

ANTIOXIDANTY V RESPIRAČNOM SYSTÉME

STRAPKOVÁ A., NOSÁLOVÁ G., ¹ADAMICOVÁ K., ²GIAČOVÁ D.

ANTIOXIDANTS IN RESPIRATORY SYSTEM

Background: Reactive oxygen species can participate in the airways reactivity changes after oxidants. The authors have observed an increase in airways reactivity after an exposure to toluene in guinea-pigs and cats in previous experiments. There literature data provide information on the prevention or the delay of free radical damage by antioxidants.

Main purpose: The aim of our study was to evaluate the effect of nonenzymatic antioxidants — vitamin C and vitamin E on the airways reactivity changes after the exposure to toluene vapours.

Methods: After a one-month-lasting pretreatment with 500 mg/kg/day vitamin C and 50 mg/kg/day vitamin E the guinea-pigs were exposed to toluene for 3 days 2 hours. Then the reactivity of trachea and lung strip smooth muscle to histamine was evaluated.

Results: The pretreatment with vitamin C did not evoke statistical significant changes of trachea and lung strip smooth muscles reactivity when compared with the control group. The pretreatment with vitamin E produced a statistically non-significant decrease in trachea smooth muscle reactivity, but an increase in contraction amplitude of lung strip smooth muscle. Trachea was without expressive histological changes. The lung showed granulomatous inflammation with lymphocytes and eosinophils.

Summary: Antioxidants in used doses did not prevent the reactivity changes evoked by toluene exposure. (Fig. 2, Tab. 4, Ref. 14.)

Key words: toluene, hyperreactivity, trachea, lung strip, vitamin C, vitamin E.

Úvod do problematiky: Reaktívne formy kyslíka sa môžu zúčastňovať na vzniku zmien reaktivity respiračného traktu po rôznych oxidantoch. Autori zistili v predchádzajúcich pokusoch zvýšenie reaktivity dýchacích ciest morčiat a mačiek po expozícii toluénu. Údaje literatúry uvádzajú možnú prevenciu alebo oddialenie príznakov poškodenia voľnými radikálmi podaním antioxidantov.

Cieľ práce: Snahou práce bolo zistiť vplyv neenzymových antioxidantov — vitamínu C a vitamínu E na zmeny reaktivity hladkého svalu dýchacích ciest po expozícii parám toluénu.

Metódy: Po jednomesačnej predliečbe vitamínom C v dávke 500 mg/kg hmotnosti/deň a vitamínom E v dávke 50 mg/kg hmotnosti/deň boli morčatá vystavené pôsobeniu toluénu 3 dni po 2 hodiny. Potom sa sledovala reaktivita hladkého svalu trachey a pľúcneho tkaniva na histamín.

Výsledky: Predliečba vitamínom C nevyvolala štatisticky významné zmeny reaktivity hladkého svalu trachey a pľúcneho tkaniva voči kontrolnej skupine. Predliečba vitamínom E vyvolala štatisticky nesignifikantné zníženie reaktivity hladkého svalu trachey, ale zvýšenie amplitúdy kontrakcie hladkého svalu pľúcneho tkaniva. Trachea bola pritom bez výraznejších histologických zmien. V pľúcnom tkanive sa zistil granulomatózny zápal s prímiesou lymfocytov a eozinofilov.

Záver: Antioxidanty v dávkach, ktoré autori použili, nezabránili zmenám reaktivity vyvolanými expozíciou toluénu. (Obr. 2, tab. 4, lit. 14.)

Kľúčové slová: toluén, hyperreaktivita, trachea, pľúcny prúžok, vitamín C, vitamín E.

Bratisl Lek Listy 1997; 98: 527–530

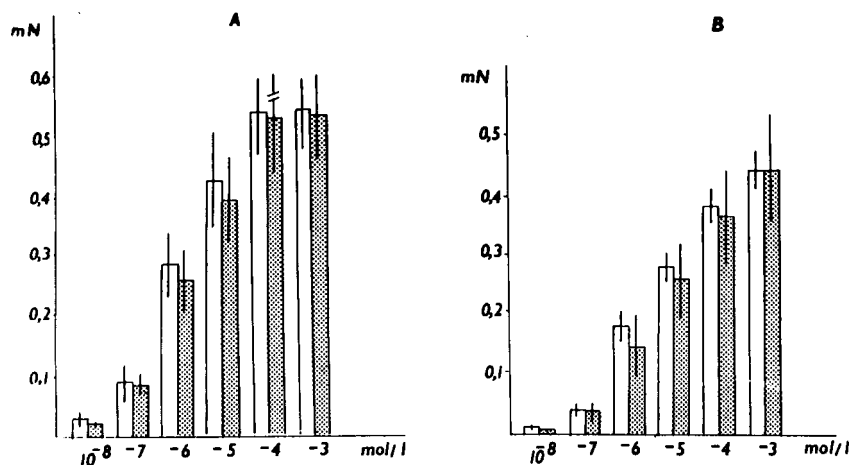
Bratisl. lek. Listy, 98, 1997, č. 10, s. 527–530

Pľúca sú cieľovým miestom pôsobenia oxidantov z vonkajšieho prostredia. Za zmeny, ktoré pozorujeme pri pôsobení oxidantov, zodpovedajú podľa údajov z literatúry voľné radikály. V normálnych fyziologických podmienkach existuje rovnováha

medzi ich produkciou a antioxidačnými obrannými mechanizmami (Volkovová a spol., 1996). Možno ich charakterizovať ako *priame* — enzýmové a neenzýmové alebo *nepriame* — prevencia tvorby oxidantov, zníženie pôsobenia faktorov zvyšujúcich toxicitu oxidantov, obnovenie funkcií poškodených oxidantmi. Medzi enzýmové antioxidanty patria enzýmy, z ktorých najdôležitejšie sú superoxiddismutáza (SOD), kataláza a enzýmy glutatiónového redoxného cyklu. Z palety neenzýmových antioxidantov patria v dýchacom systéme k najvýznamnejším kyselina askorbová, alfatokoferol, betakarotén, kyselina močová (Heffner a Repine, 1989).

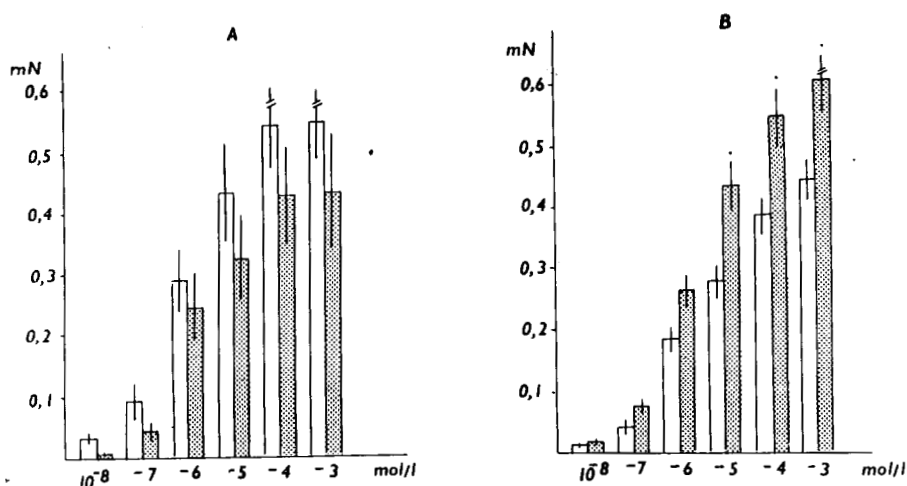
Ústav farmakológie, ¹Ústav patologickej anatómie, ²Ústav sociálneho lekárstva Jeseniovej lekárskej fakulty Univerzity Komenského v Martine The Institute of Pharmacology, ¹The Institute of Pathological Anatomy, and ²The Institute of Social Medicine, Jessenius Medical School, Comenius University, Martin

Address for correspondence: A. Strapková, RND, PhD, Ústav farmakológie JLF UK, Sklabinská 26, 037 53 Martin, Slovakia.



Obr. 1. Vplyv predliečby vitamínom C (bodkované stĺpce) na reaktivitu hladkého svalu trachey (časť A) a pľúcneho tkaniva (časť B) na histamín po expozícii toluénu v porovnaní s kontrolnou skupinou (prázdne stĺpce). Stĺpce predstavujú priemerné hodnoty amplitúdy kontrakcie v mN so strednou chybou priemeru \pm SEM. Os x — koncentrácia histamínu v mol/l, os y — amplitúda kontrakcie v mN.

Fig. 1. The effect of the pretreatment with vitamin C (dotted columns) on the trachea smooth muscle reactivity (part A) and that of lung strip smooth muscle (part B) to histamine after the exposure to toluene compared with the control group (blank columns). The columns represent average values of contraction amplitude with mean mistake of average \pm S.E.M. Axis x — concentration of histamine in mol/l, axis y — contraction amplitude in mN.



Obr. 2. Vplyv predliečby vitamínom E na reaktivitu hladkého svalu trachey (časť A) a pľúcneho tkaniva (časť B) po expozícii toluénu. Štatistická významnosť 5 % je vyjadrená bodkou.

Fig. 2. The effect of the pretreatment with vitamin E on the reactivity of trachea's smooth muscle (part A) and that of lung strip smooth muscle (part B) after the exposure to toluene. The statistical significance 5 % — one point.

Pre tieto antioxidantné aktivity sú charakteristické niektoré ich všeobecné vlastnosti. Prvou je špecifická rôznych antioxidantov. Napríklad enzýmové antioxidanty degradujú oxidanty špecifickým spôsobom. SOD mení superoxidový anión na peroxid vodíka, ktorý katalýza prednostne degraduje.

Ďalšou vlastnosťou je lokalizácia, často selektívna. Napríklad SOD bohatá na mangán je lokalizovaná v mitochondriách, kým SOD bohatá na meď a zinok je primárne lokalizovaná v cytoplazme. Dôležitá je určitá hladina a aktivita antioxidantov v organizme, ktorá nie je stabilná a za určitých okolností sa môže meniť. Napríklad subletálna expozícia oxidantom môže zvýšiť hladinu

a aktivitu antioxidantných mechanizmov. Snaha zvýšiť hladinu antioxidantov farmakologicky sa však zatiaľ neprejavila celkom uspokojivými výsledkami. Je totiž pomerne ťažké udržať vysokú koncentráciu vysokoúčinných najmä enzýmových antioxidantov v cirkulácii (Heffner a Repine, 1989).

Z enzýmových antioxidantov má v dýchacom systéme najdôležitejšiu úlohu glutatiónový redoxný systém, ktorý je spolu s ďalšími vo vode rozpustnými antioxidantmi dôležitou súčasťou epitelovej tekutej vrstvy. Na tejto úrovni zabezpečuje antioxidantnú obranu z neenzýmových antioxidantov kyselina askorbová, kyselina močová a alfatokoferol (Kelly a spol., 1995).

Kyselina askorbová sa nachádza v extracelulárnom aj intracelulárnom priestore väčšiny biologických systémov, kde môže participovať na redoxných reakciách. Môže priamo zhašať superoxidový anión a hydroxylový radikál, pričom reaguje s ostatnými antioxidantmi. Dôležitý je synergický účinok s alfatokoferolom. Za určitých podmienok môže askorbát pôsobiť ako prooxidant podmieňujúci redukciu Fe^{3+} na Fe^{2+} a tvorbu hydroxylového radikálu.

Vitamín E je v tukoch rozpustný antioxidant, ktorý zmierňuje oxidantmi vyvolané poškodenie membrán. Hoci je prítomný v extracelulárnej tekutine, jeho antioxidačná aktivita je lokalizovaná najmä v celulárnej membráne. Je účinný antioxidant, ktorý mení superoxidový anión, hydroxylový radikál a lipidový peroxidový radikál na menej reaktívne metabolity kyslíka. V mechanizmoch, ktoré vysvetľujú protektívny účinok vitamínu C a vitamínu E, je teda určitý rozdiel. Vitamín C podlieha v pľúcach priamej rýchlej reakcii s oxidantmi a vychytá ich skôr, ako začnú reagovať s dôležitými bunkovými štruktúrami. Naproti tomu reakcia oxidantov s vitamínom E a vyššími karboxylovými kyselinami je približne rovnako rýchla. Pretože štruktúra dýchacieho systému ponúkajú oxidantom oveľa viac vyšších karboxylových kyselín ako vitamínu E, reagujú oxidanty najmä s týmito kyselinami a iniciujú lipidovú peroxidáciu. Vitamín E pôsobí teda skôr nepriamo vychytávaním voľných radikálov, ktoré vznikajú práve pri peroxidácii lipidov. Preto sa v respiračnom systéme považuje za účinnejší antioxidant vitamín C (Pryor, 1994).

Materiál a metódy

V našich experimentálnych podmienkach sme ako oxidant použili toluén, ktorý je tiež zdrojom voľných radikálov. V predchádzajúcich prácach sme zistili zvýšenie odpovede hladkého svalu dýchacích ciest na mediátory bronchospazmu po jeho inhalácii u mačiek, ako aj u morčiat (Strapková a spol., 1995).

Zaujímalo nás, ako ovplyvní predliečba neenzýmovými antioxidantmi tento fenomén. Morčatám sme preto denne 1 mesiac pred expozíciou parám toluénu aplikovali vitamín C (Celaskon inj. Hoechst-Biotika) v dávke 500 mg/kg hmotnosti/deň intraperitoneálne a vitamín E (Erevit forte inj. Biotika) v dávke 50 mg/kg hmotnosti/deň intramuskulárne.

Po tejto predliečbe sme zvieratá vystavili pôsobeniu pár toluénu 3 dni po 2 hodiny metódou uvedenou v práci Strapkovej a spol. (1995). Reaktivitu hladkého svalu dýchacích ciest na histamín v stúpajúcich koncentráciách sme sledovali metódou Bánovčína a spol. (1986).

Výsledky

Predliečba vitamínom C (obr. 1) nevyvolala štatisticky významnú zmenu reaktivity hladkého svalu trachey (časť A, bodkované stĺpce) a pľúcneho tkaniva (časť B) v porovnaní s kontrolnou skupinou (prázdne stĺpce), aj keď v oboch prípadoch možno pozorovať určitú tendenciu poklesu amplitúdy kontrakcie.

Podobný efekt sme zaznamenali (obr. 2) aj po predliečbe vitamínom E v hladkom svalе trachey exponovaných zvierat. Neočakávaný efekt sme pozorovali po predliečbe vitamínom E v hladkom svalе pľúcneho tkaniva. Tu sa amplitúda kontrakcie po koncentráciách 10^{-5} — 10^{-3} mol/l histamínu po predliečbe štatisticky

Tab. 1. Hodnoty EC_{50} v hladkom svalе trachey a pľúcnom tkanive po expozícii toluénu a po predliečbe vitamínom C.
Tab. 1. EC_{50} values in the trachea and lung strip smooth muscle after the exposure to toluene and after pretreatment with vitamin C.

| | EC_{50} | |
|-------------------|----------------------|----------------------|
| | trachea | lung strip |
| toluén | $2,16 \cdot 10^{-6}$ | $6,69 \cdot 10^{-6}$ |
| toluene | | |
| toluén+vitamín C | $2,49 \cdot 10^{-6}$ | $1,68 \cdot 10^{-5}$ |
| toluene+vitamin C | | |

Tab. 2. Hodnoty EC_{50} v hladkom svalе trachey a pľúcnom tkanive po expozícii toluénu a po predliečbe vitamínom E.

Tab. 2. EC_{50} values in the trachea and lung strip smooth muscles after the exposure to toluene and after pretreatment with vitamin E.

| | EC_{50} | |
|-------------------|----------------------|----------------------|
| | trachea | lung strip |
| toluén | $2,16 \cdot 10^{-6}$ | $6,69 \cdot 10^{-6}$ |
| toluene | | |
| toluén+vitamín E | $1,36 \cdot 10^{-6}$ | $3,23 \cdot 10^{-6}$ |
| toluene+vitamin E | | |

Tab. 3. Početnosť výskytu histologických zmien trachey v skupine zvierat exponovaných toluénu a v skupinách predliečených vitamínom E a vitamínom C.

Tab. 3. The rate of the occurrence of histological changes of trachea in the group of animals exposed to toluene and in the groups pretreated with vitamin E and vitamin C.

| Histológia Histology | Trachea | | |
|---|--------------------------|---------------------------------------|--|
| | Toluén Toluene n=5 | Toluén+vit. E Toluene+vit.E n=8 | Toluén+vit. C Toluene+vit. C n=7 |
| Bez zmien Without changes | 4x | 7x | 5x |
| Deskvamácia epitelu Desquamation of epithelium | | | 1x |
| Metaplázia epitelu Metaplasia of epithelium | | | 1x |
| Krvácanie Haemorrhagia | 1x | 1x | 1x |

významne zvýšila. Hodnoty EC_{50} po predliečbe vitamínom E a v kontrolnej skupine sú v tabuľke 1, po predliečbe vitamínom E v tabuľke 2. EC_{50} predstavuje efektívnu koncentráciu histamínu, ktorá vyvolala pokles amplitúdy kontrakcie oproti kontrakcii vyvolanej najvyššou použitou koncentráciou histamínu na polovicu.

Zaujímalo nás, ako sa prejavia zistené zmeny na histologickom obraze. Trachea (tab. 3), ktorej zmeny reaktivity boli menej výrazné, bola bez závažnejších histologických zmien. Ojedinele sa zistilo intraluminálne krvácanie, deskvamácia a metaplázia epitelu. Histologický obraz zmien pľúcneho tkaniva (tab. 4) bol pestrejší. U všetkých zvierat sme zaznamenali granulomatózny zápal

Tab. 4. Početnosť výskytu histologických zmien pľúcneho tkaniva v skupine zvierat exponovaných toluénu a v skupinách predliečených vitamínom E a vitamínom C.

Tab. 4. The rate of the occurrence of histological changes of lung strip in the group of animals exposed to toluene and in the groups pretreated with vitamin E and vitamin C.

| Histológia Histology | Lung strip | | |
|--|--------------------------|---------------------------------------|--|
| | Toluén Toluene n=5 | Toluén+vit. E Toluene+vit.E n=8 | Toluén+vit. C Toluene+vit. C n=7 |
| Zápal Inflammation | 5x | 8x | 7x |
| Hyperplázia endotelu Hyperplasia of endothelium | | 2x | 2x |
| Emfyzém Emphysema | 2x | 1x | |
| Krvácanie Haemorrhagia | 3x | 4x | 4x |

s prímiesou lymfocytov a eozinofilov. Takmer u polovice zvierat sa pozorovali fokálne, či difúznejšie ložiská čerstvého krvácania, zriedkavejšie emfyzém a zhrubnutie endotelu ciev.

Diskusia

Z výsledkov našej práce vyplýva, že antioxidanty, ktoré sme použili, nezabránili zmenám reaktivity vyvolanými expozíciou toluénu. Zaujmal nás najmä výsledok predliečby vitamínom E, kde sme po predliečbe týmto antioxidantom pozorovali zvýšenie amplitúdy kontrakcie hladkého svalu pľúcneho tkaniva na histamín. K podobným záverom, ako sú naše, dospeli Langley a spol. (1992), ktorí zistili, že suplementácia vitamínu E v potrave nebola schopná zmierniť alebo zabrániť poškodeniu pľúc oxidatívnym stresom.

Je možné, že dávky, ktoré sme použili, boli nedostatočne veľké najmä pri vitamíne E. Dávky tohto antioxidantu sa v údajoch z literatúry značne líšia. Redukcia lipidovej peroxidácie u fajčiarov sa pozorovala po dávkach 800–1000 mg/deň počas 2 týždňov. Priaznivý účinok suplementácie vitamínu E sa však zaznamenal aj po dávke 40 mg/kg/deň (Duthie, 1993; Prasad a Kalra, 1993; Packer a Fuchs, 1993).

Ochranný účinok predliečby vysokými dávkami vitamínu E a C pozorovali Barta s spol. (1991) pri srdcových operáciách. Poškodeniu pľúc reaktívnymi formami kyslíka u predčasne narodených morčiat však nezabránila dávka 370–390 µg (Langley a spol., 1992).

Je známe, že vitamín E má vo vyšších koncentráciách prooxidačný efekt spôsobujúci zvýšenie hladiny hydroperoxidov. Tento prooxidačný účinok sa nezistil v prítomnosti vitamínu C (Sharma a Buettner, 1993). Jednou z možností vysvetlenia našich výsledkov je možný deficit tohto synergicky pôsobiaceho vitamínu C. Túto možnosť však považujeme za čisto hypotetickú.

Je možné, že tak doba predliečby použitými antioxidantmi opäť najmä pri vitamíne E, ako aj doba expozície mala byť dlhodobejšia. Údaje literatúry totiž uvádzajú, že ochranný účinok vitamínu E sa prejaví len pri chronickej dlhodobej expozícii (Pryor, 1991). Ochranný efekt vitamínu E sa nepozoroval u jedincov, u ktorých trvala suplementácia vitamínu E len niekoľko týždňov a expozícia nízkym koncentráciám ozónu bola pomerne krátka (Packer a Fuchs, 1993).

Vitamín E sa totiž akumuluje veľmi pomaly a potrebuje pomerne dlhý čas na dosiahnutie zvýšenia hladín v tkanivách. V tom čase sú však už membrány obyčajne poškodené (Heffner a Repine, 1989).

Za dôležitý považujeme zápal, ktorý sme pozorovali u väčšiny zvierat. Zápal má za následok poškodenie epitelu, s čím súvisí viacero možných mechanizmov zúčastňujúcich sa na vzniku hyperreaktivity. Aktivácia rôznych zápalových buniek vedie k tvorbe reaktívnych foriem kyslíka a uvoľneniu rôznych mediátorov (Barnes a spol., 1992). Nie je pritom dosiaľ jasné, či len voľné radikály alebo práve nimi sekundárne uvoľnené substancie spúšťajú mechanizmy spôsobujúce hyperreaktivitu. Na objasnenie otázok súvisiacich s touto problematikou budú potrebné ďalšie štúdie.*

Literatúra

Bánovčin P., Vrlík M., Višňovský P.: Reaktivita hladkých svalov dýchacích ciest mačiek po opakovanej aplikácii aerosólu krotónového oleja na podanie histamínu a acetylcholínu in vitro. Bratisl. lek. Listy, 86, 1986, č. 3, s. 324–331.

Barnes P.J., Rodger I.W., Thomson N.C.: Asthma basis mechanisms and clinical management. London—San Diego—New York—Boston—Sydney—Tokyo—Toronto, Academic Press 1992, 782 s.

Barta E., Pecháň I., Čornák V., Luknárová O., Rendeková V., Verchovodko P.: Protective effect of alpha-tocopherol and L-ascorbic acid against the ischemic-reperfusion injury in patients during open-heart surgery. Bratisl. lek. Listy, 92, 1991, č. 3–4, s. 174–184.

Duthie G.G.: Antioxidant status in smokers. In: Packer L., Fuchs J. (Eds.): Vitamin E in health and disease. New York—Basel—Hong Kong, Marcel Dekker 1993, 1000 s.

Heffner J.E., Repine J.E.: Pulmonary strategies of antioxidant defense. Amer. Rev. Resp. Dis., 140, 1989, s. 531–554.

Kelly F.J., Mudway I., Krishna T.M., Holgate S.T.: The free radical basis of air pollution: focus on ozone. Resp. Med., 89, 1995, s. 1–10.

Langley S.C., Phillips G.J., Tahedi S., Kelly F.J.: Dietary supplementation of vitamin E fails to prevent the development of hyperoxic lung injury in the premature guinea pig. Biochem. Physiol., 103 A, 1992, č. 4, s. 793–799.

Packer L., Fuchs J.: Vitamin E in health and disease. New York—Basel—Hong Kong, Marcel Dekker 1993, 1000 s.

Prasad K., Kalra J.: Oxygen free radicals and hypercholesterolemic atherosclerosis: Effect of vitamin E. Amer. Heart J., 125, 1993, č. 4, s. 958–973.

Pryor W.A.: Can vitamin E protect humans against the pathological effects of ozone in smog? Amer. J. clin. Nutr., 53, 1991, s. 702–722.

Pryor W.A.: Mechanisms of radical formation from reactions of ozone with target molecules in the lung. Free Rad. Biol. Med., 17, 1994, č. 5, s. 451–465.

Sharma M.K., Buettner G.R.: Interaction of vitamin C and vitamin E during free radical stress in plasma: an ESR study. Free Rad. Biol. Med., 14, 1993, s. 649–653.

Strapková A., Nosálová G., Bánovčin P., Glačová D.: Zmeny reaktivity hladkého svalu dýchacích ciest po expozícii toluénu. Stud. pneumol. phtiseol., 55, 1995, č. 4, s. 263–271.

Volková K., Beňo I., Staruchová M., Bobek P., Mekšňová D., Tatara M.: Aktivita antioxidantných enzýmov v krvi zdravých osôb. Bratisl. lek. Listy, 97, 1996, č. 3, s. 134–139.

Do redakcie došlo 17. 9. 1996.

*Práca bola prednesená v rámci XV. martinských dní dýchania a je venovaná prof. MUDr. J. Korpášovi, DrSc., k životnému jubileu.