

ROLA WOLNYCH RODNIKÓW W REGULACJI PROCESÓW FIZJOLOGICZNYCH. I

Joanna GDULA-ARGASIŃSKA¹, Małgorzata TYSZKA-CZOCHARA¹,
Paweł PAŚKO², Włodzimierz OPOKA³

1. Zakład Radioligandów, Katedra Farmakobiologii, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, ul. Medyczna 9, 30-688 Kraków
2. Zakład Bromatologii, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, ul. Medyczna 9, 30-688 Kraków
3. Zakład Chemii Nieorganicznej, Katedra Chemii Nieorganicznej i Analitycznej, Wydział Farmaceutyczny Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, ul. Medyczna 9, 30-688 Kraków

Abstract

Free radicals containing one or more unpaired electrons have considerable reactivity. Those radicals derived from oxygen represent the most important class of such species. Free radicals generated in organism are reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) well recognised for playing a dual role as both deleterious and beneficial species. The cumulative production of ROS/RNS is termed oxidative stress and were discovered in pathomechanism of many of diseases. It was observed that in medium concentration ROS and RNS are play a role in inflammation, apoptosis and as secondary messengers in intracellular signalling cascades.

English Title: "Role of free radicals in physiological processes. I"

Słowa kluczowe: reaktywne formy tlenu RFT, reaktywne formy azotu RFN, regulacja procesów fizjologicznych, równowaga redox, hormeza, wolne rodniki

Stosowane skróty: RFT - reaktywne formy tlenu, RFN - reaktywne formy azotu, NO - tlenek azotu(II), NOS - syntaza tlenku azotu(II), oksydaza NADPH, reduktaza NADPH, IFN- α , IL-1, IL-2, IL-6 - interleukiny, TNF- α - czynnik martwicy nowotworów, LPS – lipopolisacharyd

Corresponding author: Joanna Gdula-Argasińska jargasinska@cm-uj.krakow.pl>

Wolne rodniki to atomy lub cząsteczki, które zawierają jeden lub więcej niesparowanych elektronów, dlatego są niezwykle reaktywne. Charakteryzują się bardzo krótkim czasem trwania w środowisku komórkowym. Wśród wolnych rodników powstających w organizmie wyróżnia się reaktywne formy tlenu (RFT) i reaktywne formy reagować w komórce:

- z białkami, co w konsekwencji prowadzi do inaktywacji enzymów i zniszczenia struktury białek,
- z lipidami (peroksydacja, uszkodzenie błon i organelli komórkowych),
- z polisacharydami (zaburzenia struktury aktywnych biologicznie cząsteczek)

– z kwasami nukleinowymi (działanie mutagenne, kancerogenne, teratogenne).

Nadmierne wytwarzanie RFT prowadzi do stresu oksydacyjnego, który odgrywa istotną rolę w patomechanizmie wielu procesów chorobowych (nowotworów, schorzeń neurodegeneracyjnych, czy chorób o etiologii wirusowej, toksycznej lub zapalnej). Stres oksydacyjny wywołuje zaburzenia homeostazy komórkowej i zmiany potencjału redox w komórce, zakłóca prawidłowe funkcjonowanie organizmu, powoduje zaburzenia transportu związków do/z komórek oraz zmniejszenie tempa eliminacji produktów metabolizmu komórkowego. W wyniku uszkodzeń, m.in. dezaktywacji enzymów i hormonów, wolne

rodniki zakłócają prawidłowe funkcjonowanie na poziomie całego organizmu, między innymi zdolności do wzrostu, naprawy oraz reakcji na stres. Uszkodzone komórki i tkanki nie pełnią już właściwych funkcji metabolicznych [3,7,14]. Wykazano jednak, że w umiarkowanych stężeniach reaktywne formy azotu (RFN) i reaktywne formy tlenu (RFT) odgrywają istotną rolę, jako mediatory regulujące transdukcję, czyli przekazywanie sygnału do komórek efektorowych. U zwierząt RNF i RFT w warunkach fizjologicznych pełnią funkcję cząsteczek sygnałowych między innymi w regulacji ciśnienia naczyniowego, w kontroli oddychania oraz wpływają na tempo syntezy erytropoetyny, i procesy metaboliczne. NO i RFN są syntetyzowane w precyzyjnie regulowanych reakcjach przy udziale izoform enzymów syntazy NO (NOS) i oksydazy NADPH [6,1].

W organizmie człowieka reaktywne formy tlenu mogą powstawać w wyniku działania egzogennych czynników fizycznych (promieniowanie jonizujące i UV). Istotna jest jednak wewnątrzkomórkowa generacja RFT, wynikająca z jednoelektronowego utleniania zredukowanych form wielu związków zarówno endo- jak i egzogennych przez tlen cząsteczkowy oraz reakcje enzymatyczne. RFT w organizmie wytwarzają aktywowane fagocyty, rodnik ten powstaje głównie w reakcjach mitochondrialnego łańcucha oddechowego i mikrosomalnego utleniania, autooksydacji związków endo- i egzogennych, reakcji katalizowanych przez oksydazy oraz w reakcjach, w których udział biorą jony metali przejściowych.

W większości przemian metabolicznych przy udziale tlenu jako pierwszy wytwarzany jest anionorodnik nadadtlenkowy. Rodnik ten jest produktem jednoelektronowej redukcji tlenu cząsteczkowego. Powstaje głównie na skutek przecieku elektronów w mitochondrialnym

łańcuchu oddechowym, lecz także w reakcji utleniania ksantyny do kwasu moczowego katalizowanej przez oksydazę ksantynową przy udziale reduktazy NADPH i cytochromu P-450 podczas metabolizmu ksenobiotyków w mikrosomach. Jest również wytwarzany przez aktywowane fagocyty. Ze względu na ładunek elektryczny, anionorodnik nadadtlenkowy nie może swobodnie przenikać przez błony komórkowe, dlatego w czasie transportu przez błony ulega protonacji do rodnika wodoronadtlenkowego, który po przejściu dysocjuje tworząc ponownie anionorodnik nadadtlenkowy [3,14].

Nadtlenek wodoru (H_2O_2), będący produktem dwuelektronowej redukcji tlenu, powstaje w wyniku reakcji dysmutacji anionorodnika nadadtlenkowego lub podczas dwuelektronowej redukcji tlenu cząsteczkowego pod wpływem takich enzymów, jak oksydaza ksantynowa lub oksydaza moczanowa. W obecności jonów metali przejściowych, w reakcja Fentona, ulega rozpadowi do rodnika wodorotlenowego i anionu wodorotlenowego. Nadtlenek diwodoru z łatwością dyfunduje przez błony komórkowe i dlatego może przemieszczać się do komórek znacznie odległych od miejsca swego powstania. Jest neutralizowany przez katalazę oraz peroksydazy. Anionorodnik nadadtlenkowy i nadtlenek wodoru wykazują długi okres półtrwania i stosunkowo niską reaktywność. W reakcji Haber-Wiessa rodniki te mogą przekształcać się w bardzo reaktywne rodniki hydroksylowe. Reakcja ta zachodzi tylko w obecności jonów związków organicznych zawierających metale. Najbardziej reaktywnym z RFT jest rodnik hydroksylowy (OH \cdot), który powstaje w wyniku reakcji Fentona i charakteryzuje się niską zdolnością do przenikania przez błony komórkowe [3,7,14,1].

Drugą grupą związków o niesparowanych elektronach i/lub charakteryzujących się dużą reaktywnością chemiczną są reaktywne formy azotu – RFN. Do reaktywnych form azotu należy tlenek azotu(II) (NO) oraz powstające z niego w wyniku przemian metabolicznych: kation nitrozoniowy (NO⁺), anion nitroksylowy (NO⁻) i nadtlenoazotyn (ONOO⁻). Tlenek azotu jest związkiem silnie toksycznym, działającym nieswoiście. W komórce związek ten charakteryzuje się powinowactwem do metaloprotein oraz może wpływać na proces transkrypcji genów w jądrze komórkowym powodując aktywację określonych czynników transkrypcyjnych. Dokładne poznanie mechanizmów działania NO w komórkach jest niezwykle trudne ze względu na dużą reaktywność NO i jego metabolitów. W skali organizmu obniżenie za pośrednictwem NO stężenia wewnątrzkomórkowego wapnia prowadzi do relaksacji naczyń i mięśni gładkich, zahamowania agregacji i adherencji płytek krwi, chemotaksji neutrofilii i transdukcji sygnału w obwodowym i ośrodkowym układzie nerwowym. Synteza tlenku azotu następuje przy udziale specyficznej rodziny enzymów – syntaz tlenku azotu (NOS). Wyróżnia się trzy typy syntaz NO: e-NOS (NOS typu 3), enzym konstytutywny, obecny w komórkach śródbłonka, syntetyzuje tlenek azotu w regulacji ciśnienia krwi, n-NOS (NOS typu 1), występująca w neuronach i zależną od wapnia i kalmoduliny, i-NOS (NOS typu 2), indukowalną, silnie wiążącą kalmodulinę i niezależną od jonów wapnia, stwierdzoną m.in. w makrofagach, monocytach, neutrofilach, hepatocytach i komórkach nabłonka oddechowego. Wszystkie typy syntazy tlenku azotu są zależne od NADPH. Do grupy inhibitorów syntazy NO należą heterogenne związki m.in.: glikokortykosteroidy, L-glutamina, cytokiny (TGF- α , IL-4, IL-10, IL-13), lecz mechanizmy ich

działania są słabo poznane. Wykazano, że konstytutywnie syntetyzowany w organizmie izoenzym e-NOS pod wpływem działania aktywatorów: acetylocholino, bradykininy i H₂O₂ wytwarza NO w śródbłonku naczyń krwionośnych. Natomiast ekspresja iNOS zachodzi po indukcji IFN- α , IL-1, IL-2, IL-6, TNF- α , czynnikiem hamującym migrację makrofagów, jak również po kontakcie z mikroorganizmami lub ich metabolitami, takimi jak LPS [314]. Nadmierna indukcja iNOS w komórkach śródbłonka może być przyczyną uszkodzenia śródbłonka, a w makrofagach i komórkach mięśni gładkich naczyń może prowadzić do zahamowania oddychania komórkowego i w konsekwencji do ich dysfunkcji. Wykazano natomiast, że ekspresja iNOS w komórkach wątroby hamuje toksyczne efekty działania endotoksyn [3,11,4,14].

Rola wolnych rodników w układzie immunologicznym

Pierwszą linią obrony organizmu przed zakażeniem stanowią granulocyty obojętnochłonne i makrofagi. Komórki te wykazują podobne funkcje kontrolujące: agregację, chemotaksję, zdolność do rozpoznania obcych cząsteczek poprzez odpowiednie receptory i wchłonięcie ich do fagosomów (degradacja), a także wytwarzanie RFT przy udziale kompleksu enzymatycznego oksydazy NADPH zlokalizowanej w błonie fagocytów. RFT aktywują iNOS, co w konsekwencji prowadzi do zabicia i rozkładu pochłoniętych mikroorganizmów w środowisku fagolisozomów [4,13]. Aktywacja makrofagów i granulocytów obojętnochłonnych prowadzi do wytwarzania anionorodnika ponadtlenkowego i jego pochodnych za pośrednictwem oksydazy NADPH. Nasilone wytwarzanie RFT ma gwałtowny przebieg i jest nazywane „wybuchem tlenowym”. W procesie tym najistotniejszą rolę

odgrywa zwiększenie aktywności kompleksu oksydazy NADPH, którego składowymi są: cytochrom b558 znajdujący się w błonie oraz trzy składniki obecne w cytozolu (p47phox, p67phox, p40phox). Ponadto istotną rolę odgrywają dwa niskocząsteczkowe kofaktory reakcji– Rac-2 obecny w cytozolu i Rap-1A zlokalizowany zarówno w błonie plazmatycznej, jak i w cytozolu. Kompleks ten po aktywacji katalizuje wytwarzanie anionorodnika ponadtlenkowego w reakcji jednoelektronowej redukcji tlenu, w której NADPH jest donorem elektronu. Anionorodnik ponadtlenkowy podlega następnie dysmutacji do nadtlenu wodoru, który pod wpływem mieloperoksydazy, znajdującej się w ziarnistościach azurochłonnych (pierwotnych), w obecności jonów halogenkowych (np. Cl⁻) generuje powstawanie bardzo aktywnych, utleniających związków, takich jak kwas chlorowy(I) (HClO) i inne. HClO jest jednym z najsilniejszych fizjologicznych, nierodnikowych utleniaczy i jednocześnie związkiem działającym antybakteryjnie. W wyniku reakcji kwasu chlorowego(I) z tauryną powstają chloroaminy, które inaktywują elastazę i inne proteazy granulocytów obojętnochłonnych. Pobudzone granulocyty i makrofagi mogą generować także inne RFT wykazujące aktywność bakteriobójczą m.in.: tlen cząsteczkowy, rodnik hydroksylowy oraz RFN. Należy podkreślić, że istotną rolę w obronie organizmu przed patogenami pełni oksydaza NADPH, co potwierdzają badania wykazujące u myszy pozbawionych składników gp-91phox lub p47phox, cechujących się zmniejszoną odpornością na zakażenie [2,6]. Wytwarzanie anionorodnika ponadtlenkowego i rodnika hydroksylowego następuje nie tylko wewnątrz komórki, ale także w błonach komórkowych.

Fizjologiczne stężenia RFT w komórkach fagocytycznych mogą także modulować kaskadę

przenoszenia sygnałów oraz nasilać immunologiczne funkcje limfocytów [3,14]. Wykazano, że wytwarzanie przez makrofagi prostaglandyn i cytokin IL-6 oraz IL-12 jest zależne od zawartości wewnątrzkomórkowego glutationu, w ten sposób wewnątrzkomórkowy stan redoks wpływa na funkcje immunologiczne makrofagów [2,6].

Aktywacja fagocytarnej oksydazy NADPH może także być indukowana przez cytokiny, takie jak IFN- α , IL-1 i IL-8 oraz przez produkty rozpadu komórki bakteryjnej (głównie lipopolisacharydy i lipoproteiny). Również wytwarzanie RFT przez niefagocytarną oksydazę NADPH odgrywa ważną rolę w regulacji kaskady przenoszenia sygnału w komórkach niefagocytujących, takich jak fibroblasty, komórki śródbłonna, komórki mięśni gładkich naczyń, mioocyty mięśnia sercowego [2,3,8,14]. Wykazano, że generacja anionorodnika ponadtlenkowego w komórkach niefagocytujących jest około trzykrotnie mniejsza niż jego wytwarzanie w neutrofilach. Komórki mięśni gładkich naczyń, w przeciwieństwie do granulocytów, komórek śródbłonna czy fibroblastów wytwarzają anionorodnik ponadtlenkowy i nadtlenek diwodoru tylko wewnątrzkomórkowo [3,4,11,14].

W procesach biologicznych ważną rolę odgrywa również kontrola zmian adhezyjnych właściwości komórek. Adhezja leukocytów do komórek śródbłonna w żyłach postkapilarnych prowadzi do przewlekłego stanu zapalnego. Nasilenie procesu zależy od ekspresji receptora cząsteczek adhezyjnych na powierzchni komórek. Śródbłonek naczyń jest nie tylko fizjologiczną barierą oddzielającą ścianę naczyń od strumienia krwi. Komórki śródbłonna z własną aktywnością metaboliczną i wydzielniczą, syntetyzują wiele czynników mogących zwrotnie pobudzać komórki tkanki, utrzymując stan ich przewlekłej aktywacji.

Śródbłonek naczyń wywiera także regulacyjny wpływ na przebieg adhezji leukocytów (granulocytów i monocytów), płytek krwi oraz przepuszczalność naczyń i odpowiedź zapalną. Wyrazem dysfunkcji śródbłonka jest m.in. zwiększenie ekspresji cząsteczek adhezyjnych ICAM-1, VCAM-1, L-selektyny i integrzyn CD11b/CD18. Ich ekspresję indukują bakteryjne lipopolisacharydy oraz cytokiny: TNF- α , IL-1 α i IL-1 β . Wykazano, że adhezję leukocytów do komórek śródbłonka indukują również RFT, natomiast proces ulega zahamowaniu pod wpływem katalazy i zmiataczy rodnika hydroksylowego. Istotnym enzymem uczestniczącym w wytwarzaniu silnego oksydanta oraz czynnika przeciwbakteryjnego HClO jest mieloperoksydaza [3,4,11,14,8].

Jak wspomniano, w organizmie człowieka RFT aktywnie uczestniczą w odpowiedzi immunologicznej i wpływają na funkcjonalną aktywację limfocytów T. Dodatkowo stwierdzono, że reaktywne formy tlenu są wykorzystywane przez limfocyty T w regulacji przekazywania sygnału w celu zapewnienia optymalnej odpowiedzi immunologicznej [3,14]. Odpowiedź immunologiczna limfocytów na działanie czynników chorobotwórczych. jest regulowana nie tylko przez cytokiny, ale także przez receptory antygeny i cząsteczki kostymulujące na limfocytach. Jest także zależna od stanu redoks w komórce. Aktywacja funkcji limfocytów T jest nasilana przez RFT, albo przez zmianę stężenia wewnątrzkomórkowego glutationu. Fizjologiczne stężenie anionorodnika ponadtlenkowego i/lub nadtlenu diwodoru powodują zwiększenie wytwarzania IL-2 przez limfocyty T, zaś niskie stężenie nadtlenu diwodoru indukuje ekspresję receptora dla IL-2. Sugeruje się, że nadtlenek diwodoru może zmniejszać próg pobudzenia kaskady przenoszenia sygnału, co często odgrywa krytyczną rolę w indukowaniu odpowiedzi immunologicznej [1,3,4,7,11,14].

Źródłem generacji RFT w limfocytach może być 5-lipooksygenaza (5-LO). Enzym ten odgrywa istotną rolę w biosyntezie leukotrienów A4, B4, C4 i D4. Metabolity generowane przez 5-LO zmieniają wewnątrzkomórkowy stan równowagi redoks i w ten sposób indukują transdukcję sygnału i ekspresję określonych genów. 5-LO bierze również udział w wytwarzaniu nadtlenu diwodoru w limfocytach T po stymulacji przez IL-1 i równoczesnej aktywacji cząsteczek kostymulujących CD28. Skutkiem działania RFT jest indukowanie adhezji leukocytów do komórek śródbłonka naczyń krwionośnych. Proces ten zachodzi na skutek fosforylacji odpowiednich białek, m.in. kinazy płytki przylegania (pp125FAK) i cytozolowej kinazy tyrozynowej [3,4,7,14].

Resumo

Liberaj radikaloj enhavas unu aŭ pli neparajn elektronojn pro tio estas eksterordinare reaktivaj. Inter liberaj radikaloj oni nomumas reaktivajn formojn de oksigeno (RFT) kaj reaktivajn formojn de nitrogeno (RFN), kiuj havas duoblan, pozitivan kaj negativan rolojn. Troa produktado de RFT/RFN kaŭzas oksidacian streson, kiu ludas grandan rolon en patomekanismo de multaj malsanigaj procesoj. Tamem oni pruvis, ke ne tro granda koncentriteco de RFN kaj reaktivaj formoj de RFT ludas gravan rolon en infektoj, apoptozo kaj kiel perantoj, kiuj reguligas transdonadon de signala kaskado al efektoraj ĉeloj.

Literatura

- 1 Bartosz G. 2009. Reactive oxygen species: Destroyers or messengers?. *Biochemical Pharmacology* 77, 1303-1315.
- 2 De Minicis S., Bataller R., Brenner D.A. 2006. NADPH Oxidase in the Liver: Defensive, Offensive, or Fibrogenic? *Gastroenterology*, 131, 272-275.
- 3 Dröge W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. 2002. *Physiological Reviews* 82, 47-95.
- 4 Fialkov L., Wang Y., Downey G.P. 2007. Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. *Free Radical Biology & Medicine* 42, 153-164.
- 5 Fleury C., Mignotte B, Vayssière J-L. 2002. Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling. *Biochimie* 84, 131-141.

- 6 Geiszt M. 2006. NADPH oxidases: New kids on the block. *Cardiovascular Research* 71, 289-299.
- 7 Genestra M. 2007. Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. *Cellular Signaling* 19, 1807-1819.
- 8 Hultqvist M., Olsson L.M., Gelderman K.A., Holdahl R. 2009. The protective role of ROS in autoimmune disease. *Trends in Immunology* 30, 201-208.
- 9 Kamata H., Hirata H. 1999. Redox regulation of cellular signaling. *Cell Signalling* 11, 1-14.
- 10 Lance B. Becker. 2004. New concepts in reactive oxygen species and cardiovascular reperfusion physiology *Cardiovascular Research* 61, 461-470.
- 11 Rauhala P., Andoh T., Chiueh C.C. 2005. Neuroprotective properties of nitric oxide and S-nitrosoglutathione *Toxicology and Applied Pharmacology* 207, S91 - S95.
- 12 Simon H.-U., Haj-Yehia A., Levi-Schaffer F. 2000. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis* 5, 415-418.
- 13 Schertz-Shouval R., Elazar Z. 2007. ROS, mitochondria and the regulation of autophagy. *TRENDS in Cell Biology* 17, 422-427.
- 14 Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T.D., Mazur M., Telser J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39, 44-84.
- 15 Zorov D. B. , Bannikova S. Y., Belousov V.V., Vyssokikh M. Y., Zorova L. D., Isaev N. K., Krasnikov B. F., and Plotnikov E. Y. 2005. Reactive Oxygen and Nitrogen Species: Friends or Foes? *Biochemistry (Moscow)*, 70, 215-221.
- 16 Rovira I.I and Finkel T. 2008. Reactive Oxygen, Nitrogen, And Thiol-Based Signal Transduction. In: *Redox Biochemistry*, edited by Ruma Banerjee. John Wiley & Sons, Inc.
- 17 Hultqvist M., Olsson L.M., Gelderman K.A., and Holmdahl R. 2009. The protective role of ROS in autoimmune disease. *Trends in Immunology* 30, 201-208.
- 18 Starkov A.A. 2008. The Role of Mitochondria in Reactive Oxygen Species Metabolism and Signaling. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1147, 37-52.
- 19 Bao X., Cui J., Wu Y., Han X., Gao C., Hua Z. , Shen P. 2007. The roles of endogenous reactive oxygen species and nitric oxide in triptolide-induced apoptotic cell death in macrophages. *Journal of Molecular Medicine* 85, 85-98
- 20 Thomas D.D., Ridnour L.A., Isenberg J.S., Flores-Santana W., Switzer C.H., Donzellie S., Hussain P., Vecoli C., Paolocci N., Ambs S., Colton C., Harris C., Roberts D.D., 14. Wink D.A. 2008. The Chemical Biology of Nitric Oxide. Implications in Cellular Signaling. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 45, 18-31.