

*PREHLADNÝ REFERÁT***KYSLÍKOVÉ RADIKÁLY, OXID DUSNATÝ A ANTIOXIDAČNÝ SYSTÉM V KLBOCH POSTIHNUTÝCH ZÁPALOM**

O. GREGUŠKA

OXYGEN RADICALS, NITRIC OXIDE AND ANTI-OXIDATION SYSTEM IN INFLAMMATION-AFFECTED JOINTSVýskumný ústav reumatických chorôb, Piešťany
Riaditeľ: prof. MUDr. J. Rovenský, DrSc.**Súhrn**

Reaktívne produkty kyslíka vznikajú nielen počas základných fyziologických, ale hlavne počas patofyziologických metabolických pochodov. Nezanedbateľná je ich tvorba počas zápalových reakcií pri reumatoidnej artritíde. PMN-leukocyty a makrofágy počas fagocytózy sú významný zdroj superoxidu.

Aj keď je superoxidový anión oxidačným a redukčným činidlom, nemá priame mikrobiálne vlastnosti, ale je skôr spúšťačom tvorby reaktívnych produktov kyslíka, ako sú peroxid vodíka, hydroxylový radikál a singletový kyslík. Oxid dusnatý syntetizuje NO syntáza, enzým, ktorý sa v bunkách nachádza v troch odlišných izoformách. Ako konštitutívna endotelová cNOS a neuronová cNOS alebo indukčtivná iNOS najmä v makrofágoch. NOS rozkladá L-arginín za vzniku volnoradikálovej formy NO a L- citrulinu. Vyššie koncentrácie NO majú antimikrobiálny, protinádorový a cytotoxický účinok, v nižších koncentráciách má stimulačný účinok na guanylátacyklázu. Okrem toho sa zúčastňuje aj na viacerých patologických mechanizmoch (septické stavy, artritídy, niektoré autoimunitné choroby, vaskulitídy a ďalšie).

Ochranné mechanizmy proti škodlivým účinkom reaktívnych produktov kyslíka sa vyskytujú na rôznych úrovniach. Po objavení superoxid-dismutázy a objasnení jej funkcie pri dismutácii superoxidového aniónu odkryli sa nové možnosti štúdií zamerané na tvorbu a odstránenie reaktívnych produktov kyslíka v biologických systémoch. Živé organizmy si vyvinuli viaceré antioxidačné obranné systémy. Popri spomenutej superoxid-dismutáze, ktorá na aktívnom mieste obsahuje meď a zinok (CuZn SOD) alebo mangán (MnSOD), veľmi významným enzýmom pri odstraňovaní peroxidu vodíka je kataláza a hlavne peroxidáza využívajúca oxidačno-redukčný systém glutatiónu. Nezanedbateľnú úlohu majú v obranných mechanizmoch niektoré vitamíny a to rozpustné vo vode (vitamin C), ako aj v tukoch (vitamin E).

Porucha rovnováhy medzi systémom produkujúcim a odstraňujúcim superoxid a ďalšie reaktívne produkty vyústi vždy do patofyziologických následkov. Oxidačný stres, ako sa táto porucha označuje, má pri rozvoji patofyziologických pochodov kľúčovú úlohu. Pri reumatických

Summary

Reactive products of oxygen originate not only in basic physiological processes, but primarily in pathophysiological metabolic ones. They also arise during the course of inflammatory reactions in rheumatoid arthritis. During phagocytosis, PMN leukocytes and macrophages are a significant source of superoxide. The superoxide anion, even though it is a redox agent, has no direct microbial properties. It acts more as a trigger for the creation of reactive oxygen products, such as hydrogen peroxide, the hydroxyl radical and singlet oxygen. Nitric oxide is synthesized by NO synthase, an enzyme which is found in cells in three different isoforms: constitutive endothelium cNOS, constitutive neuron cNOS (or especially in macrophages) and inducible iNOS. NOS breaks down L-arginin and thus the free-radical form of NO and L-citrulin are produced. Higher concentrations of NO have an antimicrobial, antitumour and cytotoxic effect and, in lower concentrations it has a stimulating effect on guanylate cyclase. In addition, it participates in several pathological mechanisms (septic conditions, arthritis, some autoimmune diseases, vasculitis, etc.).

Protective mechanisms against the harmful effects of the reactive products of oxygen can be found at several levels. After the superoxide dismutase had been discovered and its function in the dismutation of the superoxide anion revealed, new possibilities for studying both the creation and removal of the reactive products of oxygen in biological systems appeared. Living organisms have developed several antioxidant defence systems. Besides the above mentioned superoxide dismutase which contains copper and zinc at its active site (CuZnSOD) or manganese (MnSOD), a very important enzyme for the removal of hydrogen peroxide is catalase and especially peroxidase, utilising the redox system of glutathione. Also, an important task in defence mechanisms lies with some vitamins, water soluble ones (vitamin C) as well as fat-soluble ones (vitamin E).

Any imbalance between the systems producing and disposing of superoxide and other reactive products always results in a pathophysiological outcome. Oxidation stress, as this disorder is called, has a key

chorobách sa počas oxidačného stresu, pri zápalových reakciách na kĺbe, iniciujú pochody, pri ktorých dochádza k poškodzovaniu štruktúr synoviálneho kĺbu už na úrovni makromolekúl (kyselina hyalurónová, proteoglykány, kolagén).

Kľúčové slová: reaktívne formy kyslíka, oxid dusnatý, prechodné kovy, enzýmy odstraňujúce voľné radikály, vitamíny, antioxidanty, oxidačný stres pri reumatických chorobách.

role in the development of pathophysiological processes. In rheumatic diseases, during oxidation stress and in the course of inflammatory reactions in the joint, processes in which the structures of synovial joint are damaged down to the macromolecule level are initiated.

Key words: reactive species of oxygen, nitric oxide, transition metals, enzymes detoxicating free radicals, vitamin-antioxidants, oxidation stress in rheumatic diseases.

REAKTÍVNE FORMY KYSLÍKA

Kyslík je esenciálny prvok pre aeróbné organizmy, je terminálnym akceptorom elektrónov počas respirácie, ktorá je hlavným zdrojom energetických substrátov, vytvára chemické formy molekúl radikálového typu, ktoré sú veľmi reaktívne, nestabilné, s veľmi krátkym polčasom života, a tým aj s nízkou rovnovážnou koncentráciou. Prehľad o reaktívnych formách kyslíka, ktoré sa vytvárajú v biologických systémoch, je v tabuľke 1.

Chemická reaktívnosť radikálov kyslíka je rôzna. Najreaktívnejší je hydroxylový radikál (OH \cdot), ktorý veľmi rýchlo reaguje s väčšinou molekúl in vivo. Ak sa OH \cdot vytvorí, je veľmi škodlivý na mieste vzniku, a nemigruje mimo bunku.

Ďalšie (menej reaktívne) voľné radikály sa vytvárajú in vivo. Oxid dusnatý, ktorý sa syntetizuje z L-arginínu skupinou enzýmov nazývaných syntázy oxidu dusnatého vo viacerých typoch buniek vrátane chondrocytov. Významným zdrojom oxidu dusnatého sú makrofágy, ktoré produkujú NO za katalýzy inductívnej NO syntázy (iNO syntáza). Tvorba NO sa dokázala aj v neutrofiloch. Dusíkaté reaktívne medziprodukty majú významný antibakteriálny, predovšetkým však antiparazitový účinok.

Po internalizácii mikroorganizmov do fagocytov a vytvorení fagocytov vakuoly sa mikroorganizmy inaktivujú a vnútri buniek sa degradujú. Superoxidový anión, ktorý vzniká po aktivácii redukovaného NADPH-oxidázového systému na membráne bunky, nemá priame mikrobicídne vlastnosti, ale je skôr spúšťačom tvorby reaktívnych produktov kyslíka. Zo superoxidu sa následne vytvárajú ďalšie reaktívne produkty kyslíka: H $_2$ O $_2$ a OH \cdot . Tieto produkty pôsobia samostatne alebo spolu s ďalšími granulárnymi enzýmami fagocytov, myeloperoxidázou (MPO) a laktoferrínom. MPO je tetramér, ktorý spolu s H $_2$ O $_2$ a chloridovými iónmi tvorí kyselinu chlórnu (HClO) a monochlóramíny, ktoré sú hlavným mikrobicídny systémom v PMN a monocytoch.

Makrofágy, monocyty periférnej krvi, neutrofily a lymfocyty po aktivácii produkujú reaktívne medziprodukty kyslíka, ako aj reaktívne medziprodukty dusíka v rôznom množstve. Pri zápale sa postihnuté tkanivo infiltruje fagocytmi a z postihnutého tkaniva sa vyplavia ióny železa a medi z hemových proteínov, ako aj z ich normálnych intracelulárnych skladovacích miest. Tým sa preruší transport elek-

trónov v mitochondriách a v endoplazmovom retikule, čo vedie k úniku elektrónov na kyslík za tvorby superoxidového aniónu.

ZDROJE REAKTÍVNYCH FORIEM KYSLÍKA PRI REUMATOIDNEJ ARTRITÍDE

Najčastejšie diskutovaným zdrojom reaktívnych foriem kyslíka sú aktivované fagocyty. Aktivované neutrofily uvoľňujú superoxidový anión, peroxid vodíka, elastázu, kyselinu chlórnu. Agregáty IgG v synoviálnej tekutine môžu aktivovať neutrofily (15). Kyselina chlórna a superoxidový anión reagujú s askorbátom, čo pomáha vysvetliť nízke hladiny askorbátu v telových tekutinách pri reumatoidnej artritíde (16). Kyselina chlórna inaktivuje alfa $_1$ -antiproteinázu (inhibitor elastázy a podobne), a tým znižuje hladinu aktívnej alfa $_1$ -antiproteinázy, čo sa pozorovalo pri reumatoidnej artritíde (17). Kyselina chlórna fragmentuje kolagén (18). Pannus obsahuje viaceré bunky podobné makrofágom, ktoré pravdepodobne sekretujú superoxidový anión, peroxid vodíka a s veľkou pravdepodobnosťou aj oxidy dusíka (19).

V posledných rokoch sa v literatúre obhajuje hypotéza, podľa ktorej podliehajú reumatoidné kĺby postihnuté zápalom pri pohybe a následnom pokojovom stave hypoxicko-reperfuzyvným cyklom, ktoré môžu vyústiť do tvorby voľných radikálov niektorými zo známych mechanizmov (20). Jeden z týchto mechanizmov katalyzuje xantinoxidáza (21, 22).

Záujem o voľné radikály kyslíka pri reumatoidnej artritíde sa začal, keď McCord v pôvodnej práci upozornil na zníženie viskozity synoviálnej tekutiny u pacientov s reumatoidnou artritídou a porovnal podobný efekt, ktorý pozoroval na roztokoch kyseliny hyalurónovej in vitro, na ktoré pôsobil systémom vytvárajúcim superoxidový radikál (1). Neskôr sa zistilo, že depolymerizáciu kyseliny hyalurónovej v skutočnosti spôsobil hydroxylový radikál, ktorý sa vytvoril v systéme in vitro, následne reakciou superoxidového aniónu a peroxidu vodíka a katalytickým účinkom železa (2). Hydroxylový radikál spôsobí nepravidelnú fragmentáciu hyalurónanu (3), zníži sa molekulová hmotnosť hyalurónanu, čo znižuje viskozitu jeho roztokov. Vznik hydroxylových radikálov in vivo, v RA kĺboch, sa pripisuje katalytickému účinku iónov kovov. Katalytické ióny medi sa nedokázali v čerstvej synoviálnej tekutine (4), ale kata-

Tab. 1. Voľné radikály v biologických systémoch.

Názov	Vzorec	Opis
Vodíkový atóm	H·	Najjednoduchší známy voľný radikál
Superoxid	O ₂ ·	Na kyslíku centrovany radikál Reaguje rýchlo len s niekoľko málo početnými molekulami (napr. oxid dusnatý), ale všeobecne málo reaktívny
Hydroxylový radikál	OH·	Na kyslíku centrovany radikál Najreaktívnejší kyslíkový radikál, ktorý je známy. Keď sa vytvorí in vivo, reaguje na mieste vzniku
Peroxid vodíka	H ₂ O ₂	Redukovaný stav kyslíka, vytvorí sa dismutáciou zo superoxidu
Tiolový radikál	RS·	Všeobecný názov pre skupinu radikálov s nespárenými elektrónmi centrovanými na síre. Reaktivita sa mení; často reaguje s kyslíkom a poskytuje škodlivé radikály síry
Peroxy, alkoxy	RO ₂ ·, RO·	Na kyslíku centrované radikály, ktoré sa vytvárajú pri rozklade organických peroxidov
Oxidy dusíka	NO·, NO ₂ ·	Oba sú voľné radikály. NO· sa vytvára in vivo z aminokyseliny L-arginínu za katalýzy enzýmom NO syntáza. NO ₂ · sa vytvorí ak NO reaguje so superoxidom. Nachádza sa vo vzduchu a v dyme z horiacich organických materiálov, ako aj v cigaretovom dyme
Trichlormetyl	CCl ₃ ·	Na uhlíku centrovany radikál (nespárený elektrón uložený na uhlíku). Vytvára sa počas metabolizmu tetrachloridu uhličitého v pečeni a prispieva k toxickým efektom tohto rozpúšťadla

lytické ióny železa sa namerali bleomycínovým testom približne v 40 % synoviálnych tekutín aspirovaných zo zápalom postihnutých kolenných kĺbov u pacientov s reumatoidnou artritídou (5). Železo v ionizovanej forme, ako sa dokázalo, priamo stimulovalo peroxidáciu lipidov v systéme s peroxidom vodíka a superoxidovým aniónom (6). Aspirované synoviálne tekutiny od niektorých RA pacientov po vložení do roztoku fenylalanínu produkovali hydroxylačné produkty charakteristické pre produkty, ktoré vzniknú účinkom hydroxylového radikálu na aromatický kruh (7), čo naznačuje, že zložky synoviálnej tekutiny sa zúčastňujú na tvorbe hydroxylového radikálu.

Železo v ionizovanej forme sa môže vyskytnúť po jeho vyplavení z odumretých buniek, a to po degradácii hemoglobínu pôsobením peroxidu vodíka (napr. hemoglobín sa vyplavil z erytrocytov po traumatickom mikrokrvácaní do kĺbu) (8, 9). Dokázalo sa vyplavenie železa z feritínových depozitov v synoviálnej membráne po ich vystavení účinku superoxidového aniónu špeciálne pri kyslom pH (10).

Chemický obraz poškodenia hyalurónanu v synoviálnych kĺboch pri reumatoidnej artritíde je zhodný s obrazom, ktorý sa pozoroval po účinku hydroxylového radikálu in vitro, hoci pri reumatoidnej artritíde hyalurónan sa môže vylučovať aj vo forme krátkych refazcov (11), čo by naznačovalo už poruchy na úrovni syntézy vysokomolekulovej kyseliny hyalurónovej fibroblastmi synoviálneho tkaniva. Poškodený hyalurónan sa dokázal nukleárnou magnetickou rezonanciou (3).

Vzájomné reakcie reaktívnych medziproduktov kyslíka a dusíka významne ovplyvňujú hladiny jednotlivých produktov v postihnutom tkanive alebo v bunkách. Reakcia superoxidového aniónu s oxidom dusnatým je ďalší potenciálny zdroj hydroxylového radikálu, keďže produkcia superoxidového aniónu, ako aj oxidu dusnatého (12) sa zdá zvýšená u pacientov s reumatoidnou artritídou. Dôkaz prítomnosti nitrotyrozínov u pacientov s aktívnou reumatoidnou artritídou (13) je v súlade so vznikom peroxidusitanov in vivo.

Ďalší zdroj hydroxylových radikálov je reakcia superoxidového aniónu a kyseliny chlórnej (14) za katalýzy myeloperoxidázy, pričom oba intermediáty sú produkované aktivovanými fagocytmi.

VOLNÉ RADIKÁLY ODVODENÉ OD NIEKTORÝCH LIEKOV

Niektoré protizápalové lieky môžu pohlcovať reaktívne formy kyslíka in vivo, ale táto schopnosť nie je všeobecná (23). Vo viacerých prípadoch opak môže byť pravdou; niektoré liekové formy využívané pri liečbe reumatoidnej artritídy in vivo môžu konvertovať na voľné radikály. Potlačia sa niektoré znaky reumatoidnej artritídy, ktoré sa potencujú oxidačným poškodením. Radikálové formy odvodené od penicilamínu, fenylbutazónu, od niektorých foriem kyseliny fenamovej, ako aj aminosalicylátové zložky sulfasalazínu, inaktivujú alfa₁-antiproteinázu, znižujú hladinu kyseliny askorbovej a urýchľujú peroxidáciu lipidov (23, 24, 25).

ANTIOXIDAČNÉ OCHRANNÉ SYSTÉMY

Látky, ktoré neutralizujú potenciál účinku voľných radikálov, sa všeobecne zokupujú do tzv. antioxidačných ochranných systémov. Ako ukazuje tabuľka 2, systémy zahŕňajú viaceré látky (27, 28), ktoré sa označujú ako antioxidanty, odstraňovače voľných radikálov, prerušovače refazových reakcií alebo reduktanty.

Antioxidačné systémy zodpovedné za ochranu buniek proti oxidačnému stresu sa rozlišujú podľa samých voľných radikálov. Na dosiahnutie maximálnej ochrany obsahujú bunky rôzne látky schopné odstraňovať rôznorodé formy voľ-

Tab. 2. Najvýznamnejšie antioxidanty a látky odstraňujúce voľné radikály.

System	Štruktúra	Účinok
Enzymový Superoxiddismutázy	Cu/Zn SOD	Katalýza dismutácie O_2^- na H_2O_2
Kataláza	Mn SOD Cu SOD Tetramérový hemoproteín	Katalýza dismutácie H_2O_2 na H_2O redukuje metyl- a etyl-hydro- peroxydy
Oxidačno-redukčný systém glutatiónu GSH peroxidáza	Selénoproteín	Katalyzuje redukciiu H_2O_2 a ďalších hydro- peroxydov (peroxydy lipidov, lipoxygená- zové produkty)
GSSG reduktáza	Dimérový proteín	Katalyzuje redukciiu disulfidov s nízkou molekulovou hmotnosťou
<i>Látky rozpustné v tukoch</i>		
Vitamín E	Alfatokoferol	Konvertuje O_2^- a OH^- a radikály peroxyli- pidov na menej reak- tívne formy. Preruše- nie retazovej reakcie peroxidácie lipidov
Betakarotén	Metabolický prekurzor vitamínu A	Odstraňuje O_2^- , rea- guje priamo s peroxy- lovými radikálmi
Bilirubín	Produkt metabolizmu hemoproteínov	Antioxidant prerušujúci retazec peroxidácie lipidov. Reaguje s ROO^-
<i>Látky rozpustné vo vode</i>		
Vitamín C	Kyselina askorbová	Priamo odstraňuje O_2^- a OH^- , neutra- lizuje oxidanty zo stimulovaných neutro- filov. Prispieva k regulácii vitamínu E
Kyselina močová	Oxidovaná purínová zásada	Odstraňuje O_2^- a OH^- , oxiduje peroxylové radikály. Zabraňuje oxidácii vitamínu C.
Glukóza Cystein	Sacharid Aminokyselina	Viaže prechodné kovy Odstraňuje, pohlcuje OH^- Redukuje rôzne orga- nické látky dodávaním elektrónu zo sulfhyd- rylových skupín
GSH	Tripeptid	Substrát v cykle GSH/GSSG, reaguje priamo s O_2^- a OH^- a organickými radikálmi

ných radikálov. Tieto odstraňovače sú strategicky umiestnené v subcelulárnych organelách buniek s cieľom dosiahnuť maximálnu ochranu. Napríklad superoxid-dismutáza, kataláza a glutatiónpoxidáza nie sú len v cytoplazme, ale aj v mitochondriách, kde sa väčšina intracelulárnych voľných radikálov produkuje (29, 30).

Hoci sa dosiahol významný pokrok pri identifikácii a pochopení spôsobu účinku jednotlivých enzýmov a antioxidač-

ných ochranných zložiek, komplexné pochopenie intracelulárnej siete rôznych antioxidantov brzdia prekrývajúce sa ochranné účinky cytoplazmových ochranných systémov (31, 32, 33). Kooperácia interakcií medzi rôznymi antioxidantmi v plazme je rozhodujúca pre maximálne potlačenie voľnoradikálových reakcií v extracelulárnom priestore. Najvýznamnejšie biologické extracelulárne antioxidanty sú glutatión, vitamín E, kyselina močová, glutatiónpoxidáza, superoxid-dismutáza, ka-

taláza, ceruloplazmín a transferín. O ich význame a dôleživosti ako extracelulárnych antioxidantov sa neustále diskutuje.

Antioxidačné ochranné systémy sa tradične označujú ako "primárne" a "sekundárne". Primárne ochranné zložky reagujú s voľnými radikálmi vytváranými priamo z kyslíka, hlavne zo superoxidového aniónu; sekundárne ochranné zložky odstraňujú radikály pochádzajúce z ďalších metabolických premien superoxidového aniónu (34). V niektorých prácach sa často klasifikujú rôzne chemické antioxidanty ako primárna ochrana a odstraňujúce enzýmy ako sekundárna ochrana. Nedávno publikovaná schéma vyčerpávajúcim spôsobom klasifikuje antioxidačné systémy a svojou univerzálnosťou umožňuje zatriediť viacero látok na základe ich účinku. Podľa tejto schémy primárna ochrana zahŕňa: 1. antioxidačné enzýmy, ako sú superoxidodismutáza, kataláza a peroxidázy, 2. antioxidačné látky, ako sú vitamíny E, A, C, glutatión a kyselina močová. Pre sekundárnu ochranu sa vyčleňujú lipolytické enzýmy, fosfolipázy, proteolytické enzýmy, proteázy, peptidázy, DNA reparačné enzýmy, endonukleázy, exonukleázy a lipázy (34).

OXIDAČNÝ STRES

Oxidačným stresom sa označuje stav, keď reaktívne formy kyslíka v ľudskom organizme sa vytvárajú v nadbytku. Tento stav nastane, ak koncentrácia antioxidantov je veľmi nízka, alebo ak tvorba voľných radikálov je zvýšená. Bunky znesú mierny oxidačný stres a často odpovedajú zvýšenou syntézou antioxidačných obranných enzýmov a ďalších ochranných protektívnych proteínov. Silný oxidačný stres môže zapríčiniť poškodenie buniek alebo dokonca vedie k ich usmrteniu. Oxidačné poškodenie DNA, proteínov a lipidov poškodí alebo zničí bunky. Indukované usmrtenie buniek sa vyskytuje pri nekroze alebo apoptóze. Oxidačný stres zapríčini zvýšenie intracelulárneho voľného Ca^{2+} a vedie k vyplaveniu intracelulárneho železa, ktoré katalyzuje tvorbu OH \cdot .

Následky oxidačného stresu pri reumatických chorobách sú prehľadne v tabuľke 3. Údaje sú spracované podľa pôvodnej práce Halliwella z roku 1995 (26).

Voľné radikály sa stávajú atraktívnym prostriedkom na vysvetlenie patologických pochodov spájajúcich rôzne chorobné stavy a toxicitu viacerých xenobiotík. Hoci dôkazy prítomnosti voľných radikálov sa získali vo viacerých systémoch, nie vždy sa to dá porovnať s ich úlohou pri indukcii poškodenia tkaniva, buniek alebo na úrovni makromolekúl. In vitro štúdie ukázali, že voľné radikály môžu imitovať rôzne patologické pochody, definitívny dôkaz pre ich zapojenie in vivo je ešte stále prípustný len za určitých podmienok.

Všetky aeróbne bunky majú významnú antioxidačnú kapacitu, ale nie je jasné, aké množstvo intracelulárnych voľných radikálov je potrebné na prekonanie tejto ochrany. Keďže väčšina antioxidantov sa nachádza vnútri bunky, je pravdepodobné, že koncentrácia voľných radikálov

Tab. 3. Oxidačný stres pri reumatických chorobách — dôkazy.

Pozorovanie	Komentár
Zvýšenie produktov peroxidácie lipidov v sére a v synoviálnej tekutine	Zníženie alfatokoferolu (na jednotku lipidov) v synoviálnej tekutine je v súlade so zvýšenou peroxidáciou lipidov ako naznačujú penové bunky, ktoré obsahujú oxidované lipoproteíny s nízkou denzitou v reumatoidnej synóvií a zvýšené hladiny 4-hydroxy-2-nonenalu, cytotoxického produktu vytvoreného rozkladom peroxidov lipidov pri reumatoidnej artritíde
Zníženie askorbátu v sére a v synoviálnej tekutine	Pravdepodobne vyplýva z oxidácie askorbátu počas jeho antioxidačného účinku. Aktivované neutrofily tiež rýchlo využívajú oxidovaný askorbát
Zvýšená exhalácia pentánu	Významný výsledný produkt peroxidácie lipidov, hoci jeho validita ako testu je sporná
Zvýšenie koncentrácie	Zistené produkty, sú výslednými oxidačnými produktmi účinku voľných radikálov kyseliny močovej na kyselinu močovú
Tvorba 2,3-dihydroxybenzoanu zo salicylátu vo zvýšených množstvách	Predpokladá sa, že 2,3-dihydroxybenzoan je produkt účinku na salicylát u pacientov užívajúcich aspirín
Degradácia kyseliny hyalurónovej voľnoradikálovým mechanizmom	Významným prejavom je zníženie viskózných parametrov roztokov hyaluronátu
Tvorba fluoreskujúcich proteínov	Fluorescenciu vyvolá oxidačné poškodenie aminokyselinových zvyškov v proteínoch
Zvýšené rovnovážne hladiny (pri bunkovej DNA) a zvýšené vylučovanie 8-OH-deoxyguanozínu močom	8-OH-dG je hlavný produkt oxidačného poškodenia DNA
Zvýšená hladina proteínových karbonylov v synoviálnej tekutine	Proteínové karbonyly sú výsledné produkty oxidačného poškodenia proteínov

Upravené podľa Halliwella (26).

potrebných na vytvorenie intracelulárneho poškodenia značne prevyšuje koncentráciu, ktorá je potrebná na vyvolanie extracelulárneho poškodenia, kde sa získala väčšina experimentálnych údajov.

LITERATÚRA

1. **McCord, J.M.:** Free radicals and inflammation. *Science*, 185, 1974, s. 529—531.
2. **Halliwell, B.:** Superoxide-induced generation of hydroxyl radicals in the presence of iron salts. Its role in degradation of hyaluronic acid by a superoxide-generating system. *FEBS Lett*, 96, 1978, s. 238—242.
3. **Grootveld, M., Henderson, E.B., Farrel, A., Blake, D.R., Parkes, H.G., Haycock, P.:** Oxidative damage to hyaluronate and glucose in synovial fluid during exercise of the inflamed rheumatoid joint. *Biochem J*, 273, 1991, s. 459—467.
4. **Winyard, P.G., Pall, H., Lunec, J., Blake, D.R.:** Non caeruloplasmin copper (phenanthroline-copper) is not present in fresh serum or synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis. *Biochem J*, 247, 1987, s. 245—247.
5. **Gutteridge, J.M.C.:** Bleomycin—detectable iron in knee-joint synovial fluid from arthritic patients and its relationship to the extracellular antioxidant activities of caeruloplasmin, transferrin and lactoferrin. *Biochem J*, 245, 1987, s. 415—427.
6. **Gutteridge, J.M.C., Rowley, D.A., Halliwell, B.:** Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals and lipid peroxidation in the presence of iron salts. *Biochem J*, 206, 1982, s. 605—609.
7. **Kaur, H., Fagerheim, I., Grootveld, M., Puppo, A., Halliwell, B.:** Aromatic hydroxylation of phenylalanine as an assay for hydroxyl radicals. *Anal Biochem*, 172, 1988, s. 360—367.
8. **Gutteridge, J.M.C.:** Iron promoters of the Fenton reaction and lipid peroxidation can be released from haemoglobin by peroxides. *FEBS Lett*, 201, 1986, s. 291—295.
9. **Biernacki, P., Swaak, A.J.G., Van Eijk, H.G., Koster, J.F.:** Intraarticular ferritin-bound iron in rheumatoid arthritis. *Arthr Rheum*, 29, 1986, s. 1187—1193.
10. **Kawasaki, N., Tanimoto, T., Tanaka, A., Hayakawa, T., Miyasaka, N.:** Determination of non-protein-bound iron in human synovial fluid by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J Chromatogr*, B 656, 1994, s. 436—440.
11. **Henderson, E.B., Grootveld, M., Farrell, A., Smith, E.C., Thompson, P.W., Blake, D.R.:** A pathological role for damaged hyaluronan in synovitis. *Ann Rheum Dis*, 50, 1991, s. 196—200.
12. **Farrell, A.J., Blake, D.R., Palmer, R.M.J., Moncada, S.:** Increased concentrations of nitrite in synovial fluid and serum samples suggest increased nitric oxide synthesis in rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis*, 51, 1992, s. 1219—1222.
13. **Kaur, H., Halliwell, B.:** Evidence for nitric oxide-mediated oxidative damage in chronic inflammation. *FEBS Lett*, 350, 1994, s. 9—12.
14. **Cadeias, L.P., Patel, K.B., Stratford, M.R.L., Wardman, P.:** Free hydroxyl radicals are formed on reaction between the neutrophil-derived species superoxide anion and hypochlorous acid. *FEBS Lett*, 333, 1993, s. 151—153.
15. **Robinson, J., Watson, F., Bucknall, R.C., Edwards, S.W.:** Activation of neutrophil reactive-oxidant production by synovial fluid from patients with inflammatory joint disease. *Biochem J*, 286, 1992, s. 345—351.
16. **Halliwell, B., Wasil, M., Grootveld, M.:** Biologically-significant scavenging of the myeloperoxidase-derived oxidant hypochlorous acid by ascorbic acid. *FEBS Lett*, 213, 1987, s. 15—18.
17. **Chidwick, K., Winyard, P.G., Zhang, Z., Farrell, A.J., Blake, D.R.:** Inactivation of the elastase inhibitory capacity of alpha-1-antitrypsin in fresh samples of synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 50, 1991, s. 915—916.
18. **Davies, J.M., S., Horwitz, D.A., Davies K.J.A.:** Potential roles of hypochlorous acid and N-chloramines in collagen breakdown by phagocytic cells in synovitis. *Free Radic Biol Med*, 15, 1993, s. 637—643.
19. **Hoffstein, S.T., Gennaro, D.E., Meunier, P.C.:** Cytochemical demonstration of constitutive H₂O₂ production by macrophages in synovial tissue from rats with adjuvant arthritis. *Amer J Pathol*, 130, 1988, s. 120—125.
20. **Merry, P., Grootveld, M., Lunec, J., Blake, D.R.:** Oxidative damage to lipids within the inflamed human joint provides evidence of radical-mediated hypoxic-reperfusion injury. *Amer J clin Nutr*, 56, 1991, s. 362S—369S.
21. **Stevens, C.R., Benboubetra, M., Harrison, R., Sahinoglu, T., Smith, E.C., Blake, D.R.:** Localization of xanthine oxidase to synovial endothelium. *Ann Rheum Dis*, 50, 1991, s. 760—762.
22. **Miesel, R., Zuber, M.:** Elevated levels of xanthine oxidase in serum of patients with inflammatory and autoimmune rheumatic diseases. *Inflammation*, 17, 1993, s. 551—561.
23. **Halliwell, B., Evans, P.J., Kaur, H., Chiraco, S.:** Drug-derived radicals: mediators of the side effects of anti-inflammatory drugs? *Ann Rheum Dis*, 51, 1992, s. 1261—1263.
24. **Grisham, M.B., Ware, K., Marshall, S., Yamada, T., Sandhu, I.S.:** Pro-oxidant properties of 5-aminosalicylic acid. *Dig Dis Sci*, 37, 1992, s. 1383—1389.
25. **Evans, P.J., Akanmu, D., Halliwell, B.:** Promotion of oxidative damage to arachidonic acid and alpha-1-antitrypsin by anti-inflammatory drugs in the presence of the haem proteins myoglobin and cytochrome c. *Biochem Pharmacol*, 48, 1994, s. 2173—2179.
26. **Halliwell, B.:** Oxygen radicals, nitric oxide and human inflammatory joint disease. *Ann Rheum Dis*, 54, 1995, s. 505—510.
27. **Cutler, R.G.:** Antioxidant and longevity. S. 235—266. In: Armstrong, D., Sohal, R.S., Cutler, R.G., Slater, T.F. (Eds.): *Free Radicals in Molecular Biology, Aging, and Disease*. New York, Raven 1984.
28. **Heffner, J.E., Repine, J.E.:** Pulmonary strategies of antioxidant defense. *Amer Rev Resp Dis*, 140, 1989, s. 531—534.
29. **Ji, L.L., Stratman, F.W., Lardy, H.A.:** Antioxidant enzyme systems in rat liver and skeletal muscle. Influence of selenium deficiency, chronic training, and acute exercise. *Arch Biochem Biophys*, 263, 1988, s. 150—160.
30. **Lawrence, R.A., Burke, R.F.:** Glutathione peroxidase activity in selenium deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun*, 71, 1976, s. 952—958.
31. **Leung, H.W., Morrow, P.E.:** Interaction of glutathione and ascorbic acid in guinea pig lungs exposed to nitrogen dioxide. *Res Comm Chem Pathol Pharmacol*, 31, 1981, s. 111—118.
32. **Leung, H.W., Vang, M.J., Mavis, R.D.:** The cooperative interaction between vitamin E and vitamin C in suppression of peroxidation of membrane phospholipids. *Biochim Biophys Acta*, 664, 1981, s. 266—272.
33. **Machlin, L., Bendich, A.:** Free radical tissue damage protective role of antioxidant nutrients. *FASEB J*, 1, 1987, s. 441—445.
34. **Davies, K.J.A.:** Proteolytic systems as secondary antioxidant defense. S. 25—67. In: Chow, C.K. (Ed.): *Cellular Antioxidant Defense Mechanisms*. Boca Raton, FL, CRC, 1988.
35. **Yu, B.P.:** Cellular defense against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev*, 74, 1994, s. 139—162.

Do redakcie došlo 12.12.1996.

Adresa autora: RNDR. O. Greguška, CSc., Výskumný ústav reumatických chorôb, Nábr. I. Krasku 4, 921 01 Piešťany, Slovensko.