

ROLE OF FREE RADICALS, OXIDATIVE STRESS AND ANTIOXIDANT SYSTEMS IN LIVER DISEASES

JAKUS V, LOPUCHOVA M

ÚLOHA VOLNÝCH RADIKÁLOV, OXIDAČNÉHO STRESU A ANTIOXIDAČNÝCH SYSTÉMOV PRI OCHORENIACH PEČENE

Abstract

Jakus V, Lopuchova M:

Role of free radicals, oxidative stress and antioxidants systems in liver diseases

Bratisl Lek Listy 1999; 100 (10): 548–559

Recent experimental findings suggest that free radicals and oxidative stress play an important role in the pathogenesis of alcoholic and toxic liver diseases and viral hepatitis. The presented review summarizes knowledge on the pathomechanism of free radical reactions in liver diseases and the results of experimental observations of antioxidant systems and adjuvant antioxidant pharmacotherapy. Some of the hepatoprotective drugs have antioxidant activity and can produce such beneficial effects as membrane stabilisation, neutralization of free radicals and immunomodulation. Some liver diseases can be successfully prevented or treated by supplementation with antioxidant active substances of even plant origin. (Fig. 1, Tab. 3, Ref. 214.)

Key words: liver diseases, free radicals, oxidative stress, lipid peroxidation, antioxidants, plants.

Efektívna liečba i prevencia ochorení pečene pomocou vhodnej a účinnej farmakoterapie je ešte stále skôr prianiam ako skutočnosťou. Napriek tomu, že sme v posledných desaťročiach svedkami rýchleho nárastu poznatkov o vírusových hepatitídach, otázka ich liečby nie je doteraz doriešená. Aj pre ďalšie závažné ochorenia pečene, ako sú fibróza pečene a rôzne typy nádorov, sa efektívne a bezpečné liečivá iba hľadajú (67). Napríklad aj chronické, toxické poškodenie pečene (xenobiotikami vrátane liečiv) a jeho liečba predstavuje otvorený a často závažný problém klinickej hepatológie.

Možnosti cieleného liečebného zásahu pri ochoreniach pečene sú v súčasnosti pomerne skromné. Súvisí to s viacerými príčinami, najmä s nedostatočným poznaním patologických mechaniz-

Abstrakt

Jakuš V., Lopuchová M.:

Úloha voľných radikálov, oxidačného stresu a antioxidantných systémov pri ochoreniach pečene

Bratisl. lek. Listy, 100, 1999, č. 10, s. 548–559

Najnovšie závery experimentálnych výskumov naznačujú, že voľné kyslíkové radikály a oxidačný stres majú významný podiel v patogenéze alkoholových a toxických poškodení pečene a vírusových hepatitíd. Uvedený prehľad je súhrnom poznatkov o patomechanizme voľnoradikálových reakcií pri ochoreniach pečene a výsledkoch experimentálnych pozorovaní antioxidantných systémov a adjuvantnej antioxidantnej farmakoterapie. Niektoré z hepatoprotektív majú antioxidantnú aktivitu a môžu takto mať blahodárny vplyv, ako je membránová stabilizácia, neutralizácia voľných radikálov a imunomodulácia. Niektorým ochoreniam pečene možno predchádzať alebo ich úspešne liečiť suplementáciou antioxidantne pôsobiacimi látkami aj rastlinného pôvodu. (Tab. 3, obr. 1, lit. 214.)

Kľúčové slová: ochorenia pečene, voľné radikály, oxidačný stres, lipoperoxidácia, antioxidanty, rastliny.

mov na molekulovej úrovni. Treba mať na zreteli, že pečeň rýchlo metabolizuje a vylučuje liečivá, ktoré do nej vstupujú, ale je veľmi citlivá na predávkovanie (hepatotoxicita). Niektoré liečivá nie sú schopné dosiahnuť cieľové bunky alebo tkanivá v dostatočnej koncentrácii a vyššie dávky pečeň poškodzujú. Medzi perspektívne prístupy vo vývoji nových liečiv pre liečbu pečenevých ochorení možno zahrnúť bunkovo-špecifické zacielenie (targeting) molekúl protivírusových a protitumorózných látok, orgánovo-špecifické zacielenie antioxidantov, liečivá interferujúce s cytokínovým systémom pečene a proteíny skonštruované in vitro ako detoxifikačné prípravky proti endotoxínu a tumornekrotizujúceho (TNF) faktoru a potenciálne inhibitory fibrogenézy (67).

Dpt of Medical Chemistry, Biochemistry and Clinical Biochemistry, Medical Faculty, Comenius University, Bratislava. jakus@fmed.uniba.sk Hospital and policlinic S. Kukuřu, Michalovce

Address for correspondence: V. Jakus, PharmD, PhD, Dpt of Medical Chemistry, Biochemistry and Clinical Biochemistry, LFUK, Sasinkova 2, SK-811 08 Bratislava, Slovakia.
Phone/Fax: +421.7.52957 557

Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie Lekárskej fakulty Univerzity Komenského v Bratislave a Nemocnica s poliklinikou Š. Kukuřu v Michalovciach

Adresa: PharmDr., V. Jakuř, CSc., Ústav lekárskej chémie, biochémie a klinickej biochémie LFUK, Sasinkova 4, 811 08 Bratislava.

V súčasnosti sa používajú hepatoprotektíva, ktoré možno rozdeliť do troch skupín. Do prvej skupiny patria „klasické“ gastrointestinálne cytoprotektíva, ako sú prostaglandíny, do druhej skupiny patria enzýmové induktory alebo inhibítory pečeneového monooxidázového systému a do tretej skupiny vychytávače voľných radikálov, antioxidačné systémy a inhibítory lipoperoxidácie.

Ukazuje sa, že svoj nezanedbateľný význam má adjuvantná antioxidačná farmakoterapia, ktorá má opodstatnenie najmä pri alkoholových a toxických (chemických a liekových) poškodeniach pečene i vírusových hepatitídach, kde dochádza k zmenám markerov oxidačného stavu a/alebo k ich poklesu. V konečnom dôsledku je farmakologický účinok mnohých hepatoprotektív spojený s ich antioxidačnou aktivitou. Práve oxidačný stres hepatocytov spojený s tvorbou voľných radikálov pri uvedených ochoreniach pečene má významnú úlohu v metabolizme látok a liekov, ako aj v mechanizmoch možného poškodenia pečene.

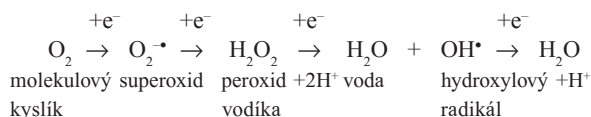
Vnútrotné a vonkajšie zdroje tvorby voľných radikálov

Voľné radikály sa všeobecne môžu tvoriť tromi možnými mechanizmami: 1. homolytickým štiepením kovalentnej väzby molekuly, kde si každý fragment ponechá elektrón, 2. stratou jedného elektrónu, 3. adíciou jedného elektrónu.

V biologických systémoch sa vytvárajú rôzne typy voľných radikálov a reaktívne metabolity kyslíka. Pryor (131) a Halliwell a Gutteridge (57) zosummarizovali všeobecné typy radikálov, ktoré sú zodpovedné za poškodenie tkanív. Voľné radikály môžu byť odvodené od kyslíka (31, 100), od dusíka (oxid dusnatý) (43, 163, 196, 210) a od organických zlúčenín (radikály s nespáreným elektrónom na uhlíku, dusíku alebo síre).

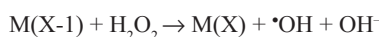
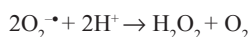
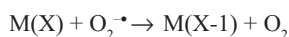
V biologických systémoch sa tvoria kyslíkové radikály: superoxidaniónový radikál (superoxid), hydroxylový radikál, peroxylové a alkoxylové radikály, oxid dusnatý a ďalšie biologicky aktívne formy kyslíka, ktoré nie sú radikály: peroxid vodíka, singletový kyslík, kyselina chlórna, ozón. Napr. izoforma P4501A2 sa môže zúčastňovať na demetylácii kofeínu v polohe 1, 3 a 7 (46), O-deetylácii fenaacetínu, N-hydroxylácii paracetamolu a lidokaínu, N-demetylácii imipramínu a N-dealkylácii verapamilu a propafenónu (47).

Postupná jednoelektrónová redukcia molekulového kyslíka vedie k tvorbe rôznych foriem kyslíka, vzťahy medzi ktorými možno prezentovať takto:



Superoxid môže konvertovať na peroxid vodíka a hydroxylový radikál Fentonovou reakciou, ktorú katalyzujú ióny prechodných kovov. Tieto kovové ióny majú schopnosť prijímať a odovzdávať elektróny a takto sa stávajú dôležitými katalyzátormi voľnoradikálových reakcií.

Vzťah medzi iónmi kovu (M) a reaktívnymi metabolitmi kyslíka možno vyjadriť takto (159):



Vnútrotnými zdrojmi tvorby voľných radikálov vo všeobecnosti môžu byť mitochondrie, peroxizómy, xantínoxidáza, kaskáda kyseliny arachidónovej, reakcie zahrňujúce ióny prechodných kovov, ischemicko-reperfúzne stavy, imunologické reakcie pri zápalovom procese a fagocytóze, reakcie v endoplazmovom retikule pri detoxikácii xenobiotík a tvorba Amadoriho (119, 133) a AGE-produktov (74, 203) pri diabetes mellitus, ale aj pri starnutí.

Vonkajšími zdrojmi voľných radikálov môžu byť rôzne organické zlúčeniny, organické rozpúšťadlá, pesticídy, lieky, znečistenia životného prostredia, ťažké kovy, rádiáca, ultrafialové svetlo, ozón a cigaretový dym.

Voľné radikály, oxidačný stres, lipoperoxidácia a pečeň

Tvorba voľných radikálov v bunkových štruktúrach a oxidačný stres

Mnohé bunkové štruktúry majú enzýmové aj neenzýmové systémy schopné aktivovať kyslík s následnou tvorbou reaktívnych metabolitov kyslíka. Sú to hlavne mitochondrie s dýchacím reťazcom, endoplazmové retikulum so systémom transportu elektrónov aktivovaného hemovým proteínom P450, peroxizómy obsahujúce enzým xantínoxidázu a cytoplazmová membrána obsahujúca NADPH-oxidázu.

Voľné radikály a reaktívne metabolity kyslíka sa produkujú v organizme za fyziologických podmienok po kontrolovanej stimulácii, keď sú nevyhnutnou súčasťou niektorých procesov, ako je napr. fagocytóza. Reaktívne metabolity však majú aj negatívnu úlohu v patogenéze mnohých ochorení. Môžu byť buď príčinou týchto patologických stavov, alebo sa tvoria ako ich dôsledok a spôsobujú sekundárne poškodenia.

Reaktívne metabolity kyslíka spôsobujú poškodenie biologicky významných molekúl prevažne tým, že ich oxidujú. Všeobecne sa preto volajú prooxidanty. Pre aeróbnny život je charakteristická neustála tvorba prooxidantov vyvážená ich spotrebou buď v niektorých fyziologických procesoch, napr. pri usmrtení mikróbov pri fagocytóze, buď ich elimináciou ochrannými systémami. Zachovanie integrity bunky a jej fyziologických funkcií vyžaduje rovnováhu systémov prooxidant — antioxidant. Trvalé narušenie tejto rovnováhy v prospech prooxidantov má za následok hromadenie prevažne oxidačne poškodených biomakromolekúl, čo môže vyústiť do patologického stavu. Takéto trvalé narušenie rovnováhy sa nazýva oxidačný stres (151).

Oxidačný stres je teda také narušenie rovnováhy dvojice systémov oxidant — antioxidant v prospech prooxidanta, ktoré spôsobuje poškodenie (151). Oxidačný stres charakterizujú indikátory oxidačného stresu, ako napr. produkty lipoperoxidácie alebo oxidačného poškodenia proteínov. Patologické stavy organizmu, ktoré súvisia s oxidačným stresom, sa označujú aj ako „voľnoradikálové ochorenia“. Patria medzi ne napríklad ischemicko-reperfúzne poškodenie pečene, srdca, mozgu, metabolické poruchy ako diabetes mellitus, ateroskleróza, rakovina. Vo všeobecnosti možno povedať, že neexistuje orgán alebo sústava, kde by sa voľné radikály alebo reaktívne formy kyslíka nemohli podieľať na jeho poškodení (152).

Mikrozómový monoxygenázový enzýmový systém a tvorba voľných radikálov

Mikrozómový monoxygenázový enzýmový systém (zmiešaný oxidačný systém) sa nachádza v endoplazmovom retikule (mik-

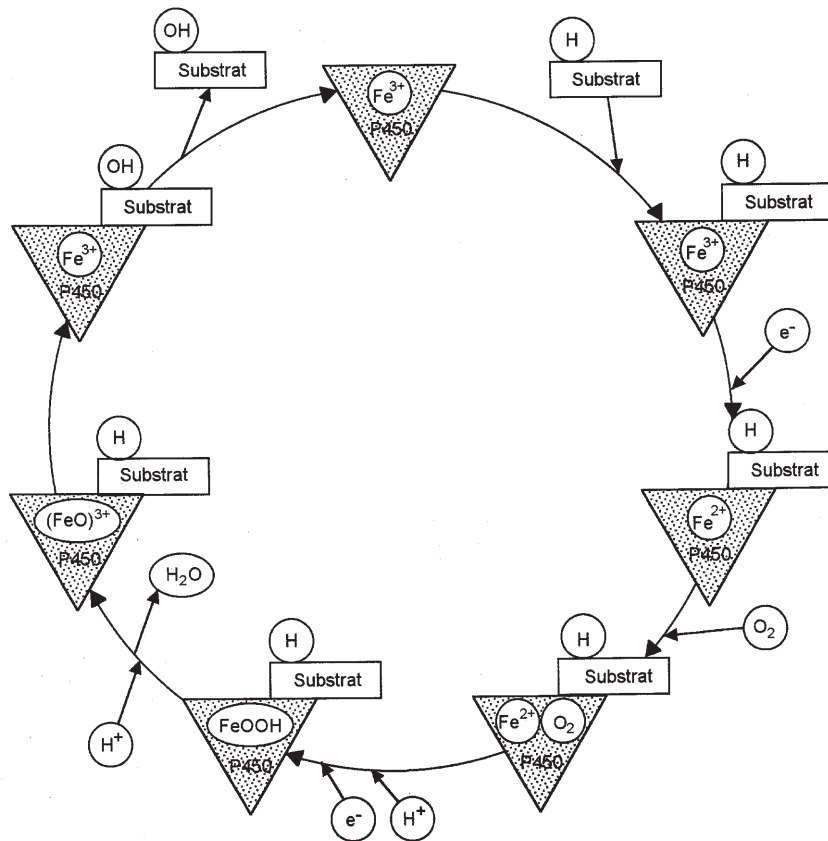


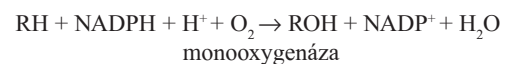
Fig. 1. Mechanism of cytochrom P450 monooxygenase reaction (Guengerich, 1993).
Obr. 1. Mechanizmus monoxygenázovej reakcie cytochrómom P450 (Guengerich, 1993).

rozomová frakcia) hepatocytov. Obsahuje oxidačné enzýmy I. fázy biotransformácie. Tvoria ho najmenej tri komponenty: hemoproteín cytochróm P450 (52), flavoproteín NADPH-cytochróm reduktáza, ktorá katalyzuje redukciiu cytochrómu P450 a termostabilný faktor, ktorý bol identifikovaný ako fosfatidylcholín. Fosfatidylcholín zodpovedá za fixáciu a usporiadanie predchádzajúcich dvoch zložiek v membránach endoplazmového retikula. Základom enzýmového systému je monoxygenáza, ktorá z molekuly kyslíka zabudúva jeden atóm do substrátu, kým druhý atóm sa redukuje na vodu. Tento typ enzýmov spája funkciu oxygenázy a oxidázy, a preto sa označuje aj ako oxidáza so zmiešanou funkciou. Donorom elektrónov pre mikrozomový monoxygenázový systém je NADPH, odkiaľ sa prenášajú flavínovou cytochrómreduktázou na cytochróm P450, ktorý aktivuje molekulový kyslík a zároveň katalyzuje jeho prenos do molekuly substrátu (pozri hypotetický mechanizmus na obrázku 1).

Cytochróm P450 enzýmový systém pozostáva z celého radu izoenzýmov, z ktorých má každý svoje zvláštne katalytické vlastnosti pre odlišné substráty, resp. ich skupiny. Pri metabolizme cudzorodých látok môžu tu prebiehať také reakcie, ako sú hydroxylácia, epoxidácia, N-, O- a S-dealkylácia, deaminácia, sulfoxidácia alebo oxidačná dehalogenácia.

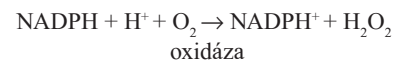
Cytochróm P450 slúži ako hlavný zdroj voľných radikálov a reaktívnych metabolitov kyslíka (13).

Monoxygenázová aktivita tohto enzýmového systému aktivuje kyslík, ktorý prechádza do substrátu (6):

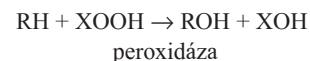


Takto pri oxidačnom metabolizme napr. xenobiótík vznikajú reaktívne metabolity, ktoré môžu poškodiť tkanivá.

Okrem monoxygenázovej aktivity má cytochróm P450 aj oxidázovú aktivitu, keď molekulový kyslík neprechádza do substrátu ale skôr sa kyslík uvoľní z oxokomplexu cytochrómu P450 ako superoxid, ktorý podlieha dismutácii za tvorby peroxidu vodíka.



Okrem toho cytochróm P450 môže mať aj peroxidázovú aktivitu, keď v prítomnosti organických hydroperoxidov ako donorov kyslíka uľahčuje oxidáciu lipidov a ostatných makromolekúl.



V anaeróbných podmienkach môže prejavovať cytochróm P450 aj reduktázovú aktivitu.

Hoci existuje viacero izoenzýmov cytochrómu P450, ktoré sa zúčastňujú na detoxikačných reakciách, cytochróm P450 I aktívuje rôzne xenobiotiká, ktoré môžu pôsobiť ako karcinogény, neantigény a imunotoxické látky. Cytochróm P450 IIE vytvára reaktívne metabolity kyslíka, ktoré môžu byť cytotoxické a karcinogénne. Cytochrómy P450E1 (26), P450 IIB a P450 IV tiež produkujú voľné radikály.

Ostatné systémy v pečeni zúčastňujúce sa na tvorbe voľných radikálov

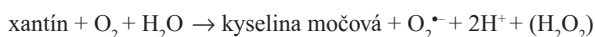
Voľné radikály sa produkujú a akumulujú tiež pri mitochondriovom a mikrozómovom transporte elektrónu alebo v peroxizómoch.

V pečňových bunkách je potenciálnym zdrojom superoxidu enzým desaturáza, ktorý je viazaný na endoplazmovom retikule a katalyzuje vznik dvojitej väzby medzi dvoma uhlíkmi v molekulách vyšších karboxylových kyselín. Systém vyžaduje kyslík, NADH alebo NADPH a osobitný cytochróm označovaný ako cytochróm b₅. Redukovaný cytochróm b₅ odovzdáva elektrón desaturáze, ale môže redukovať aj kyslík za tvorby superoxidu (58).

V pečeni sa nachádzajú enzýmy tryptofándioxygenáza a aldehydoxidáza, ktorá má širokú substrátovú špecifickosť a môžu byť tiež zdrojom tvorby superoxidu.

V bunkách sa nachádza enzým xantíndehydrogenáza, ktorá prenáša elektrón z xantínu na NAD⁺ (nie na kyslík) za tvorby kyseliny močovej a NADH. Pri zamedzení prístupu kyslíka do buniek (ischémia) sa zvyšuje rozklad ATP, pričom stúpa tvorba hypoxantínu. ATP sa rýchlo vyčerpáva, dochádza k dysfunkcii ATPázy, zvyšuje sa koncentrácia intracelulárneho Ca²⁺ a aktivujú sa proteázy.

Limitovanou proteolýzou sa z xantíndehydrogenázy tvorí xantinoxidáza. Substrátom pre xantinoxidázu je xantín alebo hypoxantín, ktorý sa bežne nachádza v bunkách. Po obnovení zásoby kyslíka (reperfúzia) prebieha reakcia:



Superoxid potom dismutačnou reakciou produkuje peroxid vodíka. Táto reakcia sa uplatňuje pri ischemicko-reperfúznom poškodení pečene, ale aj srdca, mozgu a pankreasu.

Biologické terče voľných radikálov

Voľné radikály a reaktívne metabolity kyslíka spôsobujú metabolické poruchy a poškodenie buniek interakciou s makromolekulami. Sú schopné chemicky modifikovať nukleotidy, proteíny a lipidy (153, 188) s následnými biologickými odozvami ako poškodením tkaniva, mutáciou, karcinogenezou, zmenami v imunitnom systéme, rôznymi chorobnými stavmi až smrťou bunky. Poškodenie DNA voľnými radikálmi vedie k cytotoxicite, chromozómovým aberáciám a onkogénnym transformáciám.

Pri poškodení proteínov dochádza k ich fragmentácii a agregácii, čo zvyšuje proteolýzu inaktiváciou inhibítorov proteolytických enzýmov a náchylnosť proteínov k hydrolyze. Pri aktivácii rôznych hydrolytických enzýmov môže nastať influx iónov kalcia, ktorý sa vyskytuje spravidla pri poškodení membrány voľnými radikálmi. Kalciové ióny aktivujú proteázy, endonukleázy a fosfolipázy.

Voľné radikály môžu inaktivovať rôzne enzýmy a oxidovať tiolové skupiny cytoskeletových proteínov s následným rozbitím or-

ganizácie cytoskeletových elementov, mikrotubulov a mikrofilamentov. Voľné radikály môžu ovplyvniť imunitný systém viacerými spôsobmi alebo sa zúčastňovať na vývoji endotelovej dysfunkcie (50).

Lipoperoxidácia a zosieťovanie proteínov v membránach je príčinou štruktúrneho poškodenia bunky.

Lipoperoxidácia a poškodenie biologických membrán

Voľné radikály môžu pôsobiť na organizmus celým radom mechanizmov, z ktorých najčastejšia je neenzýmová lipoperoxidácia a nešpecifická oxygenácia nenasýtených mastných kyselín.

Proces neenzýmovej, nešpecifickej peroxidácie nenasýtených mastných kyselín je v súčasnosti dobre charakterizovaný. Na začiatku voľný radikál atakuje nenasýtenú mastnú kyselinu a rozvinie sa kaskáda reakcií so vznikom ďalších radikálov, ktoré proces generujú. Retaz pokračuje, kým nezreagujú 2 radikály navzájom, alebo kým peroxylový radikál nie je inaktivovaný antioxidantnými látkami (2, 27, 28, 77, 78).

Dôsledkom lipoperoxidácie membránových lipidov môže byť zmena biofyzikálnych vlastností membrány: fluidity membrány, zmena fázových vlastností membrány, zníženie elektrickej rezistencie a zmena odolnosti proti termodenaturácii. Ďalej sa mení počet voľných SH-skupín proteínov a vytvorené krížové („cross-link“) väzby medzi zvyškami aminokyselín proteínov a aldehydovými produktmi lipoperoxidácie znižujú mobilitu membránových proteínov (190).

Lipoperoxidácia mitochondriovej membrány spôsobí napučanie až lýzu mitochondrie. Narušenie mitochondriovej membrány môže viesť k poškodeniu dýchacieho reťazca a zníženiu tvorby energie vo forme ATP. Toto má vážne patologické následky a môže viesť až k bunkovej smrti.

V prípade hepatocytov (128), ako aj lyzozómov sa po peroxidácii ich membrán zvyšuje priepustnosť, následkom čoho aj relatívne veľké intracelulárne enzýmy môžu „vytekať“ z bunky cez peroxidáciu poškodenú membránu.

Lipoperoxidácia je zvýšená pri akútnej hepatitíde, fulminantnej hepatitíde, chronickej aktívnej hepatitíde, steatóze pečene (12, 106, 199, 222) a toxickom poškodení pečene.

Lipoperoxidáciu môžu spôsobovať aj kovy – ortuť, kadmium, olovo, vanád a cín.

Aj spontánna lipoperoxidácia a reaktívne metabolity kyslíka vznikajúce pri respiračnom vzplanutí (pri fagocytóze) môžu prispievať k nahromadeniu peroxidov v pečňovom tkanive (45).

Mikrozómová lipoperoxidácia je spojená so stratou aktivít určitých enzýmov ako cytochrómu P450, NADPH-cytochróm c reductáza, glukóza 6-fosfatáza, UDP-glukuronyltransferáza, ornitín dekarboxyláza a aminopyrín demetyláza (202).

Najdôležitejšie aldehydy, ktoré vznikajú peroxidáciou lipidov, sú malondialdehyd (MDA), 4-hydroxynonenal (4-HNE) a diény (34, 137, 176).

MDA je konečný produkt lipoperoxidácie. Je to genotoxická látka, ktorá spôsobuje zosieťovanie (crosslink) a polymerizáciu proteínov a nukleotidov vedúcu k mutáciám s následnou karcinogenitou. Jeho toxicita vyplýva z reaktivity s biologickými nukleofilmi, ako sú aminokyseliny a tioly. Zosieťovanie a polymerizácia súčastí bunkových membrán mení ich vlastnosti, ako napr. zníženie membránového potenciálu so zmenenou priepustnosťou pre ióny a organické zlúčeniny.

Z kyseliny arachidónovej a linolénovej, ktoré sú súčasťou polárnych fosfolipidov, vzniká toxický produkt 4-HNE. Inhibuje mnoho bunkových funkcií — mitochondriovú (respirácia, fosfátový transport), anaeróbnú glykolyzu, syntézu DNA, RNA a proteínov, adenylátcyklázu a 5-nukleotidázu. 4-HNE vyvoláva lýzu erytrocytov, ľahko reaguje s tiolmi (glutatiómom), cysteínom a tiolovými skupinami proteínov. Inhibuje viacero enzýmov — mikrozómovú glukóza-6-fosfatázu, a cytochróm P450.

Detoxikácia 4-HNE môže prebiehať prostredníctvom glutatión-transferázového systému reakciami, ktoré katalyzuje aldehyddehydrogenáza a alkoholdehydrogenáza.

Určenie voľných radikálov a produktov lipoperoxidácie

Priame meranie voľných radikálov vzhľadom na ich krátku životnosť je ťažké. Jediná analytická metóda umožňujúca priame meranie voľných radikálov je elektrónová spinová rezonančná spektrometria (ESR), ale jej využitie pre meranie *in vivo* je z technických dôvodov mimoriadne problematické. Na detekciu superoxidu v biologických systémoch možno využiť luminiscenciu luminolu alebo lucigenínu. Metóda je vhodná na určenie antioxidačného stavu v organizme, t.j. na určenie vitamínov rozpustných vo vode a lipidoch, kyseliny askorbovej a antioxidačného enzýmu superoxidodismutázy v leukocytoch, erytrocytoch a ľudskej plazme. Na určenie superoxidu v tkanivových homogenátoch nie je vhodné použiť lucigenín, pretože je substrátom pre mikrozómovú NADPH oxidoreduktázu (147).

Väčšina meraní vychádza z určenia látok vzniknutých pôsobením voľných radikálov v organizme. Ide o určenie MDA, HNE a diénov (211).

Najčastejšou metodikou je stanovenie MDA pomocou tiobarbiturovej kyseliny za vzniku farebného produktu, ktorého absorbanca sa meria spektrofotometricky alebo fluorimetricky (107). Ďalšou možnosťou je metóda stanovenia MDA pomocou tenkovrstvovej chromatografie s denzitometrickým vyhodnotením (9).

Reakcia MDA s tiobarbiturovou kyselinou je nešpecifická. Farebnú reakciu s TBA poskytuje tiež bilirubín, DNA, sialová kyselina, deoxyribóza, prostaglandíny a tromboxány. V súčasnosti sa tieto produkty označujú ako látky reagujúce s kyselinou tiobarbiturovou (TBARS — thiobarbituric reactive acid substances). Jodometrické stanovenie využíva oxidačné aktivity lipoperoxidov, ktoré premieňajú jodidy na iodíny (54). Pre presné určenie sa používajú metódy vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie (HPLC), plynovej chromatografie (GLC) a hmotnostnej spektrometrie (25, 71).

Pre určenie hydroperoxidov lipidov sa používa viacero metód od spektrofotometrických až po presnejšie určenie pomocou HPLC. 4-HNE sa najčastejšie určuje pomocou HPLC. Konjugované diény sa merajú spektrofotometricky v UV oblasti alebo HPLC (200).

Chronické ochorenia pečene a adjuvantná antioxidačná farmakoterapia

Chronické ochorenia pečene sú sprevádzané rôznym stupňom poškodenia pečenejších funkcií (89, 111). Stupeň postihnutia proteosyntetickej funkcie súvisí s morfológickou formou ochorenia pečene (75, 162).

Medzi testy hodnotiace proteosyntézu patrí elektroforéza bielkovín, určenie množstva albumínu, ceruloplazmínu, alfa₁-antitryp-

sínu, alfa₁-fétoproteínu, aktivity cholinesteráz a hodnoty koagulačných faktorov.

Biochemické funkcie pečenejších buniek vykonávajú enzýmové systémy, ktoré sú viazané na subcelulárne štruktúry pečenejšej bunky. Pre výskum rôznych metabolických funkcií pečene existuje veľa funkčných skúšok, ktoré sa líšia vo svojej špecificite a senzitivite (33, 60, 154). Zhoršovanie proteosyntetickej funkcie pečene pri chronických hepatopatiách prejavuje určitý vzťah k zhoršovaniu funkcie biotransformačnej (82). Určenie proteosyntetickej funkcie pečene a biotransformačné testy odrážajú stav funkčnej kapacity mikrozómového enzýmového systému.

Medzi testy pečenejšej biotransformácie patrí aminopyrínový test, antipyrínový test (65, 66, 191), (¹⁵N)metacetínový test, test s kofeínom a monoetylglycínxylylidový test (83). Na posudzovanie chronického ochorenia pečene sú vhodné imunologické testy (111) a biochemické markery fibrogenézy, ktoré môžu byť užitočné aj pri sledovaní efektu liečby (170). Imunologické vyšetrenie sa týka imunoglobulínov, antinukleárných protilátok, protilátok proti hladkému svalu, mitochondriálnych protilátok, protilátok proti bunkovej membráne hepatocytu, špecifického pečenejšej lipoproteínu, protilátok proti pečenejšej a obličkovým mikrozómom a imunokomplexom.

Pri nekroze pečenejšej bunky sú zvýšené hodnoty aminotransferáz, aspartátaminotransferázy (AST), alanínaminotransferázy (ALT), laktátdehydrogenázy (LDH), glutamátdehydrogenázy (GMD) a glucitoldehydrogenázy (sorbitoldehydrogenázy).

Napriek tomu, že pečeň má vysokú antioxidačnú aktivitu, môže sa poškodzovať účinkom voľných radikálov po ischémii s následnou reperfúziou, pri alkoholových a toxických a vírusových hepatitídach. Znamením zníženej antioxidačnej ochrany pečene je znížená hladina vitamínu E a glutatiónperoxidázy (164). Výsledky práce Yamamota a spol. (201) na základe merania hladín plazmových antioxidantov u pacientov ukázali, že oxidačný stres sa zúčastňuje na rozvoji hepatitídy a následnej cirhózy a rakoviny pečene.

Antioxidačná farmakoterapia závisí od stupňa poznania úlohy voľných kyslíkových radikálov v patogenéze pečenejších ochorení. Jej cieľom je pozitívne ovplyvnenie priebehu choroby a rekonvalescencie a zníženie incidence ochorení v rámci prevencie. Látky s antioxidačným účinkom majú zabrániť rozvoju radikálového poškodenia vychytávaním iniciujúcich radikálov, viazať prechodné kovy, odstraňovať peroxidy a zastaviť ďalšie reakcie reaktívnych metabolitov kyslíka i reparovať vzniknuté poškodenia (5, 14, 59, 64, 85, 89, 102, 108, 132, 143, 156, 190).

Možnosť antioxidačnej farmakoterapie možno rozdeliť na použitie antioxidačných systémov — antioxidačných enzýmov a substrátov, biogénnych prvkov, kombinovaných liekových prípravkov, syntetických antioxidantov a liečiv s antioxidačnou aktivitou (59, 108, 143, 209).

Alkoholové poškodenie pečene, oxidačný stres a antioxidačné systémy

Vzťah medzi abúzm alkoholu a poškodením pečene bol známy už v staroveku. Napriek tomu, že alkohol má i určité priaznivé pôsobenie — zvyšuje hladinu HDL-cholesterolu a vďaka obsahu fenolových látok má i určitý antioxidačný efekt porovnateľný s vitamínom E, jeho chronická konzumácia prináša nepopierateľ-

né zdravotné riziká (20, 95, 96, 205, 169). Etanol významne ovplyvňuje metabolické pochody v pečeni, najmä glukoneogénu (177, 206), metabolizmus glycidov a lipidov (19, 20).

Odbúvanie alkoholu sa uskutočňuje v pečeni oxidáciou na acetaldehyd, ktorý je vysoko reaktívny, toxický a imunogénny. Na degradácii sa zúčastňuje predovšetkým cytosolová alkoholdehydrogenáza (ADH) obsahujúca zinok a mikrozómový cytochróm P450 a k nemu patriace reduktázy (tzv. microsomal ethanol oxidizing system). Existuje najmenej šesť tried ADH, z ktorých niektoré preukazujú genetický polymorfizmus, ktorý ovplyvňuje rýchlosť oxidácie etanolu. Následkom oxidácie etanolu je vzrast NADH/NAD⁺ redoxného potenciálu v cytosóle a mitochondriách spojený s následnými metabolickými poruchami. NADH inhibuje aj xantindehydrogenázu.

Experimentálne štúdie dokázali i ochrannú úlohu flavoenzymu xantinoxidázy v cytosole pred poškodením (120). Limitujúcim faktorom pre oxidáciu alkoholu je dostupnosť rôznych koenzymov, najmä NAD, NADP, FAD (92).

Sú známe 3 formy alkoholového poškodenia pečene: 1. steatóza 2. alkoholová hepatitída 3. alkoholová cirhóza.

Oxidačný stres má kľúčovú úlohu v patogenéze alkoholového poškodenia pečene vo všetkých 3 formách (84, 112, 172).

Experimentálne štúdie ukázali, že pri chronickej administrácii etanolu potkanom dochádza k inhibícii proteazómovej aktivity s následnou zvýšenou oxidáciou proteínov a ich akumuláciou (36).

Etanol indukuje špecifický mikrozómový cytochróm P 450E1 s následnou zvýšenou oxidáciou NADPH, tvorbou H₂O₂, produkciou etylesterov mastných kyselín, hydroxyetylových voľných radikálov a voľných kyslíkových radikálov a aktiváciou procesu lipoperoxidácie (115, 125, 155, 174). Zároveň oslabuje prirodzenú antioxidantnú ochranu organizmu (10). Klesá obsah GSH v pečeni (114), aktivita pečenevej katalázy (73) i pečenevej mitochondriovej superoxididizmutázy (MnSOD). Stúpa pomer NADH/NAD⁺ s následnou zmenou redoxného systému a nahromadením redukujúcich ekvivalentov. To je nevýhodné pre funkciu hepatálnych mitochondrií, ktoré menia štruktúru a funkčnú integritu (44, 73, 178). Znižuje sa oxidácia v mitochondriách, nastáva mutácia mitochondriovej DNK (23, 173) s následným poklesom energetického výkonu mitochondrií. Stúpa syntéza voľných mastných kyselín, dochádza k hromadeniu triacylglycerolov v hepatocytoch (93).

Tukové kvapôčky postupne vytlačia jadro hepatocytu na perifériu. Narušujú sa membrány susedných hepatocytov s mezenchýmovou reakciou a aktiváciou Kupfferových buniek. Objavujú sa reaktívne, prípadne reparačné zápalové prejavy s postupným ubúdaním parenchýmu. Prítomnosť tukových kvapôčiek v cytosóle hepatocytov postupne mení štruktúru bunkových membrán, zhoršuje transportné procesy a narušuje metabolické deje súvisiace s membránovoviazanými enzýmami. Poškodený hepatocyt nie je schopný energeticky pokryť biosyntézu fosfolipidov a realizovať vhodné reparačné procesy (175).

Voľnoradikálové poškodenie má úlohu i v patogenéze hematologických komplikácií spojených s alkoholovým poškodením pečene (makrocytóza, hemolytická anémia). Klesá počet erytrocytov, hladina nenasýtených mastných kyselín, GSH i vitamínu E, znižuje sa aktivita pyruvátkinázy. Erytrocyty sú oveľa citlivejšie na prooxidatívne pôsobenie voľných kyslíkových radikálov (40, 41). In vitro štúdie krvi pri alkoholových poškodeniach pečene (hepatálna steatóza, chronická hepatitída a hepatálna cirhóza) uká-

zali zvýšenie aktivity sérovej betaglukuronidázy a kyslej fosfatázy (41). Pri alkoholovej cirhóze pečene sa poškodenie lyzozómov v dôsledku lipoperoxidácie potvrdilo elektrónmikroskopicky.

Pri chronickom abúze alkoholu s mierne zmenenými pečenevými funkciami sa nezistila signifikantne vyššia koncentrácia protilátok proti fosfolipidom a oxidovaným LDL (209).

Pri chronickom abúze alkoholu dochádza k ireverzibilným zmenám pečenevého parenchýmu (nekróza a apoptóza hepatocytov (63), novotvorba väziva, aktivácia stelátových buniek, centrocinózná fibróza), so vznikom alkoholovej hepatitídy a následne alkoholovej cirhózy (41, 94, 130).

Poznanie patogenézy alkoholového poškodenia pečene s účasťou voľných radikálov prispelo k zhodnoteniu súčasných možností i perspektív antioxidantnej farmakoterapie (113), ktorá sa dosiaľ považovala za módnú až placebovú. Prehľad použitých látok s antioxidantnou aktivitou pri experimentálnych i klinických štúdiách je v tabuľke 1.

Medzi najčastejšie používané látky patrí zmes flavonoidov Silybum marianum — silymarín (preparáty Flavobion, Hepabene, Legalon). Silymarín predstavuje zmes flavonolignanových izomérov silibininu, silichristínu a silidianínu. Má antioxidantné účinky popri ostatných dôležitých farmakologických účinkoch.

Silymarín, hoci nemá priamy vplyv na metabolizmus etanolu, preukazuje hepatoprotektívny účinok pri chronickej expozícii etanolu. V experimentoch na zvieratách sa ukázalo, že silymarín môže zmierniť alebo inhibovať fibrózu pečene (inhibíciou proliferácie stelátových buniek) (48).

Silymarín, ako ukázali klinické štúdie, spomaľuje proces lipoperoxidácie a posilňuje antioxidantnú ochranu organizmu. Po podávaní silymarínu sa zvyšuje aktivita sérovej glutatióperoxidázy, dochádza k poklesu tvorby malondialdehydu a ďalších toxických produktov lipoperoxidácie, znižuje sa oxidácia SH-skupín aminokyselín a zabráni následnej zmene štruktúry proteínov (41). Silymarín má lipotropné vlastnosti a stabilizujúci účinok na membrány buniek a mitochondrií. Paradoxne môže mať silymarín inhi-

Tab. 1. Experiments with antioxidant systems and antioxidant pharmacotherapy in alcoholic liver damage.

Tab. 1. Experimenty s antioxidantnými systémami a antioxidantná farmakoterapia pri alkoholovom poškodení pečene.

Drug Liečivo	References Literatúra
silymarin	Fehér et al., 1989a Lang et al. 1990; Lang et al., 1993 Pares, 1998
essential phospholipids	Szántová et al., 1996 Chwiecko et al., 1998
α-lipoic acid	Akabane, 1961 Bustamante et al., 1998
polyenylfosfatidylcholine	Lieber, 1997a
S-adenosylmethionine	Lieber, 1997b Fernandez-Checa et al., 1998
Heparegen	Farbiszewski et al., 1991
D-penicillamine	Farbiszewski et al., 1991
L-carnitin	Calabrese and Rizza, 1999
S-adenosyl L-methionin	Bosch-Morell, 1998
N-acetyl-L-cystein	Bosch-Morell, 1998
D-α-tocopherol+Se+Zn	Wenzel et al., 1993
vitamine E	Porta, 1997
Cu+Zn+MnSOD	Zhao et al., 1996
Nitroxide (NO)	Gergel et al., 1997
16-desmethyl tirilazad	Sadrzadeh and Nanji, 1998

bičný účinok na cytochróm P450 detoxikačný systém. Pokusy na morčatách ukázali, že silybín inhiboval viaceré špecificky indukované P450 enzýmové izoformy (7).

Pri dlhodobom užívaní silymarínu stúpa aktivita CuZnSOD v erythrocytoch i lymfocytoch. Preukazuje sa aj určitý imunomodulačný efekt (41, 101, 121). Silymarín selektívne inhibuje NF-B aktiváciu v HepG2 (142), a teda preukazuje protizápalové účinky pri ochoreniach pečene.

V experimentálnych i klinických štúdiách sa potvrdila dôležitá pozitívna úloha dlhodobej substitúcie esenciálnych fosfolipidov (preparát Essentiale forte), ktoré majú dôležitú úlohu pri regenerácii buniek, ovplyvňujú metabolické procesy so zvyšovaním exkretnej a detoxikačnej kapacity, pôsobia na stabilizáciu bunkových membrán a zlepšujú ich fluiditu. Majú teda cytoprotektívny a antifibrotický efekt. Ich výhodou je minimum nežiaducich účinkov a veľmi dobrá znášateľnosť i pri dlhodobej liečbe (68, 91). Preparát Essentiale forte predstavuje zmes cholínfosfatidov s vysokým obsahom polyénových karboxylových kyselín. Perorálne podávané fosfolipidy sú schopné inkorporovať sa do membrán hepatocytov. Predpokladá sa protizápalový efekt esenciálnych fosfolipidov a regulačný účinok na imunologické procesy. Počas liečby dochádza k zníženiu hladín IgG a IgM (175).

V experimentálnych štúdiách sa potvrdil ochranný účinok polyenylfosfatidylcholínu (PPC) a S-adenozylmetionínu pred progresiou alkoholovej cirhózy u potkanov (93). Obe látky znižujú oxidačný stres a znižujú poškodenie mitochondrií.

Do skupiny hepatoprotektívne pôsobiacej antioxidantov látok môžeme zaradiť i kyselinu alfalipoovú (tioktovú) (preparát Thiocetacid), ktorá je kofaktorom pri oxidačnej dekarboxylácii pyruvátu na acetylCoA. Experimentálne štúdie a klinické skúšky za posledných 5 rokov pri použití vysokých dávok (600 mg u ľudí) alfalipoovej jednoznačne poukazujú na jej terapeutické využitie pri liečbe inzulínovej rezistencie a diabetickej polyneuropatie.

Kyselina alfalipoová zvyšuje detoxikačnú schopnosť hepatocytov a stimuluje proteosyntézu (117). V modelových experimentoch na zvieratách (králikoch) sa zistil pozitívny vplyv alfalipoovej kyseliny pri akútnej intoxikácii etanolom (4). Priaznivý účinok alfalipoovej kyseliny si možno vysvetliť tým, že má opačný účinok ako etanol: znižuje pomer NADH/NAD⁺ prostredníctvom celulárnej redukcie na dihydroliipoovú kyselinu pomocou NADH a NADPH, čím sa vytvára NAD⁺ a NADP⁺.

Využitie alfalipoovej kyseliny pri liečbe intoxikácie alkoholom u ľudí referovali Rausch už roku 1956 a Deutsch roku 1960 (197). Autori ukázali, že alfalipoová kyselina bola efektívna pri liečbe hepatálnej kómy a alkoholovej hepatitídy a doporučujú jej využitie pri akútnej intoxikácii alkoholom. Spoločným výsledným efektom týchto látok je zlepšenie klinického stavu pacienta, zlepšenie biochemických ukazovateľov a zlepšenie sonografického nálezu pečene.

Toxické poškodenie pečene

Toxické (chemické a liekové) poškodenie pečene, mechanizmy jeho vzniku, ako aj možnosti prevencie, diagnostiky a liečby predstavuje závažný problém v klinickej hepatológii a toxikológii (213). Existuje veľké množstvo chemických látok, ktoré poškodzujú pečeň. Niektoré z nich sú skutočne pravé toxíny zasahujúce pečeň priamo alebo nepriamo. Iná skupina chemických lá-

tok, liekov je len potenciálne hepatotoxická (idiosynkrázia). Chemické látky môžu vyvolať akútne poškodenie hepatocytu (cytotoxické poškodenie), alebo spôsobujú cholestázu (cholestatické poškodenie) najčastejšie sa však obe formy kombinujú.

Klasifikácia hepatotoxických látok

Existujú dve hlavné skupiny hepatotoxických látok. V prvej skupine sú pravé (skutočné, obligátne) hepatotoxíny, v druhej skupine sú potenciálne (fakultatívne) hepatotoxíny, ktoré poškodzujú pečeň len u neobvykle vnímavých osôb (idiosynkrázia). Pravé hepatotoxíny poškodzujú pečeň exponovaných osôb veľmi často, závažnosť lézie závisí od dávky toxínu a je reprodukovateľná v experimente na zvierati. Potenciálne hepatotoxíny pôsobia škodlivo na pečeň len u malej časti exponovaných osôb, poškodenie nezávisí od dávky a nemožno ho reprodukovat v pokuse na zvierati.

Pravé hepatotoxíny delíme na priame a nepriame. Priame hepatotoxíny alebo ich metabolické produkty poškodzujú hepatocyty fyzikálno-chemickým pôsobením na membrány, následkom čoho vzniká nekróza alebo steatóza. Nepriame hepatotoxíny poškodzujú hepatocyty selektívnou interferenciou s metabolickou alebo exkretnou funkciou pečene. Štruktúrne poškodenie je až na druhom mieste. Poškodenie pečene spôsobené nepriamymi hepatotoxínmi je hlavne cytotoxické (steatóza alebo nekróza) alebo cholestatické. Nepriame cholestatické hepatotoxíny poškodzujú pečene funkcie selektívnou interferenciou s pečeneovým exkretným mechanizmom.

Potenciálne hepatotoxíny spôsobujú poškodenie pečene. Následkom idiosynkrázie má buď imunologický alebo metabolický podklad, t.j. vzniká na podklade alergickej reakcie alebo na základe metabolickej odchýlky jedinca, ktorá umožňuje tvorbu hepatotoxického metabolitu. Niektoré lieky môžu vytvárať kombinované nežiaduce účinky.

Toxické poškodenie pečene, oxidačný stres a antioxidantné systémy

Pečeň má významné miesto v biotransformácii xenobiótík, pretože obsahuje biotransformačný enzýmový systém. Biotransformáciu zabezpečuje hladké endoplazmové retikulum, kde sú lokalizované špeciálne enzýmové systémy. Najväčší význam má mikrozómový monoxygenázový enzýmový systém, kde má kľúčovú úlohu cytochróm P450.

Je známych mnoho látok, ktoré sú schopné modulovať enzýmovú aktivitu v zmysle inhibície, inaktívácie alebo reaktívácie alebo vyvolať indukciu alebo represiu enzýmov. Vznik toxických metabolitov sa vysvetľuje predovšetkým nedostatočne rýchlym vznikom hydroxylovaných metabolitov alebo ich nedostatočnou konjugáciou s kyselinou glukurónovou. Vznikajú tak vysoko aktívne alkylové a arylové radikály (159), ktoré sa hromadia a ireverzibilne viažu kovalentnou väzbou na bielkovinové štruktúry hepatocytov — membrán, organel, enzýmov, RNA i DNA. Vznikajúce zlúčeniny poškodzujú pečene bunky a spôsobujú degeneratívne až nekrotické zmeny. V patogenéze toxického poškodenia pečene, ako sme už uviedli, má dôležitú úlohu oxidačný stres.

Toxické poškodenie pečene môže byť spôsobené chemickými látkami vonkajšieho prostredia, liekmi alebo látkami rastlinného pôvodu. Častým príznakom toxického poškodenia pečene je vznik steatózy (21, 179, 182, 184). Môže sa vyvinúť obraz akútnej toxikkej hepatitídy i poškodenie typu chronickej autoimunitnej he-

patitídy alebo pečeňová fibróza, či cirhóza, zriedkavo až tumory pečene. Podobne ako etanol aj iné xenobiotiká (napr. hydrazínsulfát, fosmet a iné) významne ovplyvnia metabolizmus lipidov a sacharidov v pečeni a inhibujú glukoneogénu (181, 183).

Najviac znalostí o hepatotoxickom účinku a výraznom negatívnom efekte na rovnováhu oxidant — antioxidant je pri týchto látkach: halogénované uhľovodíky, predovšetkým tetrachlórmetán (185), aromatické amíny a nitroderiváty, hydrazínsulfát (180), fosmet (184), metanol, insekticídy, ťažké kovy (32, 156, 160), fumonisin B (1), amanitin a z medikamentov izoniazid (193), alfa-metyldopa, hydralazín, fenobarbital (189), fenacetín, nitrofurantoin a diclofenak (17).

Tieto látky spôsobujú abnormálnu funkciu pečeňových mikrozmálnych enzýmov, mitochondrií (76), proteolytických enzýmov, modifikujú zloženie membránových lipidov a proteínov. Indukujú proces lipoperoxidácie (137, 138), ktorej produkty (napr. malónialdehyd a 4-hydroxynonenal) stimulujú zápalovú odpoveď a syntézu kolagénu. Klesá aktivita superoxid-dismutázy, katalázy, glutatiónperoxidázy, koncentrácia tokoferolu, retinolu, kyseliny askorbovej, glutatiónu. Výsledkom je deštrukcia hepatocytov.

Antioxidačná farmakoterapia pri toxickom poškodení pečene má za cieľ zastaviť alebo aspoň znížiť tvorbu voľných radikálov a ochrániť bunky i tkanivá pred ich negatívnym pôsobením (tab. 2).

Tab. 2. Experiments with antioxidant systems and antioxidant pharmacotherapy in toxic liver damage (zonal and diffusion necroses and steatoses).

Tab. 2. Experimenty s antioxidačnými systémami a antioxidačná farmakoterapia pri toxickom poškodení pečene (zonálne a difúzne nekrózy a steatózy).

Liver damage by compound Poškodenie pečene látkou	Drug Liečivo	References Literatúra
CCl ₄	dithiothreitol tetraacetate	Mecca et al., 1993
Thioacetamid	aminoguanidine	Diez-Fernandez et al., 1998
CCl ₄	α-lipoic acid	Paterni, 1957 Vancini, 1959; Stoyanovsky and Cederbaum, 1996
CCl ₄	vitamin E	Liu et al., 1995
CCl ₄	schisandrin B	Ip and Ko, 1996; Mak and Ko, 1997
CCl ₄	punicalagin	Lin et al., 1998
Kadmium	N-acetylcysteine Vitamin E	Shaikh and Zaman, 1999
CCl ₄ olovo	ubichinone captopril	Takahashi et al., 1996 Gurer et al., 1999
CCl ₄ +tetra-cyclin+etanol	NaSe+vitamin E	Oleinik, 1983
phosmet	silymarin	Uličná et al., 1988 a, 1989
hydrazínsulphate	silymarin	Uličná and Brixová 1985 a, b
D-galactosamin	cresacin	Korda, 1998
acetaminophen	L-methionine	Kroger et al., 1997
acetaminophen	acetylcysteine	Kroger et al., 1997
acetaminophen	S-allylmercaptocysteine	Sumioka et al., 1998
2-nitropropan	green tea	Sai et al., 1998
acetaminophen	ebelen	Harman et al., 1992, Li et al., 1994
acetaminophen	nicotinamide+N-acetylcysteine or L-methionine	Kroger et al., 1997

Najväčší praktický význam majú flavonoidy, medzi ktoré patrí už uvedený silymarín, ale i rutín, Cu-komplex rutínu (3), kvercetin a diosmetín s výrazným protektívnym účinkom na peroxidáciu lipidov a ovplyvnením antioxidačných enzýmov v pečeni (157).

Kyselina alfalipoová priaznivo napomáha syntéze koenzýmu A a aktivuje mitochondriálne dýchacie enzýmy. Zvyšuje hladinu glutatiónu, ktorý má dôležitú úlohu v metabolizme xenobiotík. Je veľmi účinným vychytávačom voľných kyslíkových radikálov. In vitro zvyšuje pomer NAD⁺/NADH, má stabilizačný vplyv na oxidáciu indukovanú zvýšením intracelulárnej koncentrácie Ca²⁺ (22). V experimente u potkanov podávanie kyseliny alfalipoovej zabráni rozvoju symptómov deficitu vitamínov E a C (139). Pôsobí ako chelatačná látka pre ióny niektorých kovov (Cu²⁺, Fe³⁺, Cd²⁺) a tým znásobuje svoj antioxidačný efekt. Vitamín E upravuje narušenú prooxidačno-antioxidačnú rovnováhu v pečeni predovšetkým pri toxickom poškodení ťažkými kovmi. Zvyšuje aktivitu superoxid-dismutázy, glutatiónperoxidázy a katalázy. Pri vysokej miere lipoperoxidácie je potrebné synergické pôsobenie viacerých antioxidantov.

Vírusové hepatitídy, oxidačný stres a antioxidačné systémy

Kľúčová úloha voľných kyslíkových radikálov a oxidačného stresu v patogenéze alkoholovej a toxickéj hepatitídy i význam antioxidantov v ich terapii sú dnes už potvrdené.

Skupina vírusových hepatitíd, najmä chronické formy vírusových hepatitíd B, C, D a fulminantné hepatitídy predstavuje vážny zdravotnícky problém (111). V súčasnosti rozlišujeme 6 typov: VHA, VHB, VHC, VHD, VHE a VHG. Vírusové hepatitídy sa nezaraďujú medzi typické voľnoradikálové ochorenia. Existuje však dostatok dôkazov, že ich priebeh je sprevádzaný oslabením antioxidačnej ochrany organizmu. Redukovaná je hladina glutatiónu v plazme a erytrocytoch, plazmatická koncentrácia vitamínu E a vitamínu C (148). Predovšetkým vírusy hepatitídy B a hepatitídy C indukujú tvorbu reaktívnych metabolitov kyslíka a dusíka. Aktivujú fagocyty a produkciu prooxidačne pôsobiacich cytokínov (tumor necrosis factor, interleukín-1). Vitamín E v súčinnosti s vitamínom C sú schopné inhibovať tento efekt (148). Zistilo sa, že u pacientov s chronickou hepatitídou (166), ako aj s chronickou hepatitídou C (CHC) (62, 146) boli zvýšené koncentrácie produktov lipoperoxidácie v sére. Nedávno bola vyvinutá špecifická metóda na stanovenie MDA v sére, vhodná ako dodatočná testovacia metóda pre klinický manažment pacientov s chronickou hepatitídou C (138). Zvýšený oxidačný stres pri chronickej hepatitíde vedie k aktivácii stelátových buniek a k rozvoju hepatálnej fibrogenézy (69). Navyše infekcia vírusom hepatitídy C môže byť rizikovým faktorom pre rozvoj diabetes mellitus (103).

Súčastou nešpecifickej liečby vírusových hepatitíd je podávanie hepatoprotektív. Uplatňujú sa predovšetkým cholín a metionín (Lipovitan) pre svoje lipotropné vlastnosti, silymarín, kyselina alfalipoová, esenciálne fosfolipidy (60), kyselina tiazolín-4-karboxylová (Heparegen) ako nosiči sulfhydrylových skupín, ktoré zasahujú do detoxikačných a regeneračných pochodov pečene (109). V terapii akútnej vírusovej hepatitídy sa podávajú vitamínové prípravky skupiny B ako doplnok diéty. Podávanie hepatoprotektív typu Lipovitanu, Essentiale forte nemá iný zmysel

než opäť zaistiť zvýšený prísun vitamínov skupiny B. Hepatoprotektíva na báze silymarínu výraznejšie priebeh choroby neovplyvnia. Majú význam vtedy, keď hepatitídu komplikuje iné chronické ochorenie so sklonom k poškodeniu pečene (214). Viaceré klinické štúdie ukázali, že jedine *Picrorhiza kurroa* (Scrophulariaceae) účinne inhibuje HBV antigény pri vírusovej hepatitíde typu B a je hodnotným prostriedkom na liečbu vírusových hepatítid (101).

V poslednom období sa uvažuje i o možnosti uplatnenia N-acetyl-cysteínu ako donora sulfhydrylových skupín hlavne v terapii chronických vírusových hepatítid (194). V kombinácii s interferónom alfa jeho podávanie v dávke 600 mg denne 5–6 mesiacov viedlo k normalizácii hladín sérových aminotransferáz a spomaleniu až zastaveniu procesu fibrogenézy (16). Liečba interferónom alfa pri hepatitíde typu B a C zvyšuje tvorbu prostaglandínu E₂, redukuje oxidačný stres (110) a súčasná suplementácia vitamínom E upravuje hladiny AST (192). Pri liečbe chronických vírusových hepatítid typu B interferón alfa pôsobí proti-vírusovo a má imunostimulačný účinok. Účinnosť liečby hepatitídy B a C interferónom je len 20–25 %. Zdá sa, že pri liečbe vírusovej hepatitídy typu C majú budúcnosť multiliekové prípravky, ktoré okrem antioxidantnej aktivity preukazujú aj inhibíciu hepatálnej C vírusovej proteázy a RNA polymerázy.

Využitie antioxidantov (tab. 3) všeobecne v terapii vírusových ochorení možno očakávať na rozličných úrovniach. Výsledky súčasného výskumu naznačujú, že podstatný deficit antioxidantov môže mať dramatický vplyv na rozvinutie sa vírusového ochorenia (126, 127). Zdá sa, že pochopenie súvislostí medzi vírusovou infekciou, odozvou hostiteľa na vírus a oxidačným stresom môže byť významným terapeutickým nástrojom pre kontrolu patogenézy i onkogenézy vírusov (8). Zvýšenie efektívnosti antioxidantnej farmakoterapie by sa mohlo dosiahnuť cez orgánovo-špecifické zacielenie antioxidantov s využitím molekulárnych techník.

V súčasnosti možno využiť antioxidanty ako podporný prostriedok na redukciu oxidačného stresu a zníženie incidencie rakoviny pečene ku konvenčnej terapii vírusových ochorení pečene.

Tab. 3. Experiments with antioxidant systems and antioxidant therapy in viral hepatitis.

Tab. 3. Experimenty s antioxidantnými systémami a antioxidantná farmakoterapia pri vírusovej hepatitíde.

Drug Liečivo	References Literatúra
Picrorhiza	Vaidya et al., 1996
N-acetyl-cysteine	Weiss et al., 1996
adjuvant antioxidant therapy	Wenzel et al., 1993
antioxidant systems	Pak and Nikitin, 1991; Nordmann et al., 1994; Perasidin et al., 1995
metallothionein I	Quaife et al., 1999
SOD	Larrea et al., 1998
d- α -tocopherol	Houglum et al., 1997
interferon- α	Mutlu-Turkoglu et al., 1997
interferon- α +vitamin E	von Herbay et al., 1997

*Práca bola čiastočne sponzorovaná grantovou úlohou MŠ SR č. 2/6027/99 a Katholischer Akademischer Dienst, Bonn, Deutschland.

Prehľad rastlín používaných v terapii ochorení pečene

Klinický výskum v tomto storočí potvrdil účinnosť liečby rôznych pečenejých ochorení rastlinami, ktoré obsahujú aj prírodné látky s antioxidantnou aktivitou a navyše vykazujú nízku incidenciu vedľajších príznakov. Návrat k prírode má takto opodstatnenie a pravdepodobne veľkú budúcnosť. V súčasnosti mnohí výskumní pracovníci intenzívne testujú farmakologické účinky látok z rastlín. Približne 700 druhov rastlín sa vyskúšalo pre využitie pri liečbe rôznych ochorení pečene.

Pre liečbu ochorení pečene sú vhodné rôzne hepatoprotektívne, resp. antioxidantne pôsobiace prírodné zložky, ktoré obsahujú tieto rastliny: *Silybum marianum*, *Picrorhiza kurroa*, *Curcumin longa*, *Camellia sinensis*, *Chelidonium majus*, *Glycyrrhiza glabra*, *Allium sativa* (101), *Sempervivum tectorum* (41), *Gardenia sp.* (*Gardeniaceae*), *Scutellaria baicalensis* (*Lamiaceae*), *Sophora japonica* (*Fabaceae*), *Teucrium montanum* (*Lamiaceae*), *Scrophularia nodosa* (*Scrophulariaceae*), *Prunella vulgaris* (*Lamiaceae*), *Siberia* (*Chenopodiaceae*) (15, 79, 136, 157), *Terminalia catappa* (98), *Sho-saiko* (149), *Fumaria indica* (*Fumariaceae*) (134) a *Betula platyphylla* (104).

Záver

Štúdium patomechanizmov a stupňa účasti voľných kyslíkových radikálov uplatňujúcich sa pri vývoji alkoholových, toxických a vírusových hepatítid umožňuje efektívnejšie využitie preventívnych prostriedkov s antioxidantnou aktivitou. Antioxidantná farmakoterapia môže byť prostriedkom, ktorý svojimi mechanizmami môže pozitívne ovplyvniť následky poškodení pečene spôsobené hepatopatiami alebo toxickým poškodením pečene. Pri mnohých pečenejých chorobách je v súčasnosti často jedinou alternatívou liečby.*

Literatúra

1. Abel S., Gelderblom W.C.: *Toxicology*, 131, 1998, č. 2–3, s. 121–131.
2. Afanasiev I.B.: *Free radic. Biol. Med.*, 16, 1994, s. 7.
3. Afanasiev I.B. et al.: *FEBS Lett.*, 425, 1998, s. 256–258.
4. Akabane J. et al.: *Med. J. Shinshu Univ.*, 6, 1961, s. 13–18.
5. Aruoma O.I.: *Free Radic. Biol. Med.*, 20, 1996, č. 5, s. 675–705.
6. Bast A., Haenen G.R.M.: *Trends Biol. Sci.*, 9, 1984, s. 510–513.
7. Baer-Dubowska W. et al.: *Xenobiotica*, 28, 1998, č. 8, s. 735–743.
8. Beck M.A., Levander O.A.: *Annu. Rev. Nutr.*, 18, 1998, s. 93–116.
9. Beckman J.B. et al.: *Lipids*, 26, 1991, č. 2, s. 155–161.
10. Bjorneboe A., Bjorneboe G.E.: *Alcohol Alcohol* 28, 1993, č. 1, s. 111–116.
11. Blázovics A. et al.: *Free Radic. Res. Commun.*, 6, 1989, č. 4, s. 217–226.
12. Blázovics A. et al.: *Čes. Slov. Gastroent.*, 50, 1996, č. 3, s. 73–78.
13. Bondy S.C., Naderi S.: *Biochem. Pharmacol.*, 48, 1994, s. 155–159.
14. Bulger E.M., Helton W.S.: *Gastroenterol. Clin. North Amer.*, 27, 1998, č. 2, s. 403–419.
15. Buniatian N.D. et al.: *Eksp. Klin. Farmakol.*, 61, 1998, č. 5, s. 53–55.
16. Bonkowski H.L.: *Hepatology*, 26, 1997, Suppl. 1, s. 1435–1515.
17. Bort R. et al.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 288, 1999, č. 1, s. 65–72.
18. Bosch-Morell F. et al.: *Free Radic. Biol. Med.*, 25, 1998, č. 3, s. 365–368.
19. Brixová E. et al.: *Bratisl. lek. Listy*, 65, 1976, č. 6, s. 614–619.
20. Brixová E. et al.: *Bratisl. lek. Listy*, 67, 1977, s. 33–38.

21. **Brixová E.:** *Folia Facultatis Medicae*, Tom. XIX., 1981, fasc. 2. s. 9—90.
22. **Bustamante J. et al.:** *Free Radic. Biol. Med.*, 24, 1998, č. 6, s. 1023—1039.
23. **Cahill A. et al.:** *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 235, 1997, č. 2, s. 286—290.
24. **Calabrese V., Rizza V.:** *Neurochem. Res.*, 24, 1999, č. 1, s. 79—84.
25. **Carbonneau M.A. et al.:** *Clin. Chem.*, 37, 1991, s. 1423—1429.
26. **Cederbaum A.I.:** *Biofactors*, 8, 1998, č. 1—2, s. 93—96.
27. **Clavel J.P. et al.:** *Pathol. Biol. (Paris)*, 33, 1985, č. 1, s. 61—69.
28. **Comporti M.:** S. 65—79. In: Poli, G., Albano E., Dianzani M.U. (Eds): *Free Radicals: From Basic Science to Medicine*. Basel, Birkhauser Verlag 1993.
29. **de Mecca M.M. et al.:** *Arch. Toxicol.*, 67, 1993, č. 8, s. 547—551.
30. **Diez-Fernandez C. et al.:** *Brit. J. Pharmacol.*, 125, 1998, č. 1, s. 102—108.
31. **Ďuračková Z.:** *Voľné radikály a antioxidanty v medicíne*. Bratislava, SAP 1998.
32. **Dong W. et al.:** *Appl. Pharmacol.*, 151, 1998, č. 2, s. 359—366.
33. **Dzúrik R. et al.:** *Štandardná klinickobiochemická diagnostika*. Martin, Osveta 1996, 464 s.
34. **Esterbauer H. et al.:** *Free Radic. Biol. Med.*, 11, 1991, s. 81—128.
35. **Farbiszewski R. et al.:** *Drug Alcohol Depend* 27, 1991, 1, s. 69—72.
36. **Fataccioli V. et al.:** *Hepatology*, 29, 1999, č. 1, s. 14—20.
37. **Fehér J. et al.:** *Tokai J. Exp. Clin. Med.*, 1986, Suppl. 11, s. 121—134.
38. **Fehér J. et al.:** *Orv. Hetil.*, 130, 1989 a, č. 51, s. 2723—2727.
39. **Fehér J. et al.:** *Acta Physiol. Hung.*, 73, 1989 b, č. 2—3, s. 285—291.
40. **Fehér J. et al.:** *Acta Physiol. Hung.*, 80, 1992, č. 1—4, s. 351—361.
41. **Fehér J. et al.:** *Scand. J. Gastroenterol.*, 1998, Suppl. 228, s. 38—46.
42. **Fehér J. et al.:** *Acta Physiol. Hung.*, 64, 1984, s. 401—407.
43. **Ferenčík M. et al.:** *Forum Immunol.*, 2, 1994, č. 2, s. 128—135.
44. **Fernandez-Checa J.C. et al.:** *Semin. Liver Dis.*, 18, 1998, č. 4, s. 389—401.
45. **Freeman B.A., Crapo J.D.:** *Lab. Invest.*, 47, 1982, s. 412—426.
46. **Fuhr U. et al.:** *Biochem. Pharmacol.*, 43, 1992, s.225—235.
47. **Fuhr U.:** *Habilitationsschrift*. Frankfurt/Main, J.W. Goethe Universität, 1994, 113 s.
48. **Fuchs E.C. et al.:** *Arzneimittelforschung*, 47, 1997, č. 12, s. 1383—1387.
49. **Gergel D. et al.:** *Arch. biochem. Biophys.*, 337, 1997, č. 2, s. 239—250.
50. **Graier W.F. et al.:** *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 18, 1998, s. 1470—1479.
51. **Guengerich F.P. et al.:** *Scientist*, 81, 1993, s. 440—447.
52. **Guengerich F.P.:** *Drug Metab. Dispos.*, 26, 1998, č. 12, s. 1175—1178.
53. **Gurer H. et al.:** *Hum. Exp. Toxicol.*, 18, 1999, č. 1, s. 27—32.
54. **Görög P. et al.:** *J. Clin. Pathol.*, 44, 1991, s. 765—767.
55. **Haber F., Weiss J.:** *Proc. Roy. Soc. A*, 147, 1934, s. 332—351.
56. **Hagen T.M. et al.:** *FASEB J.*, 13, 1999, č. 2, s. 411—418.
57. **Halliwell B., Gutteridge J.M.C.:** *Human Toxicol.*, 7, 1988, s. 7—13.
58. **Halliwell B., Gutteridge J.M.C.:** *Free radical in biology and medicine*. Oxford, Clarendon Press 1989. 335s.
59. **Halliwell B.:** *Drugs*, 42, 1991, č. 4, s. 569—605.
60. **Hanták I.:** S. 257—279. In: Dzúrik R., Trnovec T. (Eds.): *Štandardné terapeutické postupy*. Martin, Osveta 1996.
61. **Harman A.W. et al.:** *Toxicol. Lett.*, 64—65, 1992, s. 581—587.
62. **Higueras V. et al.:** *Free Radic. Biol. Med.*, 15, 1994, s. 131—133.
63. **Higuchi H. et al.:** *Clin. Exp. Res.*, 20, 1996, č. 9, Suppl., s. 340A—346A.
64. **Holeček V., Racek J.:** *Klin. Biochem. Metab.*, 2, 1993, č. 3, s. 137—141.
65. **Holomáň J. et al.:** *Čs. Gastroenterol.*, 38, 1984, č. 5, s. 251—257.
66. **Holomáň J. et al.:** *Bratisl. lek. Listy*, 83, 1985, č. 1, s. 26—34.
67. **Holomáň J., Glasa J.:** *Med. Monitor*, 1, 1995, s. 30—32.
68. **Holomáň J. et al.:** *Bratisl. lek. Listy* 99, 1998, č. 2, s. 75—81.
69. **Houglum K. et al.:** *Gastroenterology*, 113, 1997, č. 4, s. 1069—1073.
70. **Chwiecko M. et al.:** *Drug Alcohol Depend.*, 33, 1993, č. 1, s. 87—93.
71. **Ichinose T. et al.:** *Lipids*, 24, 1989, 10, s. 895—898.
72. **Ip S.P., Ko K.M.:** *Biochem. Pharmacol.*, 52, 1996, č. 11, s. 1687—1693.
73. **Ishii H. et al.:** *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 12, 1997, č. 9—10, s. S272—S282.
74. **Jakuš V. et al.:** *Bratisl. lek. Listy*, 99, 1998, s. 368—375.
75. **Jones E.A., Berk P.D.:** *Lancet II*, 8186, 1980, s. 121—123.
76. **Karbowski M. et al.:** *Free radic. Biol. Med.*, 26, 1999, č. 3—4, s. 396—409.
77. **Kollár J.:** *Ateroskleróza*, 1, 1997, č. 1, s. 40—47.
78. **Kollár J.:** *Ateroskleróza*, 1, 1997, č. 2, s. 23—26.
79. **Konoplia E.N., Prokopenko L.G.:** *Antibiot. Khimioter*, 42, 1997, č. 7, s. 12—15.
80. **Korda M. M.:** *Ukr. Biokhim. Zh.*, 70, 1998, č. 1, s. 63—68.
81. **Kroger H. et al.:** *Gen. pharmacol.*, 28, 1997, č. 2, s. 257—263.
82. **Kupčová V. et al.:** *Bratisl. lek. Listy*, 83, 1985, č. 1, s. 35—40.
83. **Kupčová V.:** *Bratisl. lek. Listy*, 100, 1999, č. 1, s. 49—53.
84. **Kurose I. et al.:** *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 20, 1996, č. 1, suppl., s. 77A—85A.
85. **Lang I. et al.:** *Ital. J. Gastroenterol.*, 22, 1990a, č. 5, s. 283—287.
86. **Lang I. et al.:** *Tokai J. Exp. Clin. Med.*, 15, 1990b, č. 2—3, s. 123—127.
87. **Lang I. et al.:** *Biotechnol. Ther.* 4, 1993, č. 3—4, s. 263—270.
88. **Larrea E. et al.:** *Free Radic. Biol. Med.*, 24, 1998, č. 7—8, s. 1235—1241.
89. **Laut W.W., Macedo M.P.:** *Drug Metab. Rev.* 29, 1997, č. 1—2, s. 369—395.
90. **Li Q.J. et al.:** *Biochem. Pharmacol.*, 48, 1994, č. 8, s. 1631—1640.
91. **Lieber C.S. et al.:** *Gastroenterology*, 106, 1994, s. 152—159.
92. **Lieber C.S.:** *Adv. Pharmacol.*, 38, 1997a, s. 601—628.
93. **Lieber C.S.:** *Progr. Hepato-Pharmacol.*, 2, 1997b, s. 81—92.
94. **Lieber C.S.:** *Dig. Dis.*, 15, 1997c, č. 1, s. 42—66.
95. **Lieber C.S.:** *J. Stud. Alcohol*, 59, 1998, č. 1, s. 9—25.
96. **Lieber C.S., Leo M.A.:** *Rec. Dev. Alcohol*, 14, 1998, s. 7—40.
97. **Lin C.C. et al.:** *J. Pharm. Pharmacol.*, 50, 1998, č. 7, s. 789—794.
98. **Lin C.C. et al.:** *Amer. J. Chin. Med.*, 25, 1997, č. 2, s. 153—161.
99. **Liu S.L. et al.:** *Hepatology* 22, 1995, č. 5, s. 1474—1481.
100. **Lloyd R.V. et al.:** *Free Radic. Biol. Med.*, 22, 1997, č. 5, s. 885—888.
101. **Luper S.:** *Altern. Med. Rev.*, 3, 1998, č. 6, s. 410—421.
102. **Mascio P. et al.:** *Amer. J. Clin. Nutr.*, 53, 1991, s. 194S—200S.
103. **Mason A.L. et al.:** *Hepatology*, 29, 1999, č. 2, s. 328—333.
104. **Matsuda H. et al.:** *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 8, 1998, č. 21, s. 2939—2944.
105. **Mak D.H., Ko K.M.:** *Mol. Cell. Biochem.*, 175, 1997, č. 1, s. 225—232.
106. **Maly P.I., Sasse D.:** *Gastroenterology*, 101, 1991, s. 1716—1723.
107. **Meguro H. et al.:** S. 157—161. In: Packer L., Glazer A.N. (Eds.): *Oxygen Radicals in Biological systems-methods in Enzymology*. Academic Press 1990, s. 157—161.
108. **Meydani M. et al.:** *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 854, 1998, s. 352—360.
109. **Miguet J.Ph., Hrušovský Š.:** *Bratisl. lek. Listy*, 96, 1995, č. 9, s. 487—492.

110. **Mutlu-Turkoglu U. et al.:** *Re. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.*, 96, 1997, č. 3, s. 357—361.
111. **Nevoral J. et al.:** *Onemocnění jater v dětském věku.* Praha, Scientia Medica 1994.
112. **Nordmann R., Rouach H.:** *Bull. Acad. Natl. Med.*, 179, 1995, č. 9, s. 1839—1850 discussion 1850—1853.
113. **Nordmann R.:** *Alcohol* 29, 1994, č. 5, s. 513—522.
114. **Oh S.I. et al.:** *J. Nutr.*, 128, 1998, č. 4, s. 758—763.
115. **Ohhira M. et al.:** *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 22, 1998, Suppl.3, s. 145S—149S.
116. **Oleínik A.N.:** *Farmakol. Toksikol.* 46, 1983, č. 3, s. 102—105.
117. **Packer L. et al.:** *Free Radic. Biol. Med.*, 19, 1995, č. 2, s. 227—250.
118. **Pak S.G., Nikitin E.V.:** *Klin. Med. (Mosk)*, 69, 1991, č. 9, s. 54—57.
119. **Pamplona R. et al.:** *Life Sci.*, 57, 1995, č. 9, s. 873—879.
120. **Pár A., Jávör T.:** *Acta Physiol. Hung.*, 64, 1984, č. 3—4, s. 409—423.
121. **Pares A. et al.:** *J. Hepatol.*, 28, 1998, č. 4, s. 615—621.
122. **Parola M. et al.:** S. 274—286. In: Poli G. et al. (Eds.): *Free radicals: From basic Science to medicine.* Basel, Birkhauser Verlag 1993.
123. **Paterni L.:** *Folia Medica (Napoli)*, 40, 1957, s. 665—671.
124. **Perasidin N.A. et al.:** *Lik. Sprava*, 1995, č. 1—2, s. 76—79.
125. **Peters T.J., Preedy V.R.:** *Novartis Found Symp.*, 216, 1998, s. 19—24; discussion 24—34.
126. **Peterhans E.:** *J. Nutr.*, 127, 1997 a, č. 5, Suppl. 5, s. 962S—965S.
127. **Peterhans E.:** *Biol. Trace Elem.*, 56, 1997 b, č. 1, s. 107—116.
128. **Poli G. et al.:** *Chem. Phys. Lipids*, 45, 1987, č. 2—4, s. 117—142.
129. **Porta E.A.:** *J. Nutr.*, 127, 1997, Suppl. 5, s. 912S—915S.
130. **Pratico D. et al.:** *J. Investig. Med.*, 46, 1998, č. 2, s. 51—57.
131. **Pryor W.A.:** *Ann. Rev. Physiol.*, 48, 1986, s. 657—667.
132. **Racek J., Holeček V.:** *Čes. Slov. Gastroent.*, 52, 1998, č. 1, s. 14—17.
133. **Rácz O. et al.:** *Glykoheoglobín, glykácia bielkovín a diabetes.* Martin, Osveta 1989, 243 s.
134. **Rao K.S., Mishra S.H.:** *J. Ethnopharmacol.*, 60, 1998, č. 3, s. 207—213.
135. **Reinheckel T. et al.:** *Free radic. Res.*, 29, 1998, č. 4, s. 297—305.
136. **Rice-Evans C.A. et al.:** *Free. Radic. Biol. Med.*, 20, 1996, č. 7, s. 933—956.
137. **Romero J.F. et al.:** *Environ. Health Perspect.*, 106, 1998 a, Suppl. 5, s. 1229—1234.
138. **Romero M.J. et al.:** *Free Radic. Biol. Med.*, 25, 1998b, č. 9, s. 993—997.
139. **Rosenberg H.R., Culik R.:** *Arch. Biochem. Biophys.*, 80, 1959, s. 86—93.
140. **Sadrzadeh S.M., Nanji A.A.:** *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 284, 1998, č. 1, s. 406—412.
141. **Sai K. et al.:** *Food Chem. Toxicol.*, 36, 1998, č. 12, s. 1043—1051.
142. **Saliou C. et al.:** *FEBS Lett.*, 440, 1998, s. 8—12.
143. **Scott G.:** *Albion Chemical Science Series*, 1997.
144. **Sedlák J., Kaščák M.:** S. 174—187. In: *Dzúrik R., Trnovec T. (Eds.): Štandardné diagnostické postupy.* Martin, Osveta 1996.
145. **Shaikh Z.A. et al.:** *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 154, 1999, č. 3, s. 256—263.
146. **Shedlofsky S.I.:** *Hepatogastroenterology*, 45, 1998, č. 20, s. 349—355.
147. **Schepetkin I.A.:** *Biochemistry (Mosc)* 64, 1999, č. 1, s. 25—32.
148. **Schwarz K.B.:** *Biol. Med.*, 21, 1996, č. 5, s. 641—649.
149. **Shimizu I. et al.:** *Hepatology*, 29, 1999, č. 1, s. 149—160.
150. **Siems W.G. et al.:** *J. Lipid Res.*, 38, 1997, č. 3, s. 612—622.
151. **Sies H. (Ed.):** *Oxidative stress: from basic research to clinical application.* London, Academia Press 1991 a, 619 s.
152. **Sies H.:** *Amer. J. Med.*, 1991 b, Suppl. 3C, s. 31S—37S.
153. **Slater T.F.:** *Biochem. J.*, 222, 1984, s. 1—15.
154. **Sokol R.J.:** *Semin. Liver Dis.*, 16, 1996, s. 39—46.
155. **Situnayake R.D. et al.:** *Gut*, 31, 1990, č. 11, s. 1311—1317.
156. **Sokol R.J., Hoffenberg E.J.:** *Pediatr. Clin. North Amer.*, 43, 1996, č. 2, s. 471—488.
157. **Spilková J., Dušek J.:** *Čes. a Slov. Farm.*, 45, 1996, č. 6, s. 296—301.
158. **Stocker R., Frei B.:** S. 213-244. In: *Sies H. (Ed.): Oxidative stress: Oxidants and antioxidants.* London, Academia Press 1991.
159. **Stohs S.J.:** *J. basic Clin. Physiol. Pharmacol.*, 6, 1995, č. 3—4, s. 205—228.
160. **Stohs S.J., Bagchi D.:** *Free Radic. Biol. Med.*, 18, 1995, č. 2, s. 321—336.
161. **Stoyanovsky D.A., Cederbaum A.I.:** *Biochemistry*, 35, s. 15839—15845.
162. **Střítecký J., Horák J.:** *Prakt. Lékař*, 78, 1998, č. 10, s. 50—55.
163. **Squadritto G.L., Pryor W.A.:** *Free Radic. Biol. Med.*, 25, 1998, č. 4—5, s. 392—403.
164. **Subirade I. et al.:** *Experientia*, 52, 1996, s. 687—690.
165. **Sumioka I. et al.:** *Jap. J. Pharmacol.*, 78, 1998, č. 2, s. 199—207.
166. **Suematsu T. et al.:** *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 5, 1981, s. 427—430.
167. **Suematsu T. et al.:** *Clin. Chim. Acta*, 79, s. 267—270, 1977.
168. **Szántová M. et al.:** *Lek. Obzor*, 45, 1996, s. 11—14.
169. **Szántová M. et al.:** *Bratisl. lek. Listy*, 98, 1997, č. 12, s. 12—16.
170. **Szántová M., Kupčová V.:** *Bratisl. lek. Listy*, 100, 1999, č. 1, s. 28—35.
171. **Takahashi T. et al.:** *Biol. Pharm. Bull.*, 19, 1996, č. 8, s. 1005—1012.
172. **Thome J. et al.:** *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 21, 1997, č. 1, s. 82—85.
173. **Treem W.R., Sokol R.J.:** *Liver Dis.*, 18, 1998, č. 3, s. 237—253.
174. **Tsukamoto H.:** *Alcohol*, 10, 1993, č. 6, s. 465—467.
175. **Turecký L. et al.:** *Bratisl. lek. Listy*, 97, 1996, č. 10, s. 625—628.
176. **Uchida K. et al.:** *J. Biol. Chem.* 274, 1999, č. 4, s. 2234—2242.
177. **Uličná O., Brixová E.:** *Čs. Gastroent.*, 34, 1980, č. 4, s. 227—233.
178. **Uličná O., Brixová E.:** *Biochem. Clin. bohemoslov.*, 10, 1981, č. 2, s. 111—115.
179. **Uličná O., Brixová E.:** *Vnitřní Lék.*, 31, 1985a, č. 1, s. 15—19.
180. **Uličná O., Brixová E.:** *Biochem. Clin. Bohemoslov.*, 14, 1985b, č. 1, s. 27—34.
181. **Uličná O., Brixová E.:** *Biochem. Clin. bohemoslov.*, 15, 1986, č. 3, s. 219—224.
182. **Uličná O. et al.:** *Čs. Gastroenterol. Výž.*, 42, 1988 a, č. 7, s. 445—451.
183. **Uličná O. et al.:** *Bratisl. lek. Listy*, 89, 1988 b, č. 9, s. 678—682.
184. **Uličná O. et al.:** *Biochem. Clin. Bohemoslov.*, 18, 1989, č. 4, s. 313—322.
185. **Uličná O. et al.:** *Bratisl. lek. Listy*, 95, 1994, č. 4, s. 402—407.
186. **Vaidya A.B. et al.:** *J. Postgrad. Med.*, 42, 1996, č. 4, s. 105—108.
187. **Vancini B.:** *Arch. Ital. Mal. Appar. Dig.*, 25, 1959, 352.
188. **Varga M.:** *Drug Alcohol Depend.*, 27, 1991, č. 2, s. 117—119.
189. **Venditti P. et al.:** *Cell. Physiol. Biochem.*, 8, 1998, č. 6, s. 328—338.
190. **Vladimirov I.A.:** *Vestn. Ross. Akad. Med. Nauk*, 7, 1998, s. 43—51.

191. **Volmut J., Uličná O.:** *Biochem. clin. bohemoslov.*, 9, 1980, č. 4, s. 235—241.
192. **von Herbay A. et al.:** *Free Radic Res.*, 27, 1997, č. 6, s. 599—605.
193. **Walubo A. et al.:** *Find. Exp. Clin. Pharmacol.*, 20, 1998, č. 8, s. 649—655.
194. **Weiss L. et al.:** *Antiviral. Res.*, 32, 1996, č. 1, s. 43—53.
195. **Wenzel G. et al.:** *Z. ges. Inn. Med.* 48, 1993, č. 10, s. 490—496.
196. **Wink D.A., Mitchell J.B.:** *Free Radic. Biol. Med.*, 25, 1998, č. 4—5, s. 434—456.
197. **Wirtschafter Z.T., Smith F.W.:** *J. Lab. Clin. Med.*, 60, 1962, s. 649—654.
198. **Lang I. et al.:** *Biotechnol. Ther.*, 4, 1993, č. 3—4, s. 263—270.
199. **Yagi K.:** S. 223—242. In: *Lipid Peroxides in Biology and Medicine*, London, Academic Press 1982.
200. **Yamamoto Y. et al.:** S. 371—380. In: *Packer L., Glazer A.N. (Eds.): Oxygen radicals in Biological Systems — Methods in Enzymology*. Academic Press 1990.
201. **Yamamoto Y. et al.:** *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 247, 1998, č. 1, s. 166—170.
202. **Younes M., Strubelt O.:** *Toxicol.*, 66, 1991, s. 63—74.
203. **Youssef S. et al.:** *Cell. Mol. Biol.(Noisy—le-Grand)*, 44, 1998, č. 7, s. 1095—1100.
204. **Quaife C.J. et al.:** *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 155, 1999, č. 2, s. 107—116.
205. **Zajacová O., Brixová E.:** *Bratisl. lek. Listy*, 62, 1974, č. 6, s. 753—759.
206. **Zajacová O., Brixová E.:** *Bratisl. lek. Listy*, 67, 1977, č. 6, s. 714—719.
207. **Zar H.A. et al.:** *Free Radic. Biol. Med.*, 25, 1998, č. 3, s. 255—264.
208. **Zhao M. et al.:** *Histol. Histopathol.*, 11, 1996, č. 4, s. 899—907.
209. **Zima T. et al.:** *Physiol. Res.*, 47, 1998, s. 351—355.
210. **Zima T.:** *Remedia*, 7, 1997, č. 5, s. 298—307.
211. **Zima T. et al.:** *Čas. Lék. čes.*, 134, 1995, č. 10, s. 291—295.
212. **Zima T. et al.:** *Remedia*, 6, 1996, č. 1, s. 35—58.
213. **Zimmermann H.J., Maddrey W.C.:** S. 707—783. In: *Schiff L., Schiff E.R. (Eds.): Diseases of the liver*. Philadelphia, J.B. Lipincott Co. 1993, 1517 s.
214. **Železná J.:** *Remedia*, 7, 1997, č. 4, s. 224—225.

Received April 4, 1999.

Accepted September 10, 1999.