

## VPLYV KYSELINY MOČOVEJ, KREATÍNFOSFÁTU A KARNITÍNU NA LIPOPEROXIDÁCIU V HOMOGENÁTOCH MOZGOVEJ KÔRY A MYOKARDU

HALČÁK L., RENDEKOVÁ V., PECHÁŇ I., KUBASKÁ M.

### EFFECT OF URIC ACID, CREATINE PHOSPHATE AND CARNITINE ON LIPOPEROXIDATION IN HOMOGENATES OF CEREBRAL CORTEX AND MYOCARDIUM

**Background:** Uric acid as the product of purine nucleotide degradation is an integrate component of blood plasma. This metabolite is considered to be one of the important naturally occurring antioxidants building up the antioxidation system of the organism. Creatine phosphate and carnitine are important substances participating in energy metabolism of the cells. Energy production is closely related to the level of reduction systems and thus also to the antiradical ability of the cell. By this mechanism could creatine phosphate and carnitine improve the antioxidative capacity of the cell.

**Methods:** In homogenates of rat brain cortex and myocardium was the production of oxygen radicals stimulated by mixture of Fe<sup>2+</sup> ions and ascorbate. Oxygen radicals may induce lipid peroxidation by the means of the reaction with lipid structures. We tried to inhibit the process of lipid peroxidation by addition of uric acid, creatine phosphate and carnitine into the incubation medium. Intensity of lipoperoxidation was measured by detection of substances giving positive reaction with thiobarbituric acid (TBA) in homogenates of brain cortex and myocardium.

**Results:** Uric acid in concentrations of 1 and 0.5 mmol.l<sup>-1</sup> markedly inhibits the production of compounds reacting with TBA. This effect was not found in 0.05 mmol.l<sup>-1</sup> concentration. Creatine phosphate and carnitine in 1 mmol.l<sup>-1</sup> concentrations also decreased the value of lipid peroxides in homogenates of brain cortex, but their effect was lower than the effect of uric acid. This effect was not seen in myocardium homogenates. (Fig. 4, Ref. 14.)

**Key words:** uric acid, creatine phosphate, carnitine, inhibition of lipid peroxidation, brain cortex, myocardium.

Bratisl Lek Listy 1998; 99: 343–346

**Pozadie problému:** Kyselina močová ako produkt degradácie purínov je stálou súčasťou krvnej plazmy. Tento metabolit sa v súčasnosti pokladá za jeden s dôležitých prirodzených antioxidantov, ktoré tvoria antioxidačný systém organizmu. Kreatínfosfát a karnitín sú zasa významné látky, ktoré sa zúčastňujú na energetickom metabolizme buniek. Tvorba energie úzko súvisí s hladinou redukčných systémov bunky, a teda aj s protiradikálovou schopnosťou bunky. Preto kreatínfosfát i karnitín môžu zlepšovať antioxidačnú kapacitu bunky.

**Metódy:** V homogenáte mozgovej kôry a myokardu potkana sme pomocou zmesi dvojmocných iónov železa a kyseliny askorbovej stimulovali tvorbu kyslíkových radikálov, ktoré reakciou s lipidickými štruktúrami navodzujú ich lipoperoxidáciu. Proces lipoperoxidácie sme sa pokúsili inhibovať prídávaním kyseliny močovej, kreatínfosfátu, alebo karnitínu do inkubačnej zmesi. Intenzitu lipoperoxidácie sme merali cez stanovenie množstva látok pozitívne reagujúcich s kyselinou tiobarbiturovou.

**Výsledky:** Kyselina močová v koncentráciách 1 a 0,5 mmol.l<sup>-1</sup> v homogenáte mozgovej kôry i myokardu významne inhibovala produkciu látok pozitívne reagujúcich s kyselinou tiobarbiturovou, tento účinok sa neprejavil pri koncentrácii 0,05 mmol.l<sup>-1</sup>. Aj kreatínfosfát i karnitín v koncentrácii 1 mmol.l<sup>-1</sup> znižovali množstvo lipoperoxidov v homogenáte mozgovej kôry, aj keď ich inhibičný efekt bol nižší ako pri kyseline močovej. Tento efekt nebol v homogenáte myokardu. (Obr. 4, lit. 14.)

**Kľúčové slová:** kyselina močová, kreatínfosfát, karnitín, inhibícia lipoperoxidácie, mozgová kôra, myokard.

Bratisl. lek. Listy, 99, 1998, č. 7, s. 343–346

Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie Lekárskej fakulty Univerzity Komenského v Bratislave a <sup>1</sup>Slovenský ústav srdcových chorôb v Bratislave

The Institute of Medical Chemistry, Biochemistry and Clinical Biochemistry, Medical Faculty, Comenius University, Bratislava, and <sup>1</sup>Slovak Institute of Heart Diseases, Bratislava

**Address for correspondence:** L. Halčák, Ing, PhD, Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie LFUK, Sasinkova 4, 811 08 Bratislava, Slovakia.

Phone: +421.7.5357572 Fax: +421.7.5357557

Udržovanie optimálneho množstva voľných kyslíkových i dusíkových radikálov v bunkách jednotlivých tkanív je z hľadiska existencie i funkcie buniek veľmi dôležitý fenomén. Nadprodukcia týchto látok vedie k poškodeniu viacerých štruktúr bunky, a tým aj k narušeniu jej funkcie (Ďuračková, 1997). Aktuálne nebezpečenstvo nadprodukcie voľných radikálov nastáva po ischemizácii tkanív a predovšetkým vo fáze reperfúzie predtým ischemizovaného tkaniva (Chan, 1996). Takýto stav v klinickej praxi nastáva

napr. pri kardiochirurgických výkonoch, cievnych rekonštrukciách a podobne. Pri týchto výkonoch v ischemizovanom tkanive, ale aj v celom organizme dochádza k nárastu počtu voľných radikálov, čo je obzvlášť nepriaznivé pre tkanivo nervového systému. V nervovom tkanive je veľká ponuka lipidových štruktúr s nenasýtenými karboxylovými kyselinami, ktoré sú vhodným substrátom pre lipoperoxidačné účinky voľných radikálov (Racek a Holeček, 1994).

Je prirodzené, že sú snahy o elimináciu toxických účinkov voľných radikálov počas chirurgických výkonov u pacientov pomocou antioxidantne pôsobiacich látok (Yan a spol., 1994). Pecháň a spol. (1997) testovali rad antioxidantov u pacientov, ktorí podstúpili kardiovaskulárne chirurgické výkony. Ako antioxidanty, ktorými premedikovali pacientov, ale ich aplikovali aj po výkone, použili niektoré vitamíny, kreatínfosfát, karnitín. Výsledky poukázali na protektívny účinok týchto látok na základe viacerých monitorovaných biochemických parametrov, ako bola hladina malóndialdehydu v plazme pacientov, pokles hladiny laktátu v krvi, stabilizácia koncentrácie glutatiónu v erytrocytoch a podobne. Aj sledovanie hemodynamických parametrov poukázalo na ich zlepšenie u premedikovaných pacientov.

Medzi prirodzené antioxidanty patrí aj kyselina močová, ktorú už nechápeme iba ako degradačný odpadový produkt purínov, ale aj ako látku, ktorá má svoje miesto pri vychytávaní cytotoxicky pôsobiacich voľných radikálov kyseliny (Becher, 1993; Pecháň, 1995). Mechanizmus jej pôsobenia vo funkcii „scavengera“ sa dá vysvetliť tak, že uráty sú schopné viazať nespárený elektrón radikálov za vzniku urátového aniónového radikálu, ktorý potom môže byť účinne vychytávaný kyselinou askorbovou (Maples a Mason, 1988). Na druhej strane je možný aj druhý mechanizmus pôsobenia kyseliny močovej, a to jej schopnosť vytvárať stabilné komplexy s iónmi železa (Davies a spol., 1986). Kyselina močová sa pri tom neoxiduje, ale väzbou iónov železa inhibuje Fentonovu reakciu, ktorou sa v prítomnosti iónov železa a hydrogénperoxidu vytvára veľmi toxický hydroxylový radikál, ktorý potom okrem iného spúšťa procesy lipoperoxidácie spôsobujúce poškodenie membránových štruktúr i funkcie celej bunky.

V našich pokusoch sme sledovali proces lipoperoxidácie na homogenátoch mozgovej kôry a myokardu potkanov. Chceli sme zistiť, či kyselina močová v koncentráciách blízkych hodnotám tohto metabolitu v krvi bude ovplyvňovať lipoperoxidáciu po jej stimulácii zmesou kyseliny askorbovej a iónov dvojvalemého železa. Okrem kyseliny močovej sme ešte testovali aj ďalšie dva endogénne metabolity, kreatínfosfát a karnitín. Obe tieto látky majú významnú úlohu v energetike bunky, a tým umožňujú udržiavať hladinu redukovaných systémov bunky, ktoré sú dôležité pre bunku pri zachovaní jej antioxidantného statusu. Kreatínfosfát i karnitín podané pacientom pred kardiochirurgickým výkonom inhibovali hladinu malóndialdehydu v krvi týchto pacientov (Pecháň a spol., 1996 a, b).

## Materiál a metódy

Pri práci sme použili potkany—samce hmotnosti približne 250 g. Zvieratám sme po dekapitácii odobrili srdce a mozog a z mozgu sme pripravili rezy mozgovej kôry. Z myokardu a mozgovej kôry sme v roztoku TRIS-HCl pri pH 7,0 pripravili tkanivové homogenáty s koncentráciou 100 mg tkaniva na 1 ml homogenátu.

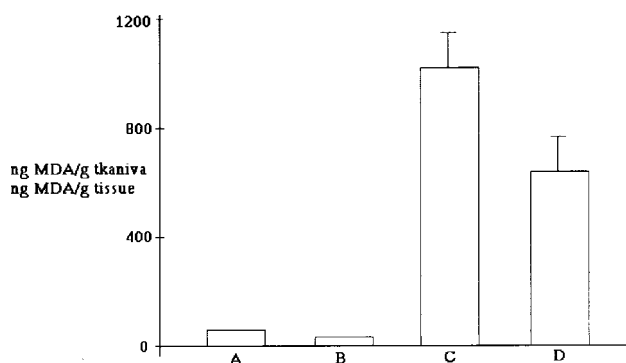
K homogenátu sme pridali  $\text{FeCl}_2$  a kyselinu askorbovú, pričom výsledné koncentrácie týchto látok boli  $10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$  iónov  $\text{Fe}^{2+}$  a  $2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$  kyseliny askorbovej. Súčasne sme do inkubačnej zmesi pridali buď kyselinu močovú v koncentráciách  $10^{-3}$ ,  $5 \cdot 10^{-4}$  a  $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ , alebo kreatínfosfát, prípadne karnitín, obidve látky v koncentrácii  $10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$ . Kontrolná vzorka neobsahovala žiadnu z uvedených látok. Pred začatím inkubácie sme z inkubačnej zmesi odobrili alikvotnú časť a zvyšok inkubačnej zmesi sme inkubovali v kyslíkovej atmosfére 15 minút pri  $37^\circ\text{C}$ . Po inkubácii sme v oboch vzorkách stanovili množstvo látok reagujúcich s kyselinou tiobarbiturovou podľa Uchiyamu a Micharu (1998). Tieto hodnoty vo výsledkoch uvádzame ako množstvo malóndialdehydu vytvoreného na gram čerstvého tkaniva.

Jednotlivé súbory sme navzájom medzi sebou štatisticky vyhodnotili párovým t-testom.

## Výsledky

V prvej časti našich pokusov sme porovnali intenzitu lipoperoxidácie v homogenáte mozgovej kôry a myokardu počas stimulácie lipoperoxidácie zmesou iónov železa  $\text{Fe}^{2+}$  a kyseliny askorbovej bez pridania antioxidantov. Ako vidieť na obrázku 1, počas 15-minútovej inkubácie v oboch tkanivách výrazne vzrástol počet látok pozitívne reagujúcich s kyselinou barbiturovou, množstvo týchto látok bolo však v homogenáte mozgovej kôry takmer dvojnásobne vyššie. V pokusoch, kde sme sledovali vplyv kyseliny močovej na stupeň lipoperoxidácie v homogenáte mozgovej kôry potkana, sme použili tri rôzne koncentrácie kyseliny močovej, a to 1, 0,5 a 0,05  $\text{mmol.l}^{-1}$ . Ako vidieť na obrázku 2, kyselina močová pri koncentráciách 1 a 0,5  $\text{mmol.l}^{-1}$  výrazne inhibovala tvorbu lipoperoxidov. Tento účinok však v koncentrácii 0,05  $\text{mmol.l}^{-1}$  nebol. Inhibičný vplyv kyseliny močovej na lipoperoxidáciu sa prejavil aj v homogenáte myokardu (obr. 3), aj keď tento efekt bol nižší v porovnaní s homogenátom mozgovej kôry.

Kreatínfosfát v koncentrácii 1  $\text{mmol.l}^{-1}$  významne inhiboval stupeň lipoperoxidácie v homogenáte mozgovej kôry (obr. 4), tento inhibičný účinok sme však v homogenáte myokardu nenašli (obr. 3).



Obr. 1. Porovnanie lipoperoxidácie v homogenátoch mozgovej kôry a myokardu potkana. A — mozog pred inkubáciou, B — myokard pred inkubáciou, C — mozog, D — myokard.

Fig. 1. Comparison of lipid peroxidation in homogenates of rat brain cortex and myocardium. A — brain before incubation, B — myocardium before incubation, C — brain, D — myocardium.

Kreatínfosfát sme testovali iba v homogenáte mozgovej kôry. Pri koncentrácii 1 mmol.l<sup>-1</sup> inhiboval lipoperoxidáciu, tento efekt bol však zo sledovaných látok najnižší a bol na hranici významnosti.

## Diskusia

Centrálny nervový systém je obzvlášť citlivý na atak voľnými radikálmi. Spôsobujú to viaceré faktory. V porovnaní s inými tkanivami tu ide o výrazne väčšiu ponuku substrátov pre lipoperoxidačné procesy, ktorými sú polynenasýtené vyššie karboxylové kyseliny. Tvoria podstatnú časť membránových štruktúr nervového tkaniva. Mozok má aj relatívne nízku antioxidačnú kapacitu, ktorú tvorí hlavne kyselina askorbová a superoxididismutáza (Rokyta, 1996). Na druhej strane oxidačný metabolizmus, pri ktorom sa tvorí aj značné množstvo kyslíkových radikálov, je v mozgu veľmi intenzívny, a tak ľahko vzniká oxidačný stres. Všetko spolu vytvára podmienky pre intenzívnu lipoperoxidáciu v nervovom tkanive. Potvrdili to aj naše výsledky, v ktorých sme porovnávali intenzitu lipoperoxidácie meranú cez tvorbu látok pozitívne reagujúcich s kyselinou tiobarbiturovou. Množstvo týchto produktov v homogenáte mozgovej kôry bolo po 15-minútovej inkubácii takmer dvojnásobné v porovnaní s homogenátom myokardu. Na druhej strane sú bunky myokardu v porovnaní s mozgom menej poškodené zníženým prívodom kyslíka, čo môže byť dôsledkom schopnosti týchto buniek kryť svoje energetické potreby zčasti anaeróbnym metabolizmom. Aj v tom možno hľadať príčinu menšieho ataku tohto tkaniva voľnými radikálmi kyslíka.

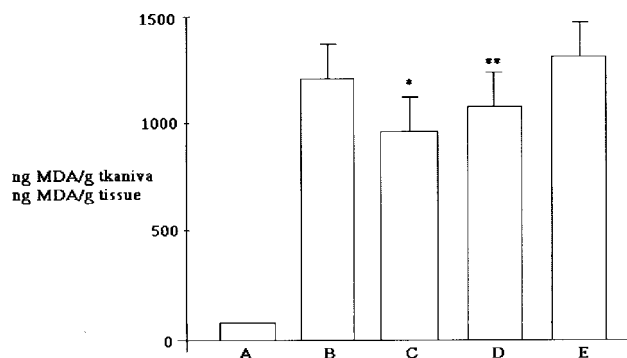
Funkciu antioxidantov v bunkách zastupujú jednak látky schopné viazať nespárený elektrón voľných radikálov, jednak enzýmové systémy bunky, ktoré katalyzujú ich premenu na menej toxické kyslíkaté produkty. Kyselina močová sa v súčasnosti považuje za jeden z prirodzených antioxidantov (Peden a spol., 1990), hoci mechanizmus jej účinku môže byť ako priamy „scavenger“ cez viazanie nespáreného elektrónu radikálu, alebo i inhibíciou tvorby kyslíkových radikálov vytváraním stabilného komplexu s iónmi železa. Výsledky našich pokusov ukázali, že kyselina močová pri koncentraciách porovnateľných s jej koncentraciou v krvnej plazme preukazovala protiradikálové pôsobenie v homogenátoch mozgovej kôry i myokardu. Antioxidačný účinok kreatínfosfátu i karnitínu v podmienkach in vivo nie je v ich priamej „scavengerovej“ aktivite, ale tieto metabolity zlepšujú predovšetkým energetický stav bunky (Zucchini a spol., 1989; Pecháň, 1997). Dobrý energetický stav bunky umožňuje udržiavať redukčný potenciál bunky potrebný pre inaktiváciu prebytočného množstva reaktívnych foriem kyslíka. Aj inhibičný efekt kreatínfosfátu na lipoperoxidáciu v homogenáte mozgovej kôry, ktorý sme zistili v našich pokusoch, by mohol byť dôsledkom zvýšenej hladiny makroergických fosfátov pochádzajúcich z kreatínfosfátu.\*

## Literatúra

Becker B.F.: Towards the physiological function of uric acid. *Free Radic. Biol. Mech.*, 14, 1993, s. 615—631.

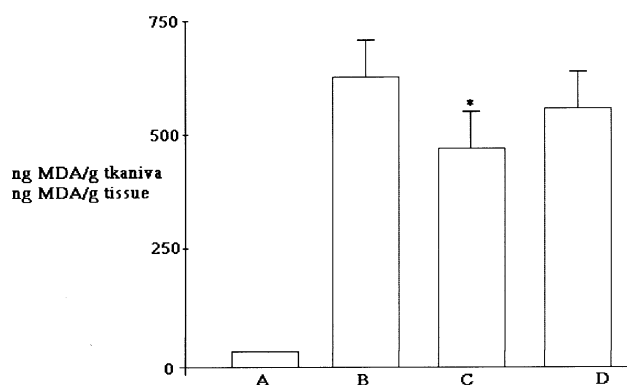
Davies K.I., Sevarnan A., Muakkassah-Keely S.F., Hochstein P.: Uric acid-iron ion complexes. A new aspect of the antioxidant functions of uric acid. *Bioch. J.*, 253, 1986, s. 747—754.

\* Prácu financoval VEGA grant č. 95/5195/641 MŠ SR.



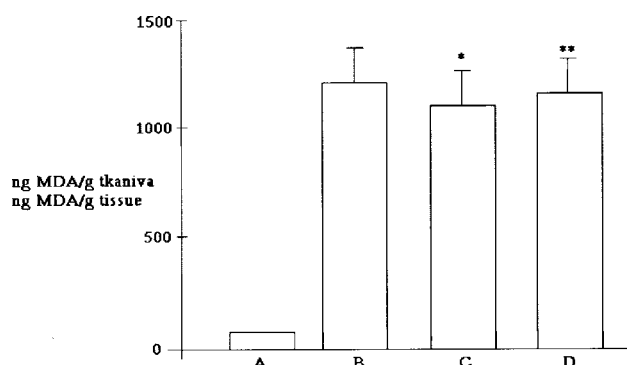
Obr. 2. Vplyv kyseliny močovej na lipoperoxidáciu v homogenáte mozgovej kôry potkana. A — pred inkubáciou, B — kontrola, C — 1 mM kyselina močová, D — 0,5 mM kyselina močová, E — 0,05 mM kyselina močová. \*p<0,0005, \*\*p<0,001.

Fig. 2. Effect of uric acid on lipid peroxidation in homogenates of rat brain cortex. A — before incubation, B — control, C — 1 mM uric acid, D — 0,5 mM uric acid, E — 0,05 mM uric acid. \*p<0.0005, \*\*p<0.001.



Obr. 3. Vplyv kyseliny močovej a kreatínfosfátu na lipoperoxidáciu v homogenáte myokardu potkana. A — pred inkubáciou, B — kontrola, C — 1 mM kyselina močová, D — 1 mM kreatínfosfát. \*p<0,02.

Fig. 3. Effect of uric acid and creatine phosphate on lipid peroxidation in rat myocardium. A — before incubation, B — control, C — 1 mM uric acid, D — 1 mM creatine phosphate. \*p<0.02.



Obr. 4. Vplyv kreatínfosfátu a karnitínu na lipoperoxidáciu v homogenáte mozgovej kôry potkana. A — pred inkubáciou, B — kontrola, C — 1 mM kreatínfosfát, D — 1 mM karnitín. \*p<0,001, \*\*p<0,02.

Fig. 4. Effect of creatine phosphate and carnitine on lipid peroxidation in rat brain cortex. A — before incubation, B — control, C — 1 mM creatine phosphate, D — 1 mM carnitine. \*p<0.001, \*\*p<0.02.

**Ďuračková Z.:** Antioxidanty v dobrom aj zlom. *Klin. Biochem. Metab.*, 5, 1997, s. 194–199.

**Chan P.K.:** Role of oxidants in ischemia brain damage. *Stroke*, 27, 1996, s. 1224–1229.

**Maples K.R., Mason R.P.:** Free radical metabolite of uric acid. *J. Biol. Chem.*, 263, 1988, s. 1709–1712.

**Peden D.B., Hohman R., Brown M.E.:** Uric acid is a major antioxidant in human nasal airway secretions. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 87, 1990, s. 7638–7642.

**Pecháň I.:** Kyselina močová ako významný antioxidačný metabolit. *Klin. Biochem. Metab.*, 3, 1995, s. 207–210.

**Pecháň I., Gabauer I., Halčák L., Rendeková V. a spol.:** Protective effect of L-carnitine in patients during open heart surgery. *Lab. Diag.*, 1, 1996, s. 29.

**Pecháň I.:** Ochrana pacienta pri kardiovaskulárnych chirurgických výkonoch. *Bratisl. lek. Listy*, 98, 1997, s. 646–650.

**Racek I., Holeček V.:** Nemoci a stavy spôsobené voľnými radikálmi a možnosti jejich výzkumu. *Klin. Biochem. Metab.*, 2, 1994, s. 94–98.

**Rokyta R., Racek I., Holeček V.:** Voľné radikály v centrálnom nervovom systéme. *Čs. Fyziol.*, 45, 1996, s. 4–11.

**Uchiyama M., Mihara M.:** Determination of malondialdehyde precursors by thiobarbituric acid test. *Analyt. Biochem.*, 86, 1978, s. 271–278.

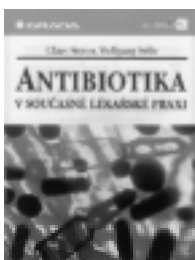
**Yau T.M., Weissel R.D., Mickle D.A.G.:** Vitamin E for corona bypass operations. A prospective, double-blind, random-ized trial. *I. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 108, 1994, s. 190–200.

**Zucchi R., Poddighe R., Limbuno U.:** Protection of isolated rat heart from oxidative stress by exogenous creatine phosphate. *J. Mol. Cardiol.*, 21, 1989, s. 67–73.

Do redakcie došlo 12.3.1998.

## PREDSTAVUJEME NOVÉ KNIHY

**Simon C., Stille W.:** **Antibiotika v súčasnej lekárskej praxi.** Praha, Grada Publ. 1998, formát B5, väzba V8, 87 tabuliek, 55 obrázkov, 712 strán, cena 770 Sk.



Práce profesora Simona sú známe odbornej verejnosti. K jeho najvýznamnejším odborným publikáciám nesporne patrí aj spoločné dielo s prof. Stillem „Antibiotika – Therapie in Klinik und Praxis“, ktoré vyšlo už v 8. prepracovanom a doplnenom vydaní vo vydavateľstve F.K. Schattauer (Stuttgart). Toto dielo si získali lekárov najmä svojím prístupom k tak náročnej a komplikovanej problematike, ako sú anti-

tibiotiká, ich začlenenie a využitie v praxi. Autori si nekladú za cieľ podať v diele encyklopedické informácie o dnes už „neprehľadnom“ množstve antibiotík a možnostiach ich využitia v klinike, ale sprostredkujú lekárovi praktické informácie, ako sa v tejto spleti orientovať v prospech pacienta. Preto treba vyzdvihnúť už šťastnú ruku prekladateľov, ktorí siahli práve po tejto publikácii, aby ju ešte viac priblížili našim lekárom. Treba uviesť, že kniha je primárne určená českým lekárom, preklad je so súhlasom autorov prispôbený podmienkam v Českej republike (dotatky a poznámky prekladateľov). Ale kniha je cenným zdrojom informácií aj pre našich lekárov. Už autori upozorňujú čitateľa na „opač-

ný“ postup pri čítaní knihy. Je písaná tak, že v tretej a štvrtej časti, kde sú uvedené problémy liečby infekčných ochorení a špeciálne terapeutické problémy, si lekár vyhľadá problém, ktorý ho zaujíma a až potom sa vráti na začiatok knihy, kde v prvej a druhej časti sa dozvie podrobnosti o bližšie určenej téme (základné princípy liečby antibiotikami a rozdelenie antibiotík). Pre študenta medicíny, ale aj pre lekára, ktorý si chce doplniť najnovšie poznatky z tejto oblasti, je iste vhodný aj opačný prístup a naštudovanie problematiky v „logickom slede“. Informácie sú vytriedené a ohodnotené praktickými skúsenosťami autorov – klinika a mikrobiológia. Autori nezostali pri opise antibiotík ako liekov, ale prinášajú cenné klinické informácie o antibiotickej liečbe. Náročnosť a vysoká odbornosť, s akou autori prezentujú uvedenú problematiku, sa prenášajú aj na čitateľa a tak autori odovzdávajú svoje poslanstvo – dôslednosť, odbornosť a naprostú profesionalitu pri antibiotickej liečbe na každého ošetrojúceho lekára. Vývoj problematiky naznačuje aj uvádzanie citácií za staťami len za posledných 8 rokov – staršie pramene sú uvedené v predchádzajúcich vydaniach. Informačnú hodnotu tejto publikácie zvyšuje aj prehľadný vecný index. Kniha je určená lekárom všetkých odborov, ktorí majú záujem o poznatky a skúsenosti svojich kolegov, aby sa vyvarovali chýb a omylov pri používaní antibiotík. Kniha môže slúžiť aj študentom medicíny v rámci pregraduálneho štúdia, resp. lekárom ako základná literatúra k atestáciám.

M. Bernadič