatic amino acid residues, nitration of aromatic amino acid residues, oxidation of $-SH$ groups, oxidation of methionine residues, transformation of certain amino acid residues into carbonylic derivatives, fragmentation of polypeptide chains or formation of cross bonds [3].

In the conditions of homeostasis, ROS released in physiological quantities play a positive role in a cell: participate in protein phosphorylation, gene expression regulation and elimination of micro-organisms. Nitrogen monoxide and hydrogen peroxide take part in cellular signalling, their high concentrations leading to apoptosis, whereas low concentrations lead to cellular proliferation [4]. Moreover, reactive oxygen forms play a significant role in immunology. Granulocytes, monocytes and macrophages use them through the phenomenon of the so-called "oxygen explosion" to eliminate pathogens.

The name results from an increase, by a few dozen times, of oxygen consumption occurring during this process. In consequence, large quantities of superoxide anion radicals are generated (O_2^*). Moreover, ROS have an effect on lymphocyte T activation and induction of leukocyte adhesion molecules to endothelium, enabling their permeation from the circulatory system to the locations of inflammatory reaction [5]. Moreover, the role

anionorodnika ponadtlenkowego ($O_2^{\cdot-}$). Wykazano również wpływ ROS na aktywację limfocytów T oraz indukcję adhezji komórek leukocytarnych do śródbłonna, umożliwiającą im przenikanie z układu krążenia do miejsca reakcji zapalnej [5].

Opisana jest również rola rodników tlenowych w produkcji cytokin. Im starsze mitochondria tym zjawisko „przecieku elektronów w łańcuchu oddechowym” a tym samym wytwarzanie wolnych rodników występuje w większej ilości. Nadmiar wolnych rodników działa destruktywnie: prowadzi do uszkodzenia elementów strukturalnych komórki, co przyczynia się do śmierci komórki przez apoptozę lub nekrozę [6].

Stres oksydacyjny jest wynikiem nadmiernej aktywności reaktywnych form tlenu, wynikającym z zachwiania równowagi pomiędzy wydzielaniem wolnych rodników tlenowych, a ich usuwaniem z komórki przez systemy antyoksydacyjne [7].

Jego przyczyną może być nie tylko wzrost produkcji reaktywnych postaci tlenu ale również niedobór niskocząsteczkowych antyoksydantów oraz wcześniejsza dezaktywacja enzymów antyoksydacyjnych. Podczas stresu oksydacyjnego dochodzi do uszkodzenia białek, kwasów nukleinowych i lipidów.

Jeżeli proteazy komórkowe nie nadążają nad usuwaniem unieczynnionych i zniszczonych białek, tworzą się w komórce agregaty białkowe. Kumulacja agregatów białkowych, powstających w trakcie uszkodzenia białek przez rodniki tlenowe i ich pochodne odgrywa rolę w patogenezie chorób neurodegeneracyjnych (choroba Alzheimera, Parkinsona) [8].

WPLYW RODNIKÓW TLENYCH NA KWASY NUKLEINOWE

W cząsteczce kwasu dezoksyrybonukleinowego oksydacyjnej modyfikacji ulegają zasady azotowe, deoksyryboza oraz dochodzi do rozrywania wiązań fosfodiesterowych łączących nukleotydy [9]. Mitochondrialny DNA ze względu na swoje sąsiedztwo z mitochondrialnym łańcuchem oddechowym jest bardziej podatny na uszkodzenia wywołane przez ROS.

Rodnik hydroksylowy prowadzi do uszkodzenia zarówno cząsteczek purynowych jak i pirymidynowych łańcucha DNA. Wielokrotna modyfikacja materiału genetycznego prowadzi do mutagenyzy, karcynogenyzy i starzenia [10].

WPLYW RODNIKÓW TLENYCH NA LIPIDY

Lipidy ulegają peroksydacji w trzech fazach: inicjacja, propagacja i terminacja. Za inicjację odpowiadają: rodnik hydroksylowy, wodoronadtlenkowy, alkilowy ale również tlenek i dwutlenek azotu. Dochodzi do oderwania cząsteczki wodoru od cząsteczki nienasyconego kwasu tłuszczowego będącego składnikiem błony komórkowej- fosfolipidu.

W okresie propagacji przy pomocy rodników alkilowych i tlenu powstają nadtlenki kwasów tłuszczowych. Terminacja może zachodzić między dwoma rodnikami alkilowymi, nadtlenkowymi lub dwoma różnymi rodnikami występującymi w układzie. Dochodzi w ten sposób do uszkodzenia i modyfikacji lipidów [11]. Zmianie ulegają właściwości fizyczne błon komórkowych,

of oxygen radicals in the production of cytokins has been described. The older the mitochondria, the greater the phenomenon of "electron leakage in the respiratory chains" and the generation of free radicals. An excess of free radicals has a destructive effect: it leads to the damaging of structural elements of a cell, and then to its death due to apoptosis or necrosis [6].

Oxidative stress occurring in the cells, is a consequence of an excessive activity of reactive oxygen forms, resulting from an imbalance between the release of free oxygen radicals and their removal from the cell by antioxidant systems [7].

Its cause may be sought not only in the increase in the production of reactive oxygen forms, but also in the deficiency of low-molecular antioxidants, and an earlier deactivation of antioxidant enzymes. Oxidative stress involves damaging of proteins, nucleic acids and lipids. If cellular proteases cannot keep up with the disposal of deactivated and damaged proteins, protein aggregates are formed. The accumulation of protein aggregates occurring in the process of protein damage by oxygen radicals and their derivatives plays a role in the pathogenesis of neurodegenerative diseases (Alzheimer's, Parkinson's disease) [8].

THE EFFECT OF OXYGEN RADICALS ON NUCLEIC ACIDS

When subject to oxidative stress, the nitrogen alkali in the molecule of deoxyribonucleic acid, deoxyribose, becomes modified and phosphodiester linkages of nucleotides are ruptured [9]. The mitochondrial DNA, due to its proximity to mitochondrial respiratory chains, is more susceptible to ROS-induced damage.

A hydroxyl radical leads to damage of both purine and pyrimidine molecules of the DNA chain. A multiple modification of the genetic material leads to mutagenesis, carcinogenesis and ageing [10].

THE EFFECT OF OXYGEN RADICALS ON LIPIDS

Lipids are subject to peroxidation carried out in three phases: initiation, propagation and termination. The factors responsible for initiation are: hydroxyl, hydroperoxide, alkyl radicals as well as nitrogen oxide and dioxide. In this phase, a hydrogen molecule is separated from a molecule of an unsaturated fatty acid constituting a component of cellular membrane - phospholipid. In the period of propagation, with the help of alkyl and oxygen radicals, fatty acid peroxides are created.

Termination may occur between two alkyl, peroxide or two different radicals present in the system. This leads to lipid damage and modification [11]. The physical characteristics of cellular membranes are changed, the activity of membrane enzymes and transporting proteins becomes inhibited.

CHARACTERISATION OF PARTICULAR OXYGEN RADICALS

The most reactive ROS occurring in biological systems include: hydroxyl radical (OH^{\cdot}) and superoxide radical ($O_2^{\cdot-}$) [12].

zahamowana jest aktywność enzymów błonowych i białek transportujących.

CHARAKTERYSTYKA POSZCZEGÓLNYCH RODNIKÓW TIENOWYCH

Do najbardziej reaktywnych ROS występujących w systemach biologicznych należą: rodnik hydroksyloxy (OH^*) i rodnik ponadtlenkowy (O_2^*) [12].

Rodnik ponadtlenkowy uważany jest za rodnik pierwotny, który następnie wchodzi w reakcje z innymi cząsteczkami tworzy wtórne rodniki tlenowe. Powstaje on w wyniku jednoelektronowej redukcji tlenu. Rodnik ponadtlenkowy, utlenia cysteinę prowadząc do zmiany konformacji białek i zmiany ich właściwości biologicznych. Enzymy mające w swoich centrach aktywnych cząsteczkę metalu, są również narażone na zmianę aktywności ponieważ rodnik ponadtlenkowy ma zdolność utleniania metali przejściowych [12].

Rodnik hydroksyloxy powstaje w wyniku radiolizy wody lub reakcji Fentona wykorzystując jako substrat nadtlenek wodoru oraz zredukowane formy kationów miedzi lub żelaza. Może również powstawać w wyniku reakcji Habera-Weissa, czyli reakcji nadtlenu wodoru z rodnikiem ponadtlenkowym. Uważany jest on za najczęstszy mediator uszkodzania białek [11].

Rodnik hydroksyloxy może być donorem jak również akceptorem tlenu, co związane jest z jego podwójną rolą jako reduktora bądź utleniacza. Cząsteczka ta jest mało swoista substratowo, może wchodzić w reakcję ze wszystkimi innymi cząsteczkami w komórce. Rodnik hydroksyloxy utlenia grupy sulfhydrylowe oraz uszkodza białka przez utlenienie reszt aminokwasów, uszkodza DNA, nienasycone kwasy tłuszczowe.

Rodnik hydroksyloxy w mózgu hamuje aktywność oksydaz monoaminowych (MAO-A, MAO-B), enzymów odpowiedzialnych za katabolizm takich neuroprzekaźników jak dopamina, noradrenalina, serotonina [13].

Głównym inicjatorem peroksydacji lipidów jest sprotonowana postać anionorodnika ponadtlenkowego-rodnik wodoronadtlenkowy (HO_2^*). Szybko wchodzi w reakcję ze związkami o ujemnych ładunkach, a przy tym łatwo dyfunduje przez błony.

W wyniku reakcji tlenu azotu oraz jonu ponadtlenkowego powstaje również wysoko reaktywny nadtlenoazotyn (ONOO^*). Substancja ta jest odpowiedzialna między innymi za zahamowanie fibrynogenu, plazminy oraz czynnika tkanowego [3].

Za produkcję tlenu azotu odpowiada enzym-syntaza tlenu azotu (nitric oxide syntase NOS). W następstwie uszkodzenia błony komórkowej, rośnie wewnątrzkomórkowe stężenie wapnia w komórce, a tym samym wzmagają się działania NOS.

MECHANIZMY OCHRONNE PRZED WOLNYMI RODNIKAMI

Ekspozycja na wolne rodniki tlenowe i ich pochodne zmusiła organizm do wykształcenia mechanizmów obronnych. Te mechanizmy dzielą się na: mechanizmy prewencyjne, mechanizmy reparacyjne oraz ochronę antyoksydacyjną [10].

Mechanizmy prewencyjne polegają na niedopuszczeniu do powstawania i oddziaływania reaktywnych rodników ze składnikami komórki lub na przerywaniu łańcuchowych reakcji wolnorodnikowych

Superoxide radical is believed to be the primary radical, which produces secondary oxygen radicals by entering into reactions with other molecules. It is generated as a result of one-electron oxygen reduction. Superoxide radical oxidises cysteine, thus leading to a change in protein conformation and their biological properties. Enzymes with active metal molecules in their centres are also exposed to a change in their activity due to the capability of a superoxide radical to oxidise transition metals [12].

The hydroxyl radical emerges as a result of water radiolysis or Fenton reaction using as a substrate hydrogen peroxide and reduced forms of copper or iron cations. It may also be generated in the effect of the Haber-Weiss reaction, i.e. the reaction of hydrogen peroxide with superoxide radical. It is thought to be the most common mediator in protein damage [11].

Due to its double role as a reducer or oxidiser the hydroxyl radical can be both an oxygen donor and acceptor. This molecule is not highly specific in terms of its substrates; it can react with all other molecules in the cell. The hydroxyl radical oxidises sulfhydryl groups and damages proteins through oxidation of amino acid residues, damages DNA and unsaturated fatty acids. In the brain, the hydroxyl radical inhibits the activity of monoamine oxidases (MAO-A, MAO-B), enzymes responsible for the catabolism of such neurotransmitters as dopamine, noradrenaline, serotonin [13].

The main initiator of lipid peroxidation is a protonated version of the superoxide anion radical - the hydrogenperoxide radical (HO_2^*). It quickly reacts with negatively charged compounds, and at the same time is easily diffused through membranes.

Moreover, the result of a reaction between nitrogen oxide and superoxide ions is the highly reactive peroxyxynitrite (ONOO^*). This substance is responsible, among other things, for the inhibition of fibrinogen, plasmin and tissue factor [3]. The enzyme - nitric oxide synthase NOS - is responsible for producing nitrogen oxide. Damage to the cellular membrane results in the growth of intracellular calcium concentration and NOS activity.

DEFENCE MECHANISMS AGAINST FREE RADICALS

The exposure to free oxygen radicals and their derivatives has forced the organism to work out certain defence mechanisms. We may divide them into: preventive mechanisms, repair mechanisms and antioxidant protection [10].

Preventive mechanisms consist in the prevention of an occurrence and interaction of reactive radicals with cellular components or an interruption of free radical chain reactions [14]. Repair mechanisms involve the repair or removal of damaged cell components. The inactivation of reactive radicals is performed by small-molecule antioxidants.

These are compounds supplied to the organisms, such as vitamin C, E, coenzyme Q, carotenes, glutathione and trace elements. A greater protective efficiency against ROS is manifested by enzymatic antioxidants, also known as large-molecule antioxidants. Such substances include: catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GRd), superoxide dismutase (SOD) [12].

Superoxide dismutase plays the main role as an antioxidant enzyme due to its catalytic properties during

[14].

Mechanizmy reparacyjne polegają na naprawie lub usuwaniu uszkodzonych składników komórkowych. Za inaktywację reaktywnych rodników odpowiadają antyoksydanty drobnocząsteczkowe.

Są to związki dostarczane do organizmu, takie jak witamina C, E, koenzym Q, karoteny, glutation oraz pierwiastki śladowe. Większą skuteczność ochronną przed ROS wykazują enzymatyczne antyoksydanty, inaczej nazywane antyoksydantami wielkocząsteczkowymi. Do tego grona substancji zaliczają się: katalaza (CAT), peroksydaza glutationu (GPx), reduktaza glutationu (GRD) dysmutaza ponadtlenkowa (SOD) [12].

Dysmutaza ponadtlenkowa pełni główną rolę jako enzym antyoksydacyjny dzięki jej katalitycznym właściwościom podczas reakcji dysmutacji anionorodnika ponadtlenkowego. Produktem tego procesu jest nadtlenek wodoru, rozkładany do wody i tlenu dzięki katalazie lub peroksydazie glutationu [15].

Katalaza może pełnić podwójną rolę. Reakcja zachodząca w środowisku o wysokim stężeniu nadtlenku wodoru polega na dysproporcjonowaniu. Produktem końcowym jest woda $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$.

Gdy stężenie nadtlenku wodoru jest niskie katalaza pełni rolę peroksydazy, usuwając H_2O_2 jednocześnie utleniając związek organiczny. Dezaktywacja nadtlenku wodoru uniemożliwia reakcje Fentona, czyli przemianę tej cząsteczki w rodnik hydroksylowy.

Peroksydaza glutationu katalizuje redukcję nadtlenku wodoru i nadtlenków organicznych przez zredukowany glutation [16]. W centrum aktywnym enzymu znajduje się reszta selenocysteiny, analogu cysteiny, w którym atom siarki został zastąpiony atomem selenu. Ta unikalna budowa pozwala na przeprowadzenie dwuelektrodowego utleniania glutationu bez uwalniania wolnego rodnika tiolowego glutationu [11].

Podczas unieczynnienia nadtlenku wodoru powstaje szkodliwa dla organizmu substancja- dwusulfid glutationu. Reduktaza glutationu za pomocą reakcji utleniania NADPH odtwarza zredukowaną postać glutationu.

ZASTOSOWANIE ANTYOKSYDANTÓW

Przyjmowanie antyoksydantów jako egzogennych suplementów diety ma na celu zapobieganie lub zmniejszenie ryzyka rozwoju chorób, w których patogenezie biorą udział rodniki tlenowe. Opublikowano wiele prac dotyczących tego tematu, jednak wyniki prac jakie przeprowadzono są niejednoznaczne a tego typu działanie budzi dzisiaj kontrowersje.

Wolne rodniki biorą udział w wielu reakcjach zachodzących w organizmie. Jako substraty wykorzystywane są nie tylko w przeprowadzaniu procesów patologicznych ale również niezbędne są w przebiegu procesów fizjologicznych. Przeciwdziałanie powstawaniu wolnych rodników tlenowych za pomocą antyoksydantów nie jest procesem selektywnym. Nie potrafimy zahamować tylko szkodliwych zjawisk w organizmie.

Powstrzymując procesy chorobowe przez supresję wolnych rodników doprowadza się również do powstania efektów ubocznych w postaci zatrzymania fizjologicznych reakcji mających na celu zwalczenie choroby. Przykładem takiego procesu jest stymulacja przez wolne rodniki tlenowe układu immunologicznego.

the dismutase reaction of superoxide anion radical. The product of this process is hydrogen peroxide decomposed into water and oxygen due to catalase or glutathione peroxidase [15].

Catalase can fulfil a dual role. The reaction occurring in the environment with a high concentration of hydrogen peroxide consists in disproportioning. The final product is water $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$.

When the concentration of hydrogen peroxide is low, catalase fulfils the role of peroxidase removing H_2O_2 and simultaneously oxidising the organic compound. The inactivation of hydrogen peroxide prevents an occurrence of the Fenton reaction, i.e. transformation of the molecule into the hydroxyl radical.

Glutathione peroxidase catalyses the reduction of hydrogen peroxide and organic peroxides through reduced glutathione [16]. The active enzyme centre contains residues of selenocysteine, a cysteine analog, where sulphur atoms have been replaced with selenium atoms.

This unique construction allows initiation of two-electron glutathione oxidation without the release of a free thiol radical of glutathione [11]. In the course of hydrogen peroxide inactivation, a harmful substance is produced – glutathione disulfide. Glutathione reductase through NADPH oxidation reproduces the reduced form of glutathione.

THE APPLICATION OF ANTIOXIDANTS

Therapy with antioxidants as exogenous dietary supplements aims at preventing or reducing the risk of development of diseases involving the presence of oxygen radicals. Multiple works on the same topic have been published, however their results are inconclusive and this type of effect currently raises controversies.

Free radicals participate in numerous reactions occurring in an organism. They are used as substrates not only in pathological processes but are also indispensable in the course of physiological processes. The prevention of free oxygen radical emergence with the help of antioxidants is not a selective process.

We cannot inhibit these harmful phenomena from occurring in an organism. Moreover, the prevention of pathogenic processes by free radical suppression leads to an occurrence of side effects in the form of stopping physiological reactions aimed at disease eradication.

An example of such a process is the stimulation of the immunological system by free oxygen radicals. Inhibiting of this system impedes the fight against inflammatory and cancerous diseases [17].

ANTIOXIDANTS USED IN TREATMENT OF DISEASES OF THE CIRCULATORY SYSTEM

Oxidative stress is closely related to metabolic disorders leading to sclerosis. Many positive effects of supplementation with antioxidants as well as their therapeutic effectiveness have been confirmed. Nonetheless, the mechanisms through which these antioxidants induce the pro-health effect are not completely explained.

Also, it is not known what kind of reactions occur in an organism following their adoption, as they may produce toxic side effects.

Hamowanie tego systemu utrudnia zwalczanie chorób zapalnych i nowotworowych [17].

ANTYOKSYDANTY STOSOWANE W CHORO- BACH UKŁADU KRAŻENIA

Stres oksydacyjny jest ściśle związany z zaburzeniami metabolicznymi prowadzącymi do powstania miażdżycy. Dowiedziono wielu pozytywnych skutków suplementacji antyoksydantami i ich skuteczności w jej leczeniu. Jednak nie do końca wyjaśnione są mechanizmy za pomocą których te antyoksydanty wywołują prozdrowotny efekt.

Nie wiadomo również jakie reakcje zachodzą w organizmie po ich przyjęciu. Ponieważ może okazać się że wywołują toksyczne skutki uboczne, należy zachować ostrożność podczas ich stosowania [18]. Goszcz i współautorzy zwracają uwagę, że związek pomiędzy stężeniem w osoczu antyoksydantów oraz zabezpieczeniem przed chorobami krążenia są nieuchwytnie. Próby wykazania tych zależności skazane są na niepowodzenie.

Duża ilość przyjmowanych doustnie antyoksydantów, zostanie unicestwiona lub wydalona zanim dotrą do miejsca w którym powinny przynieść potencjalny, oczekiwany efekt. Możliwe również, że to nie antyoksydanty przyjmowane z dietą przyniosą oczekiwany efekt kardioprotekcyjny, ale inne związki i mikroelementy przyjmowane wraz z nimi podczas stosowania tzw. „zdrowej diety” [19].

ANTYOKSYDANTY STOSOWANE W CHORO- -BACH NOWOTWOROWYCH

Niektóre leki wykorzystywane w chemioterapii oraz podczas radioterapii działają na zasadzie produkcji wolnych rodników. Istnieją przypuszczenia, że stosowanie antyoksydantów jako adjuwanów do leczenia lub przyjmowanych w pożywieniu, może doprowadzić do obniżenia ich skuteczności w walce z chorobą nowotworową.

Jednak w tym przypadku większość z przeprowadzonych badań pokazuje, że antyoksydanty stosowane w diecie nie wpływają na leczenie przeciwnowotworowe. Ponad to zwiększają one możliwość uśmiercania chorych komórek, zmniejszając jednocześnie efekty uboczne stosowanych strategii terapeutycznych i chroniąc zdrową tkankę [20].

W przewlekłym wirusowym zapaleniu wątroby typu C włączenie do leczenia terapii antyoksydantami ma udowodniony efekt w przeciwdziałaniu marskości wątroby. Natomiast w przypadku innych przewlekłych chorób wątroby, takich jak niealkoholowe stłuszczenie wątroby przypuszcza się, że stosowanie tej terapii poprzez supresję zapalenia i włóknienia może chronić przed powstaniem nowotworu [21].

Martinez-Outschoorn i wsp. opublikowali pracę w której dowodzą antynowotworowego działania antyoksydantów na komórki nowotworowe raka piersi związanego z mutacją w genie BRCA1. W badaniu wykorzystano N-acetylcysteine oraz TEMPOL [22]. TEMPOL to inaczej 4 -hydrokso - 2,2,6,6 - tetrametylopiperidyn - 1 oksyl, związek katalizujący reakcję dysproporcjonowania nadtlenu wodoru. Wykazano korzystny efekt radio-protekcji na komórki hematopoezy przy pomocy terapii antyoksydantami.

Badano wpływ ustnej suplementacji L-selenometioniną,

Thus it is necessary to maintain proper caution in their use [18]. Goszcz et al. point to the fact that the link between the concentration of antioxidants in the plasma and protection against circulatory diseases is indefinable. The attempts to prove these dependencies are doomed to fail. A large quantity of orally administered antioxidants will be destroyed or extracted before they reach the place where they should bring the potential expected result.

Furthermore, it is possible that it is not the antioxidants supplied with the diet that have the expected cardioprotective effect but other compounds and microelements taken along with them during the application of the so-called "healthy diet"[19].

ANTIOXIDANTS USED IN THE TREATMENT OF CANCEROUS DISEASES

Certain medicines used in chemotherapy and during radiotherapy involve generation of free radicals. Assumptions are made that the use of antioxidants as adjuvants to treatment or administered with food may lead to the weakening of their efficacy in fighting a cancerous disease.

However, in this case the majority of conducted studies show that antioxidants used in a diet do not influence an anticancer therapy. Moreover, they increase the possibility of killing the affected cells thus diminishing the side effects of the applied therapeutic strategies and protecting the healthy tissue [20].

In the course of type C chronic viral hepatitis the inclusion of antioxidant therapy has a proven effect in counteracting cirrhosis of the liver. Whereas in the case of other chronic liver diseases, such as non-alcoholic hepatic steatosis it is assumed that the application of such a therapy through the suppression of inflammation and fibrosis can protect against an occurrence of a neoplasm [21].

Martinez-Outschoorn et al. published a work where they prove the anticancer effect of antioxidants on neoplastic cells of breast cancer connected with the mutation in BRCA1 gene. The study was conducted with the use of N-acetylcysteine and TEMPOL [22].

TEMPOL stands for 4-hydroxy-2,2,6,6 - tetramethylpiperidine -1 oxyl, a compound catalysing the reaction of disproportioning hydrogen peroxide. A favourable effect of radio-protection on haematopoiesis cells was observed in the antioxidant therapy. The effect of oral supplementation of mice with L-selenomethionine, vitamin C, tocopherol, lipoic acid was examined with view to an increased survival rate of animals subjected to radiotherapy.

An increase in the quantities of white blood cells and neutrophils was noted in peripheral blood following 4 and 24 hours from the exposure [23]. Antioxidant therapy implemented after radiation brings much better results when commenced after 24 hours following the exposure.

The improvement was concerned with an increase of survival rate of marrow cells and led to reducing mortality among mice [24]. Upon the analysis of several dozen publications, Mahmoud Rafieian-Kopaie and Hamid Nasri reached the conclusion that the tests conducted on humans do not produce convincing evidence that the administration of antioxidants as a supplement to the selected therapy can reduce the risk of cancer development.

However, several works provided evidence

witaminą C, tokoferolem, N-acetylocysteiną, kwasem liponowym, na poprawę przeżycia myszy poddanych radioterapii.

Zaobserwowano wzrost liczby białych krwinek i neutrofilów w krwi obwodowej po 4 oraz po 24 godzinach po naświetlaniu [23]. Terapia antyoksydantami po napromieniowaniu przynosi zdecydowanie lepsze korzyści, kiedy rozpoczyna się po 24 godzinach po ekspozycji.

Poprawa dotyczyła wzrostu przeżycia komórek szpiku oraz przyczyniła się do obniżenia śmiertelności wśród myszy [24]. Po przeanalizowaniu kilkudziesięciu publikacji, Mahmoud Rafieian-Kopaie oraz Hamid Nasri doszli do wniosku, że badania przeprowadzone na ludziach nie wykazują przekonująco, że przyjmowanie antyoksydantów jako suplementu do terapii może zmniejszyć ryzyko rozwoju raka. Kilka prac wykazało jednak dowody na wzrost ryzyka nowotworowego u palaczy [25].

INNE ZASTOSOWANIE ANTYOKSYDANTÓW W TERAPII

Inne doniesienia dotyczące pozytywnych efektów terapii z zastosowaniem antyoksydantów to: badania przeprowadzone przez Reliene R, Schiestl RH, oraz publikacja J. Reichenbach i wsp. mówiące o tym, że suplementacja za pomocą N-acetylocysteiny oraz tokoferolu prowadzi u chorych na ataksję i teleangiektazje do przedłużenia żywotności i zmniejszenia występowania chłoniaków [26,27] natomiast L-tokoferol stosowany w chorobie Huntingtona może opóźnić utratę funkcji motorycznych [28].

PODSUMOWANIE

Ważne jest dobre zrozumienie patomechanizmów powstawania chorób, działania leków oraz antyoksydantów aby przewidzieć skuteczność terapii. Podczas chorób neurodegeneracyjnych dochodzi do akumulacji agregatów białkowych oraz wystąpienia stresu oksydacyjnego [29].

Agregaty usuwane są z organizmu za pomocą zjawiska autofagii, która jest blisko związana ze wzrostem wolnych rodników tlenowych. Badanie przeprowadzone przez B.R Underwood i wsp. wskazuje, że stosowanie leków indukujących autofagię nie wpływa znacząco na wzrost produkcji rodników tlenowych ale działanie tych leków oraz autofagia jest hamowana przez antyoksydanty.

Udowodniono, że pewien poziom wolnych rodników tlenowych jest wymagany do prawidłowego funkcjonowania i regulacji zjawiska autofagii. Nie powinno się traktować stresu oksydacyjnego jako zjawiska wyłącznie patologicznego w kontekście leczenia chorób neurodegeneracyjnych [30].

Przy zastosowaniu niewłaściwej terapii pozytywny efekt jaki przynosi zastosowanie antyoksydantów może być w tym przypadku przytłumiony przez negatywny efekt akumulacji agregatów białkowych.

To czy terapia z zastosowaniem antyoksydantów przyniesie pozytywne czy negatywne efekty zależy od wielu czynników. Decyzja o włączeniu oraz dobór odpowiedniej substancji mającej działanie antyoksydacyjne wymaga wzięcia pod uwagę czynniki

related to an elevated risk of cancer in smokers [25].

OTHER APPLICATIONS OF ANTIOXIDANTS IN THERAPY

Other reports concerned with the positive effects of therapy with the use of antioxidants include: a study carried out by Reliene R, Schiestl RH, and a publication by J. Reichenbach et al. arguing that the supplementation with N-acetylcysteine and tocopherol leads to an increased life expectancy in patients with ataxia and teleangiectasia, as well as a lower risk of developing lymphoma [26; 27], whereas the use of L-tocopherol in Huntington's disease may delay the loss of motor functions [28].

SUMMARY

It is vital to develop a good understanding of the pathomechanisms of various diseases, the effect of medicines and antioxidants in order to predict the therapeutic effectiveness. Neurodegenerative diseases involve accumulation of protein aggregates and an occurrence of oxidative stress [29].

The aggregates are removed from the organism through the phenomenon of autophagy, which is closely related to an increase of quantities of free oxygen radicals. The study conducted by B.R. Underwood et al. indicates that the application of autophagy inducing medicines does not have a significant influence on the growth of production of free oxygen radicals but their activity and autophagy is inhibited by antioxidants. It has been proven that a certain level of free oxygen radicals is required for the proper functioning and regulation of the autophagy phenomenon.

Oxidative stress should not be seen as a strictly pathological phenomenon in the context of treatment of neurodegenerative diseases [30]. In the application of an improper therapy the positive effect connected with the use of antioxidants may be reduced by the negative effect of the accumulation of protein aggregates.

Whether the therapy with the use of antioxidants will bring positive or negative effects depends on numerous factors. The decision to include and select a suitable substance with an antioxidant effect requires consideration of such factors as the type of a disease, its stage of development, analysis of pathogenesis, neoplasm type, its molecular type, the thus far applied treatment, prediction of possible interactions, dosage selection [31].

Such a great number of conditions often poses difficulties not only in relation to drug selection but also in determining its effectiveness.

takie jak rodzaj choroby, jej stadium, przeanalizowania patogenez, rodzaju nowotworu, jego typu molekularnego, zastosowanego dotychczas leczenia, przewidzenia możliwych interakcji, dobrania odpowiedniej dawki [31]. Tak duża liczba uwarunkowań często powoduje trudności nie tylko w dobraniu leku ale sprawia trudność w ocenie jego efektywności.

BIBLIOGRAPHY

- Nathan C. Specificity of a third kind: reactive oxygen and nitrogen intermediates in cell signaling. *J. Clin. Invest.* 2003; 111: 769-778, DOI 10.1172/JCI200318174;
- Bartosz G. Druga twarz tlenu. Wolne rodniki w przyrodzie. Wyd. 2 zm. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN 2004. Polish [Second face of oxygen. Free radical in nature];
- Poncdek M.B., Wachowicz B.: Oddziaływanie reaktywnych form tlenu i azotu z białkami. *Post. Biochem.* 2004; 51: 140–145. Polish [Interaction of reactive oxygen and nitrogen species with proteins];
- Cadenas E. Mitochondrial free radical production and cell signaling. *Mol Aspects Med.* 2004; 25: 17-26, DOI 10.1016/j.mam.2004.02.005;
- Dröge W. Free radicals in the physiology control of cell function. *Physiol. Rev.* 2002; 82: 47-95, DOI 10.1152/physrev.00018.2001;
- Das KC, White CV. Redox system of the cell: possible links and implications. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 2002; 99:9617-9618, DOI 10.1073/pnas.162369199;
- Pratico D. Alzheimer's disease and oxygen radicals: new insights. *Biochem. Pharmacol.* 2002; 63: 563-567, DOI 10.1016/S0006-2952(01)00919-4;
- Perry G, Nunomura A, Hirai K, Znu X, Perez M, Avila J et al. Is oxidative damage the fundamental pathogenic mechanism of Alzheimer's and other neurodegenerative diseases? *Free radic Biol Med* 2002; 33: 1475-1479, DOI 10.1016/S0891-5849(02)01113-9;
- Marnett LJ, Riggins JN, West JD. Endogenous generation of reactive oxidants and electrophiles, and their reactions with DNA and protein. *I. Clin. Invest.* 2003; 111: 583-593, DOI: 10.1172/JCI200318022;
- Valko M, Leibfritz D, Mancel J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2007; 39: 44-84, DOI 10.1016/j.biocel.2006.07.001;
- Zabłocka A, Janusz M. Dwa oblicza wolnych rodników tlenowych. *Post Hig Med. Dosw.* 2008; 62: 118-124, Polish [The two faces of reactive oxygen species];
- Karpińska A., Gromadzka G. Stres oksydacyjny I naturalne mechanizmy antyoksydacyjne-znaczenie w procesie neurodegeneracji. Od mechanizmów molekularnych do strategii terapeutycznych. *Post Hig Med Dosw* 2013; 67:43-53, Polish [Oxidative stress and natural antioxidant mechanisms: the role in neurodegeneration. From molecular mechanisms to therapeutic strategies];
- Gutowicz M. Wpływ reaktywnych form tlenu na ośrodkowy układ nerwowy. *Post Hig Med Dosw* 2011; 65: 104-113, Polish [The influence of reactive oxygen species on the central nervous system];
- Fang YZ, Yang S, Wu G. Free radical, antioxidants and nutrition. *Nutrition* 2002; 18:872-879, DOI: 10.1016/S0899-9007(02)00916-4;
- Halliwel B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J. Neurochem.* 2006; 97:1634-1658, DOI: 10.1111/j.1471-4159.2006.03907.x;
- Pastore A, Federici G, Bertini E, Piemonte F. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clin. Chim. Acta.* 2003; 333:19-39, DOI 10.1016/S0009-8981(03)00200-6;
- Kehrer JP, Klotz LO. Free radicals and related reactive species as mediators of tissue injury and disease: implications for Health. *Crit Rev Toxicol.* 2015; 45(9):765-98. DOI 10.3109/10408444.2015.1074159;
- Gregório BM, De Souza DB, de Moraes Nascimento FA, Pereira LM, Fernandes-Santos C. The potential role of antioxidants in metabolic syndrome. *Curr Pharm Des.* 2015 ; 22: 859 - 869 DOI 10.2174/1381612822666151209152352;
- Goszcz K, Deakin SJ, Duthie GG, Stewart D, Leslie SJ, Megson IL. Antioxidants in Cardiovascular Therapy: Panacea or False Hope? *Front Cardiovasc Med.* 2015 ; 2:29. DOI 10.3389/fcvm.2015.00029;
- Simone CB, Simone NL, Simone V, Simone CB. Antioxidants and other nutrients do not interfere with chemotherapy or radiation therapy and can increase kill and increase survival, part 1. *Altern Ther Health Med.* 2007;13(1):22-28;
- Miyaniishi K, Hoki T, Tanaka S, Kato J. Prevention of hepatocellular carcinoma: Focusing on antioxidant therapy. *World J Hepatol.* 2015; 7(3):593-9. doi: 10.4254/wjh.v7.i3.593;
- Martinez-Outschoorn UE, Balliet R, Lin Z, Whitaker-Menezes D, Birbe RC, Bombonati A, et al. BRCA1 mutations drive oxidative stress and glycolysis in the tumor microenvironment: implications for breast cancer prevention with antioxidant therapies. *Cell Cycle.* 2012; 11(23):4402-13. doi: 10.4161/cc.22776;
- Wambi C, Sanzari J, Wan XS, Nuth M, Davis J, Ko YH, et al. Dietary Antioxidants Protect Hematopoietic Cells and Improve Animal Survival after Total-Body Irradiation. *Radiat Res.* 2008; 169(4): 384–396, DOI 10.1667/RR1204.1;
- Brown SL, Kolozsvary A, Liu J, Jenrow KA, Ryu S, Kim JH. Antioxidant Diet Supplementation Starting 24 Hours after Exposure Reduces Radiation Lethality. *Radiat Res.* 2010 ; 173(4): 462–468, DOI 10.1667/RR1716.1;
- Rafieian-Kopaie M, Nasri H. On the Occasion of World Cancer Day 2015; the Possibility of Cancer Prevention or Treatment with Antioxidants: The Ongoing Cancer Prevention Researches. *Int J Prev Med.* 2015; 6: 108, DOI 10.4103/2008-7802.169077;
- Reliene R, Schiestl RH. Experimental antioxidant therapy in ataxia telangiectasia. *Clin Med Oncol.* 2008; 2:431-436;
- Reichenbach J, Schubert R, Schwan C, Müller K, Böhles HJ, Zielen S. Anti-oxidative capacity in patients with ataxia telangiectasia. *Clin Exp Immunol.* 1999 ; 117(3): 535–539, DOI 10.1046/j.1365-2249.1999.01000.x;
- Peysers CE, Folstein M, Chase GA, Starkstein S, Brandt J, Cockrell JR, et al. Trial of d-alpha-tocopherol in Huntington's disease. *Am J Psychiatry.* 1995; 152(12):1771-5, DOI 10.1176/ajp.152.12.1771;
- Jin H, Kanthasamy A, Ghosh A, Anantharam V, Kalyanaraman B, Kanthasamy AG. Mitochondria-targeted antioxidants for treatment of Parkinson's disease: preclinical and clinical outcomes. *Biochim Biophys Acta.* 2014; 1842(8): 1282–1294, DOI 10.1016/j.bbdis.2013.09.007;
- Underwood BR, Imarisio S, Fleming A, Rose C, Krishna G, Heard P, et al. Antioxidants can inhibit basal autophagy and enhance neurodegeneration in models of polyglutamine disease. *Hum Mol Genet.* 2010; 19(17): 3413–3429, DOI 10.1093/hmg/ddq253;
- Mut-Salud N, Alvarez PJ, Garrido JM, Carrasco E, Aránega A, Rodríguez-Serrano F. Antioxidant Intake and Antitumor Therapy: Toward Nutritional Recommendations for Optimal Results. *Med Cell Longev.* 2016; 2016: 6719534, DOI 10.1155/2016/6719534.

prof. dr hab. n. med. Agnieszka Pedrycz

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii z Pracownią Cytologii Doświadczalnej
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie.
ul. Radziwiłłowska 11 20-080, Lublin
e-mail: apw4@wp.pl