

IV. RITMUS A TERMÉSZETTUDOMÁNYBAN



SZABADGYÖK-KUTATÁS, MÓDSZERFEJLESZTÉS A KÜLÖNBÖZŐ TUDOMÁNYTERÜLETEK IGÉNYEI SZERINT

DR. BLÁZOVICS ANNA

Semmelweis Egyetem Farmakognóziai Intézet

E-mail: blazovics.anna@pharma.semmelweis-univ.hu

DOI 10.23716/TT0.23.2020.16

Absztrakt:

A múlt évszázad első évtizedeiben az atomfizika nagy felismeréseinek köszönhetően a kvantummechanikai módszerek alkalmazásával a bonyolultabb molekulák sajátságai is leírhatókká váltak. A radioaktivitás felfedezésekor már ismert volt, hogy a radioaktív sugárzások hatására kémiai változások is bekövetkeznek. A szabadgyökös folyamatok kutatása a két világháború között bontakozott ki. A szabad atomok és gyökök nagy variációban keletkeznek, például termikus energiával kémiai kölcsönhatásokban, fotokémiai úton, radioaktív sugárzásra, elektromos kisülésre, ultrahang hatására. A szabadgyökös károsodások mérséklésére vonatkozó korai kutatások több iparágban, így a gumiabroncsgyártásban, illetve a mezőgazdaságban és az élelmiszeriparban folytak. Kezdetben az orvosi kutatások a háború során elszenvedhető sugárkárosodások kivédésére irányultak. Az a felismerés, hogy az élő szervezet sejtjeiben, szubcelluláris partikulumaiban, egyes enzimek működése kapcsán is keletkeznek szabad gyökök és folyhatnak reakciók szabadgyökös mechanizmus szerint, SZENT-GYÖRGYI ALBERT (1941) nevéhez is fűződik. Az egyre bővülő metodikai repertoárnak köszönhetően az orvosbiokémia kutatások arra a felismerésre vezettek, hogy betegségekben megváltozik a redox-homeosztázis, vagyis a szabad gyök – antioxidáns egyensúly. Az elmúlt két évtizedben a molekuláris biológusok is igazolták a szabad gyökök jelentőségét a szignáltranszdukció során.

Kulcsszavak: szabad gyökök, módszerek

Ahogy az élőlényekre a bioritmus jellemző, úgy a tudományos életben is megfigyelhető a tudományágak fejlődése közötti ritmus. A szabadgyök-kutatással kapcsolatban elmondható, hogy a fizikai, a kémiai a biológiai folyamatok tanulmányozása és a gyógyítással kapcsolatos ismeretek bővülése az évtizedek alatt mindig magasabb és magasabb szinteken gerjesztették a kutatásokat a

természettudományi ágakban és természetszerűen hatottak egymásra. A XIX. század végén és a XX. század elején az atomfizika nagy felismeréseinek köszönhetően a kvantummechanikai módszerek alkalmazásával a bonyolultabb molekulák sajátságai is leírhatókká váltak. Az atomi szerkezet, az elektron hullámtermészetének felismerése és a radioaktivitás felfedezésekor már ismert volt, hogy a radioaktív sugárzások hatására kémiai változások is bekövetkeznek. Úttörő kutatásaiért Becquerel és a Curie házaspár fizikai (1903), Marie Curie kémiai (1911), Bohr (1922), De Broglie (1929), később Schrödinger (1933) és Pauli (1945) fizikai és Pauling (1954) kémiai Nobel-díjat kapott. Az izotópok élettani/kórélettani hatásainak felismerése is szükségszerűen bekövetkezett. Hamarosan az is kiderült, hogy a sugárzó izotópok felhasználhatók az élettani folyamatok jobb megismerésére, sőt a gyógyítás eszközei is lehetnek. Eközben számtalan kutatási eredmény látott napvilágot az említett tudományterületekről. 1943-ban Hevesy izotópos kutatási eredményeit is kémiai Nobel-díjjal jutalmazták. A radioaktív izotópok békés felhasználásért pedig 1959-ben megkapta az Atoms for Peace Awards, az Atom Békés Felhasználásáért-díjat.

A szabadgyökös folyamatok kutatása a két világháború között bontakozott ki. A szabad atomok és gyökök nagy variációban keletkeznek, például termikus energiával kémiai kölcsönhatásokban, fotokémiai úton, radioaktív sugárzásra, elektromos kisülésre, ultrahang hatására. A szabad gyökök olyan molekulák, vagy molekulafragmentek, amelyek külső orbitáljukon egy egyedülálló, párosítatlan elektront tartalmaznak. A szabad gyökök kémiailag reaktívak, élettartamuk rövid.

A szabadgyökös károsodások mérséklésére vonatkozó korai kutatások több iparágban, így a gumiabroncsgyártásban, illetve a mezőgazdaságban és az élelmiszeriparban folytak.

Kezdetben az orvosi kutatások a háború során elszenvedhető sugárkárosodások mérséklésére irányultak. A sugárkárosodásokat kivédő élelmiszerek kutatása a németek részéről az 1930-as évek végén eredményezte a Brassicaceae- (káposzta) félékben rejlő lehetőségek felismerését, de csak évtizedek múltával, az 1990-es években derül ki, hogy bioaktív anyagaiknak élettani hatása a szignáltranszdukción befolyásolása révén valósul meg.

Az a felismerés, hogy az élő szervezet sejtjeiben, szubcelluláris partikulumaiban, egyes enzimek működése kapcsán is keletkeznek szabad gyökök és folyhatnak reakciók szabadgyökös mechanizmus szerint, Szent-Györgyi Albert (1941) nevéhez is fűződik. Bár Nobel-díját 1937-ben nem a szabad gyökök élettani szerepének felismeréséért kapta, mégis azt lehet mondani, hogy ez a kutatási irány meghatározó volt a későbbi generációk számára.

Megállapítását, hogy a fehérjék élő állapotban csak *in vivo*, az élő sejtben lehetnek, és a kristályosítás során elvesztik „élő” jellegüket, és hogy az élő állapot olyan sajátos fizikai állapot, amely elektronspin-rezonancia (ESR) jelet ad, vagyis

paramágneses, csak évekkel később igazolták. Coman (1944) a sejteket összetartó erőket tanulmányozva azt találta, hogy a rákos szövetekben a sejtek között ezek igen kicsinyek. Laki és Ladik (1976) megállapították, hogy a kohéziós erők nagysága a fehérjék elektronhiányosságának mértékétől függ. A telítetlenség fokozásával ezek az erők néhány nagyságrenddel megnövekednek. A rákos szervezetben az elektrontelítetlenség túlságosan kicsi, ennek következtében a kohéziós erők is gyengék. Szent-Györgyi szerint ez a kontaktgátlás hiányára és a rák könnyű szétszóródására, a metasztázisok keletkezésére adhat magyarázatot. Pethig (1977) és Bone (1978) a fehérjék vezetőképességét tanulmányozták, ami a vegyértéksáv telítetlenségére utal. Pohl (1977) és munkatársai mérései alátámasztják, hogy az élő szövetek ESR szignáljáért főképpen a sejtalkotórészek fehérjeinek szabad gyök jellege felelős.

Míndehhez hozzájárultak a II. világháborús események. Miután a Pearl Harbor-i csatában 1941. december 7-én a Nagumo Csúicsi tengernagy vezette japán flotta megtámadta az Amerikai Egyesült Államok haditengerészetének Pearl Harbor-i (Oahu, Hawaii-szigetek, USA) támaszpontját, másnap. Rooseveltnél elnök bejelentette, hogy az USA belép a háborúba, majd 1945-ben Truman elnöksége alatt augusztus 6-án Hirosimára és augusztus 9-én Nagasakira dobtak le atombombát. Atomtámadás következtében a hő és lökéshullám okozta károk mellett a direkt és indirekt sugárhatásokkal is kellett számolni.

Direkt sugárhatás az, amikor a sugárenergia elnyelődése és az általa kiváltott elsődleges folyamatok ugyanazon a molekulán következnek be. Az indirekt sugárhatás pedig az, amikor az energia abszorpció és az általa kiváltott hatás különböző molekulákon jön létre, vagyis a sugárzó energia egy másik molekula közvetítésével (szabad gyök) tevődik át a biomolekulákra. A víz radiolízise az elsődleges, mivel az élő szervezetekben 60-70% víztartalmú szövetek és 90%-os testnedvek vannak. A víz radiolízise során hidroxil-gyökök (OH.) és hidratált elektronok (H_2O^{\cdot}) jönnek létre. Reakcióidejük 10^{-11} sec. A másodlagos szabad gyökök a molekuláris oxigén jelenlétében keletkező szuperoxid (O_2^{\cdot}), perhidroxil (HO_2^{\cdot}) és a radikális hatású, de nem gyök, hidrogén-peroxid (H_2O_2).

Reakcióidejük 10^{-8} – 10^{-3} sec.

A dózis nagysága és a jelentkező károsodás mértéke embernél 50 Gy feletti dózisonál 1–2 napos túlélés, 10–50 Gy esetében a túlélési esély LD50/7, és súlyos gyomor és bélrendszeri tünetek jelentkeznek, míg a 0,7-10 Gy csontvelőkárosodást, kóros vérszegénységet, fehérvérsejt-hiányt és fertőzéseket okoz. (1 gray = 100 rad, 1 rad = 0,01 joule) A kezelés szuppresszív, antibiotikum, kolóniastimuláló és növekedési faktorok, csontvelő-átültetés.

Az élő szervezetben lejátszódó szabadgyökös reakciók intenzív kutatása mégis csak jóval később, McCord és Fridovich (1969–1976) munkásságához, a szuperoxid-dizmutáz (SOD) felfedezéséhez, szerkezetének és funkciójának

tisztázásához fűződött, bár az eritrokupreint már korábban is ismerték. A hetvenes évek közepére tehető Bergström, Samuelsson és Vane prosztaglandin-kutatása (izolálás, szerkezetkutatás) és Samuelsson, Corey, Vane, valamint Moncada jelentős felfedezése, a peroxid-származékok bioszintézisének igazolása az arachidonsav-kaszkában. E kutatásokért Moncada kivételével 1982-ben orvostudományi Nobel-díj kitüntetésben részesültek. E felfedezések nem születhettek volna meg az kémiai, analitikai módszerek robbanásszerű fejlődése és az orvosbiokémiai kutatások előtérbe kerülése nélkül.

A teljesség igénye nélkül meg kell említeni a fizikai Nobel-díjas tudós Thomson (1908) tömegspektrométer, Raman (1930) Raman spektroszkópia, Bloembergen (1981) NMR relaxációs mechanizmusok, a kémiai Nobel-díjas Ernst (1991) NMR Fourier-spektroszkópia, az orvostudományi Nobel-díjas Lauterbur és Mansfield (2003) MRI kutatások területén elért eredményeit, valamint Zavoiskyt, akit többször is Nobel-díjra jelöltek az ESR spektroszkópia feltalálásáért. Az analitikai kutatásokat forradalmi mértékben segítették a különböző kromatográfiai lehetőségek és a tömegspektrométerek alkalmazása. A lézereszorpciós ionizáció a kémiai Nobel-díjas Tanaka (2002) nevéhez fűződik, az elektroporlasztásos ionizáció alkalmazási lehetőségéért Fenn (2002) kémia Nobel-díjat kapott. Betzig, Hell és William megosztott (2014) kémiai Nobel-díja a „szuperfelbontású fluoreszcens mikroszkópia kifejlesztéséért” járt. A műszer a molekuláris biológiai kutatásokhoz nélkülözhetetlen, mely újabb távlatokat nyit meg az orvosbiokémiai és immunológiai kutatások területén.

Az élő szervezetekbe bejutó xenobiotikumok szabadgyökös konverziója szintén lényeges felismerés volt. Kiderült, hogy számos vegyi anyag, pl. permetlé, kemoterápeutikum, a szervezetben toxikus szabad gyökökké alakul át a máj citokróm P450 izo-enzimjeinek hatására.

A nitrogén-monoxid (NO) molekula élettani jelentőségének felismerése Ignaro, Nathan, Moncada és munkatársai nevéhez fűződik. Ignaro 1988-ban e kutatásokért kapott Nobel-díjat. Érdekeséggéppen megemlíthető egy ismert anekdota, mely szerint Nobelnek szívpanaszaira orvosa nitroglicerint javasolt értágításra, de Nobel ezt az ötletet elvetette, pedig mai ismereteink szerint a nitroglicerinből keletkező nitrogén-monoxid direkt tónuscökkentő hatást fejt ki az érfal simaizomsejtjeire. Az orvos is megérdemelte volna a Nobel-díjat.

Évtizedeknek kellett eltelni, mire felismerték, hogy a főbb szabadgyök-termelő folyamatok az élő szervezetben a sejt energiaellátását biztosító mitokondriális oxidatív metabolizmus, a mikroszomális drog-metabolizáló enzimrendszer (MFO), a prosztaglandin bioszintézis kaszkád, a konstitutív és indukálható NO-szintáz aktivitás, a fagociták, monociták, makrofágok, Kupffer-sejtek „respiratory burst”-je, a peroxisómákban képződő hidrogénperoxid autooxidációja, a bél NOX aktivitása, az endothel dysfunctioja és a spontán szabadgyök-képződés.

A múlt század első felében végzett fizikai (sugárzások, mágneses rezonancia, optika) kutatások eredményei számos orvosi műszer kifejlesztését eredményezték. A korszerű MRI technológia kifejlesztéséhez a fizikai Nobel-díjas Rabi (1944), Bloch és Purcell (1952) kutatásaira a CT technológia megvalósításához Hounsfield és Cormack orvostudományi Nobel-díjas tudósok munkásságára volt szükség. Ma már a csúcstechnológiát jelentő képalkotó eljárások, UH, MRI, CT, endoszkópia stb. nélkül szinte elképzelhetetlen a gyógyítás, viszont ezek a vizsgálatok további kémiai, biokémiai és orvosi biológiai/biokémiai kutatásokat gerjesztenek a betegek minél jobb ellátása, gyógyítása érdekében. A biokémia és az immunológia tudományos eredményeinek összevetése ma már egységes képet ad az immunmechanizmusok és a szabadgyökös reakciók kapcsolatáról.

A szabadgyökös kutatások újabb lendületet kaptak a csernobili atomerőmű katasztrófát (1986. április 26.) követően. — A karbantartás közben felmerült komplikációk miatt két robbanás történt a 4. blokkban. A tűz gyorsan átterjedt az egész komplexumra. A grafitűz radioaktív anyagokat juttatott a légkörbe. A két fő radioizotóp a jód 131, — felezési ideje 8 nap — és cézium 137, — felezési ideje 30 év. A csernobili atomerőművet 2000. december 9-én állították le véglegesen. 2016. november 29-e óta pedig egy 110 m hosszú, 257 m széles és 105 m magas, 36 ezer tonnás acélszerkezet fedi be az egész sérült energiablokkot. — A katasztrófa miatt 50 millió curie szabadult ki. Európát 0,001–0,1 siever érte. (Hozzávetőlegesen a kozmikus sugárzás: 1 év alatt 1 siever dózis.) A csernobili sugárkárosodott áldozatok számát széles határok között említik, de pontos adat nem áll rendelkezésre. Az elmúlt évtizedek alatt az ökoszisztéma sérült, a talajbaktériumok elpusztultak. Izotópok halmozódnak az élő szervezetekben. Egyes állatfajok antioxidáns rendszere viszont megerősödött, DNS javító mechanizmusa megváltozott, ezáltal ők egészségesen túléltek a sugárkárosodást. Ezek az események az antioxidáns védelmi mechanizmusok kutatását váltották ki.

Jelenlegi ismereteink szerint a szabad gyökök és az antioxidánsok egyensúlya, vagyis a redox-homeosztázis meghatározó a szöveti működés szempontjából, mivel az oxidatív stressz és az antioxidáns védekező mechanizmus három szintje, az antioxidáns molekulák, az enzimatis védekezés és az eltakarító mechanizmusok egyaránt alapvető szerepet játszanak az életfolyamatokban. A légköri oxigén megjelenésekor kialakuló eukarióta sejtek, szigorúan egymásra épülő antioxidáns védekező mechanizmusai lehetővé teszik, hogy az oxigén szabad gyökökkel szemben bizonyos határokig a membránstruktúrák és enzimműködések károsodása nélkül életképesek maradjanak, úgy, hogy a szabad gyökök fiziológiás szerepe továbbra is biztosított maradjon. Az egészséges szervezet képes a szabadgyök-túlprodukciónak megakadályozni. Alapvető feltétel az alacsony szöveti oxigéntenziónak, ami kb. 26 Hgmm, vagy ennél kisebb érték. Az elsődleges antioxidáns vonal az enzimatis védekezés, a szuperoxid-dizmutázok (SOD-ok), kataláz, peroxidázok,

glutation-S-transzferáz, DT-diaforáz, reduktázok összehangolt működése. Az enzimatiskus védekezést endogén és exogén antioxidáns, scavenger molekulák támogatják. A redox-egyensúly fenntartásában nélkülözhetetlen néhány d-mező elem, a Fe, Cu, Zn és a Mn, valamint a nemfémes és fémes jelleget egyaránt hordozó Se is, mely elemek mind az oxidatív stressz katalizátorai, mind az antioxidáns enzimek nélkülözhetetlen alkotói.

A kutatások során azonban az is kiderült, hogy az antioxidáns tulajdonságú táplálkozási faktorok túladagolásával, mint például az A, E, C, D, K-vitaminok, vagy polifenolos vegyületek, — sőt a káposztafélék izotiocianátjai vagy a túlzott fémtartalom — súlyos károsodásokat idézhetnek elő, mert e hatóanyagok antioxidáns tulajdonságukkal, illetve amellet befolyásolják a sejteken belüli szignál-traszdukciót, a természetes sejthalált és a proliferációt. Ebből a szempontból különösen veszélyesek a kontrollálatlanul fogyasztott étrend-kiegészítők, különösen sugár, vagy kemoterápia alatt, tekintettel az antioxidánsok prooxidánsokká alakulására.

Bár nem a szabadgyökös kutatásokért kapta 1974-ben de Duve, az intracelluláris emésztés (autolízis), vagy 2002-ben Brenner, Horvitz és Sulston az autofágia felfedezéséért a fiziológiai és orvostudományi Nobel-díjat, sőt az ubiquitin-proteaszóma rendszer felfedezéséért és funkciójának leírásáért Hershko, Ciechanover, valamint Rose 2004-ben a kémiai Nobel-díjat, mégis hihetetlen hatással voltak e tudományos eredmények is a szabadgyökös kutatások magasabb dimenzióba emelésében. Különösen a molekuláris biológiai, genetikai kutatások kaptak lendületet. Nagy hatással voltak a gyógyszerfejlesztésre is.

Meg kell még említeni, hogy az antioxidáns terápiával kapcsolatban a kezdeti felbuzdulás nem váltotta be a reményeket, így az 1990-es években végzett nagy kohorsz tanulmányok, az ATBC és CARET negatív eredménnyel zárultak. Bjelakovic és munkatársai (2012) sem tudták bizonyítani metaanalízisek alapján az antioxidáns kiegészítő kezelések jótékony hatását különböző betegségekben. A jelenlegi kutatások azt valószínűsítik, hogy a természetes forrásból származó antioxidáns vegyületek különböző enzimatiskus folyamatok révén átalakulva jutnak a keringésbe, majd eltérő módon hatnak a szignáltranszdukcióra, és befolyásolják a sejtek életműködését a proliferációt, az apoptózist és az autofágiát.

A Fukushima-ban 2011. március 11. bekövetkezett újabb atomerőmű katasztrófát a Nemzetközi Nukleáris Eseményskála (INES) szerinti legsúlyosabb, 7-es fokozatba sorolták. — A Richter skálán 9-es földrengést követő 10 méter magasságú cunami tönkretette a dízelaggregátorok hűtőrendszerét, ezért a reaktorokban megszűnt a hűtővíz keringetése és a fűtőelemek túlhevülhettek. — A katasztrófa hatásai még nem kellően feltártak.

Az utóbbi 1–2 évtizedben a metán, a kénhidrogén, a formaldehid, a széndioxid és a fémek is egyre inkább tért hódítanak a szabadgyökös kutatások területén.

A rengeteg tudományos felfedezés és kísérletes tanulmányok eredményei ellenére a betegellátásban még mindig várat magára az áttörés, bár a szabadgyökös kutatások évtizedei alatt a klinikumban alkalmazható metodikai repertoár többször is robbanásszerű fejlődésen ment keresztül, a viszonylag könnyen meghatározható lipidperoxidációs termékektől a fehérje és DNS károsodások vizsgálatán keresztül egészen a molekuláris biológiai folyamatok detektálásáig. A vizsgálati módszerek mégsem váltak a rutinlaboratóriumi panelek részeivé. Ennek oka többek között az, hogy több paraméter együttes vizsgálata alapján lehet csak eldönteni, hogy a változásokat a beteg kezelése, tápláltsági szintje és életkora milyen mértékben befolyásolja. További kérdéseket vet fel, hogy a nem várt eltérések, különösen a polimorbid betegek esetében vajon a módszereket zavaró gyógyszerek, a táplálékból származó bioaktív anyagok vagy egyéb ismeretlen tényezők következménye. A körültekintő vizsgálatok jelentős anyagi teherrel járnak.

A szabadgyök-kutatás itt nem ér véget, és reméljük, hogy a XXI. században számos felmerülő kérdésre megfelelő válasz kapunk majd.

Irodalom

BLÁZOVICS Anna: Redox homeosztázis, bioactive agents and transduction therapy. *Current Signal Transduction Therapy* 2. 2007: 3, 226–239.

BLÁZOVICS Anna, NYIRÁDY Péter, ROMICS Imre, SZÚCS Miklós, HORVÁTH András, SZILVÁS Ágnes, SZÉKELY Edit, SZENTMIHÁLYI Klára, BEKŐ Gabriella, SÁRDI Éva: How can cancer-associated anemia be moderated with nutritional factors and how do *Beta vulgaris* L. ssp. *esculenta* var. *rubra* modify the transmethylation reaction in erythrocytes in cancerous patients? *Anemia INTECH, Open Access* 2012. 1–23.

BLÁZOVICS Anna, KURSINSZKI László, PAPP Nóra, SZŐKE Éva, Hegyi Gabriella, SZILVÁS Ágnes: Is professional prescription of a commercially derived dietary supplement in colectomised patients necessary? *The EUROPEAN Journal of Integrative MEDICINE* 8. 2016: 3, 219–226.

BLÁZOVICS Anna: A szabadgyök-kutatás évtizedei és magyar vonatkozásai = Decades of free radical research and its Hungarian aspects. *Kaleidoscope Művelődés- Tudomány- és Orvostörténeti Folyóirat* 8. (2017):14, 133–148.

BLÁZOVICS ANNA, KOCSIS IBOLYA: Szabadgyök-kutatás módszerei, néhány fontosabb orvostörténeti vonatkozása = Methods of free radical research, and its primary impact in the history of medicine. *Kaleidoscope Művelődés- Tudomány- és Orvostörténeti Folyóirat* 9. 2018:16, 159–170.

BLÁZOVICS Anna, SÁRDI Éva: Methodological repertoire development to study the effect of dietary supplementation in cancer therapy. *Microchemical Journal* 136. (2018): 121–127.

Britannica Hungarica Nagylexikon, Kossuth Kiadó, 1994–2001.

https://hu.wikipedia.org/wiki/Nobel-d%C3%ADjasok_list%C3%A1ja

Free radical research, method development according to the needs of different disciplines

In the first decades of the last century, thanks to the great recognitions of atomic physics, the methods of quantum mechanics have become the characteristics of more complex molecules. When exploring radioactivity, it was already known that chemical changes would occur as a result of radioactive radiation. Research of free radical processes unfolded greatly between the two world wars. Free atoms and radicals are generated in a large variety, e.g. by thermal energy in chemical interactions, in photochemical route, effects of radioactive isotopes, electrical discharge and ultrasound. Early research on the reduction of free radical damage has been conducted in several industries, including tire manufacturing, agriculture and food industry. Initially, medical research aimed at prevention of radiation damage during the war. The recognition, that free radicals are formed in the cells in subcellular particles and in enzyme functions in living organism, and the reactions of the free radicals in these systems are also attributed to Albert Szent-Györgyi (1941). Due to the ever-expanding methodical repertoire, medical biochemistry researches have led to the recognition that the redox homeostasis, free radical and antioxidant balance is changed in diseases. Over the last two decades, molecular biologists have also demonstrated the importance of free radicals during signal transduction.

Keywords: free radicals, methods