

Nieoczekiwane niepowodzenia prób klinicznych z antyoksydantami

Unexpected failure of antioxidant clinical trials

Tomasz H. Wierzba

Katedra i Zakład Fizjologii, Akademia Medyczna, Gdańsk

Streszczenie

W pracy skonfrontowano wnioski z licznych badań eksperymentalnych, sugerujących korzyści ze stosowania antyoksydantów, z wynikami prób klinicznych i metaanaliz opartych na tych próbach, które tych korzyści nie potwierdziły. Wyszczególniono główne kierunki działania reaktywnych postaci tlenu (ROS) i sposoby działania antyoksydantów, ze szczególnym uwzględnieniem potencjalnych mechanizmów, przez które antyoksydanty mogą zakłócać funkcjonowanie ustroju. Przedmiotem rozważań były regulacyjne aspekty działania ROS i możliwości zaburzenia homeostazy przez nadmiar antyoksydantów oraz perspektywiczne kierunki poszukiwań badawczych nad praktycznym wykorzystaniem antyoksydantów.

Słowa kluczowe: reaktywne postaci tlenu, antyoksydanty, próby kliniczne, metaanaliza, regulacja, tokoferol, kwas askorbinowy

Abstract

Data from a variety of experimental studies suggesting benefits of the antioxidant supplementation were confronted with those from clinical trials and large metaanalyses which have failed to prove those benefits. Major directions of the biological effects of reactive oxygen species (ROS) and antioxidants were specified. In particular, plausible mechanisms through antioxidants may disturb physiological functions were discussed. The regulatory aspects of ROS potency, and the ways antioxidants may disturb homeostasis were taken particularly into account. Directions of prospective research towards practical use of antioxidants were suggested.

Key words: reactive oxygen species, antioxidants, clinical trials, metaanalysis, regulation, tocoferol, ascorbic acid

Kardiologia Polska 2005; 63 (Supl. 2): 472-482

Postaci tlenu występujące w układach biologicznych

Od chwili odkrycia przez Priestleya w 1774 r., tlen przykuwa uwagę badaczy jako pierwiastek życiodajny. Priestley zanotował, że oddychanie czystym tlenem wywołuje przyjemne doznania oraz wywnioskował – jak się później okazało niesłusznie – że przedłuża czas życia myszy.

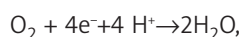
Tlen jest łatwo dostępnym akceptorem elektronów warunkującym uwalnianie energii zawartej w substratach pokarmowych i jej wykorzystywanie przez organizmy przystosowane do funkcjonowania w jego środowisku. Tlen w stanie podstawowym (tlen trypletowy) jest pierwiastkiem stosunkowo mało reaktywnym ze

względem na swoistą konfigurację dwóch zewnętrznych elektronów, które nie posiadają wzajemnych odpowiedników o przeciwnym spinie (kierunku obrotu wokół własnej osi), a mała reaktywność takiej cząsteczki wynika z niewielkiego prawdopodobieństwa napotkania partnera reakcji. Cząsteczka, którą może utlenić tlen w stanie podstawowym, czyli innymi słowy pobrać od tej cząsteczki dwa elektrony, powinna, w myśl zasad mechaniki kwantowej, posiadać także dwa niesparowane elektrony o spinach skierowanych przeciwnie względem dwóch zewnętrznych elektronów cząsteczki tlenu [1]. Większość molekuł występujących w przyrodzie ma sparowane elektrony, dlatego nie reaguje z tlenem w stanie podstawowym. Znacznie większą reak-

Adres do korespondencji:

Tomasz Wierzba, Katedra i Zakład Fizjologii, Akademia Medyczna, ul. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk, tel.: +48 58 349 14 75, +48 58 349 15 20, faks: +48 58 349 15 21, e-mail: twierzba@amg.gda.pl

tywnością od cząsteczki tlenu w stanie podstawowym charakteryzują się reaktywne postaci tlenu (*reactive oxygen species* – ROS). ROS stanowią zróżnicowaną grupę cząsteczek. Rodniki tlenowe, takie jak np. anionorodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\cdot-}$), rodnik hydroksylowy (OH^{\cdot}), rodniki organiczne, w tym rodniki nadtlennowe (ROO^{\cdot}) są molekułami, które posiadają niesparowany elektron w wyniku niepełnej redukcji cząsteczki w stanie podstawowym. Cząsteczka tlenu w stanie podstawowym ulega standardowo całkowitej redukcji przez przyłączenie 4 elektronów (O_2^{2-}), w reakcji:



której produktem jest woda. Niekiedy jednak w przebiegu reakcji chemicznych cząsteczka tlenu ulega jedynie częściowej redukcji, przyłączając mniej elektronów. Klasycznymi produktami tych przemian są anionorodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\cdot-}$) przy jednoelektronowej redukcji cząsteczki O_2 , dwuelektronowej – nadtlenuk wodoru (H_2O_2), zaś trójelektronowej – niezwykle reaktywny rodnik hydroksylowy (OH^{\cdot}). Rodniki tlenowe określane są najczęściej mianem *wolnych rodników tlenowych* (*oxygen free radicals*, OFR). Przymiotnik: *wolny* określający molekułę zdolną do samoistnego istnienia, jest powszechnie używany, ale pod względem semantycznym nic nie wnosi, gdyż nie funkcjonują inne przymiotniki określające rodniki tlenowe. Do ROS należą także cząsteczki, które nie są rodnikami, ale w których w wyniku absorpcji energii doszło do przegrupowania elektronów na niestabilne orbitale o podwyższonej energii. Takimi cząsteczkami, powstającymi powszechnie w organizmach żywych, są np. nadtlenuk wodoru (H_2O_2), anion podchlorynowy ($^{\cdot}OCl$), nadtlenuk azotyn ($ONOO^{\cdot}$), tlen singletowy (1O_2). Jakkolwiek określenia: *reaktywne postaci tlenu* i *wolne rodniki tlenowe* nie są synonimami, to określenie *wolnorodnikowy* jest powszechnie stosowane i odnosi się do zjawisk utleniania zachodzących przy udziale dowolnych ROS.

Kierunki działania ROS w ustroju

Z wysoką reaktywnością ROS wiąże się ich zdolność do reagowania z różnymi cząsteczkami, dlatego efekty ROS obserwowane w układach biologicznych są z reguły niespecyficzne. W organizmach żywych ROS reagują ze związkami drobnocząsteczkowymi, białkami, lipidami, DNA i histonami otaczającymi DNA, a także uczestniczą w reakcjach węglowodanów z aminokwasami, białkami oraz z zasadami purynowymi i pirymidynowymi składającymi się na DNA. Utlenienie białek wiąże się często z dekompozycją ich struktury przestrzennej, fragmentacją, agregacją i w rezultacie z utratą właściwości enzymatycznych oraz utratą zdolności do przekazywania sygnałów

w układach biologicznych. Najistotniejszą konsekwencją peroksydacji lipidów są zmiany właściwości fizykochemicznych błon biologicznych. Zazwyczaj dochodzi do obniżenia ich płynności wskutek wysycenia nienasyconych kwasów tłuszczowych [1]. W błonach biologicznych białka wplecione są struktury lipidowe. Zmiany w kompozycji lipidowej błony, wywołane przez peroksydację lipidów, nieuchronnie pociągają za sobą zmiany konformacji sąsiadujących białek i zaburzenia ich funkcji. Efektem wolnorodnikowych uszkodzeń DNA są doraźne lub trwale zakodowane zmiany metabolizmu komórki. DNA mitochondrialne jest znacznie bardziej podatne na uszkodzenia niż jądrowe, z uwagi na stosunkowo nieduży rozmiar i brak ochronnego otoczenia histonów. Oksydacyjne zaburzenia struktury białek mitochondrialnych łańcucha oddechowego, błony mitochondrialnej i mitochondrialnego DNA skutkują upośledzeniem komórkowych przemian energetycznych, mogą również inicjować mechanizmy prowadzące do unicestwienia komórki, zarówno w sposób niekontrolowany, indukowany z zewnątrz (nekroza) [2], jak też zależny od uruchomienia kaskadowych układów programowanej śmierci komórki (apoptoza) [3]. Liczne modelowe badania eksperymentalne wskazują, że większość reakcji wolnorodnikowych prowadzi do destrukcji cząsteczek docelowych, a w skali organizmu do zaburzeń struktury i czynności komórek, tkanek i całego ustroju. Stąd też powszechne przekonanie o szkodliwym wpływie ROS na organizmy żywe i o dużym wpływie ROS na rozwój zjawisk chorobowych, czemu należy przeciwdziałać.

ROS jako czynniki patogenetyczne

Z uwagi na wysoką reaktywność ROS, wielokierunkowość ich działania oraz niezwykle krótki czas istnienia *in vivo* wielu rodników tlenowych, udowodnienie udziału ROS w rozwoju zjawisk chorobowych stwarza zasadnicze trudności. Przypisano udział ROS w rozwoju co najmniej kilkuset chorób i zjawisk chorobowych [1, 4], lecz jedynie w niewielkiej części badań udało się w sposób przekonujący prześledzić łańcuch przyczynowo-skutkowy wiążący ROS z konkretnym mechanizmem patogenetycznym. Postulowane od ponad 50 lat związki przyczynowe między ROS a rozwojem poszczególnych chorób mają niejednokrotnie charakter wybitnie spekulatywny i są często oparte na przesłankach pośrednich, wynikających z oznaczeń produktów przemian wolnorodnikowych w materiale biologicznym lub z *a priori* wydedukowanego modelu rozwoju zjawisk chorobowych w oparciu o przebieg reakcji utleniania opisywanego w prostych układach *in vitro*.

Liczne doniesienia z piśmiennictwa wskazują, że ROS przyczyniają się do rozwoju chorób metabolicznych i ich powikłań narządowych [1, 4], m.in. miażdżycy, cukrzycy, dny moczanowej, alkaptonurii, hemochromatozy,

porfirii, nadczynności tarczycy. W patomechanizmie miażdżycy ROS są obecne na wielu poziomach jej rozwoju [5]. Są czynnikiem dysfunkcji śródbłonna naczyniowego, uczestniczą w przebiegu odczynu zapalnego w ścianie naczyniowej. Przyczyniają się do powstawania komórek piankowatych zawierających utlenione lipidy. Powodują utlenianie lipoprotein osocza o niskiej gęstości (LDL) i uszkodzenie receptorów dla LDL.

ROS są uznanym czynnikiem chorób neurodegeneracyjnych [6]: stwardnienia zanikowego bocznego, choroby Alzheimera, choroby Parkinsona, płasawicy Huntingtona, stwardnienia rozsianego, a także uszkodzeń ośrodkowego układu nerwowego wywołanych przez udary, urazy i miejscowe stany zapalne. Wykazano występowanie podwyższonych stężeń markerów lokalnych reakcji utleniania w przebiegu chorób narządu wzroku: w retinopatiach, zaćmie, jaskrze.

ROS odgrywają rolę w rozwoju niedokrwistości w przebiegu wrodzonych nieprawidłowości metabolizmu krwinek czerwonych [1, 4] oraz w procesach chorobowych, których nieodłączną cechą jest występowanie odczynu zapalnego: infekcyjnych, a także chorób o podłożu autoimmunologicznym. Ważnym elementem chorób o podłożu autoimmunologicznym, a także onkogenezy jest powstawanie oksydacyjnie zmodyfikowanego DNA, które może indukować skierowaną przeciw sobie odpowiedź odpornościową [7].

Rodniki tlenowe są zaangażowane w reakcje skurczowe mięśniówki gładkiej oskrzeli w przebiegu astmy i zapalenia oskrzeli z odczynem spastycznym, w rozdmie płuc i przewlekłej obturacyjnej chorobie płuc, w zespole błon szklistych i w mukowiscydozie [1, 4]. Zakres czynników środowiskowych zawartych w wodzie, powietrzu, pokarmach, zdolnych do wywoływania patologicznych reakcji wolnorodnikowych wydaje się w praktyce niemal nieograniczony. Oparzenia, choroba popromienna i wywołane promieniowaniem jonizującym mutacje genowe sprzyjające kancerogenezie i teratogenezie są przykładami zaburzeń wywoływanych czynnikami fizycznymi z udziałem rodników tlenowych [1].

Doświadczenia *in vitro* wskazują, że ROS mogą inicjować cykl komórkowy lub aktywować jego promotory, stymulować ekspresję protoonkogenów, takich jak: c-myc, c-fos, H-ras, mogą też bezpośrednio uszkadzać DNA [8]. Badania kliniczne ujawniły zwiększenie markerów stresu oksydacyjnego, m. in.: metabolitów oksydacyjnego uszkodzenia DNA, produktów utleniania lipidów i prostaglandyn, metalotioneiny, obniżenie stężenia grup tiolowych w białkach u pacjentów z rozpoznaną chorobą nowotworową [9]. Dlatego ROS są uznawane za podstawowy czynnik rozwoju nowotworów.

Zgodnie z ogólnie akceptowaną wolnorodnikową teorią starzenia, starzenie jest pochodną akumulacji w orga-

nizmie cząsteczek uszkodzonych przez ROS. Istotnym argumentem przemawiającym za udziałem ROS w procesach starzenia było ujawnienie, że z wiekiem wzrasta stężenie tkankowe i osocze produktów utleniania: lipidów, kwasów nukleinowych, białek, cukrów i steroidów.

ROS są postrzegane jako kluczowy czynnik zaburzeń czynnościowych i strukturalnych wywołanych niedokrwieniem narządów. Podczas niedokrwienia przemiany metaboliczne zostają w znacznej mierze przekierowane na tory beztlenowe, a wytwarzanie i zasoby ATP ulegają dramatycznej redukcji. Po nagłym przywróceniu prawidłowego ukrwienia narządu (reperfuzja) dochodzi do zwiększonej generacji rodników tlenowych, co sprzyja wielokierunkowej destrukcji. Podstawową przyczyną wystąpienia oksydacyjnych zaburzeń w trakcie reperfuzji jest przesterowanie przemian wewnątrzkomórkowych podczas ischemii [10]. Przywrócenie podaży tlenu do mitochondriów, w których kluczowe składniki łańcucha oddechowego są niemal całkowicie zredukowane w następstwie ischemii, jest wzorcowym podłożem do niepełnej redukcji tlenu i generowania w nadmiarze jego reaktywnych postaci.

Udział ROS w dysfunkcji serca

Od niemal 30 lat ROS uważane są za czynnik patogenetyczny zaburzeń czynności serca wywołanych niedokrwieniem oraz w rozwoju zastoinowej niewydolności krążenia, co potwierdził w 2000 r. Ide i wsp., dokonując bezpośrednich pomiarów zwiększonej generacji rodnika hydroksylowego w niewydolnym sercu [11]. Niedawno wykazano, że do zwiększonej generacji wolnych rodników tlenowych dochodzi podczas zawału mięśnia sercowego oraz w rozwoju kardiomiopatii [12-14]. Badania ostatniej dekady wskazują, że ROS mogą indukować zaburzenia rytmu serca [13, 15] oraz że do wzmożonego wytwarzania ROS dochodzi podczas zabiegów kardiologicznych [16]. Reakcje wolnorodnikowe wydają się odgrywać kluczową rolę w reakcjach odrzutu po transplantacji serca [17].

Mechanizmy antyoksydacyjne zabezpieczające przed skutkami nadmiernego utleniania

Organizmy posiadają wielowarstwowe i uzupełniające się systemy zabezpieczające przed nadmiernym utlenianiem, określane mianem mechanizmów obrony antyoksydacyjnej. W ochronie przed nadmiernym utlenianiem istotną rolę odgrywają antyoksydanty (polski termin *przeciwutleniacz* nie jest powszechnie stosowany) – substancje, które w sposób bezpośredni reagują z czynnikami utleniającymi, np. z jonami żelaza Fe²⁺ lub z pośrednimi produktami utleniania, jakimi są rodniki tleno-

we. Przez to ograniczają lub całkowicie uniemożliwiają utlenianie innych molekuł. Niektórzy zaliczają do antyoksydantów również enzymy rozkładające ROS, ale rozszerzenie pojęcia: *antyoksydant* o związki o właściwościach katalitycznych nie zostało powszechnie zaakceptowane [1]. Antyoksydanty, które reagują z rodnikami tlenowymi, prowadząc do ich eliminacji, określa się jako wymiatacze ROS. Wśród czynników obrony antyoksydacyjnej istotną rolę odgrywają substancje drobnocząsteczkowe, m. in. glutation, kwas askorbinowy, cysteina, kwas moczowy, kreatynina, melatonina, tokoferole, w tym witamina E (α -tokoferol), karotenoidy (w tym witamina A), zredukowane postaci koenzymu Q (ubihydrochinon) i kwasu liponowego (tiooktanowego). Grupę związków drobnocząsteczkowych uzupełniają czynniki wchłaniane z diety, takie jak np. antocyjaniny, flawonoidy, kwas fitynowy, karotenoidy (zwłaszcza β -karoten), ksantofile. Wśród związków wielkocząsteczkowych zasadniczą rolę w protekcji antyoksydacyjnej odgrywają białka. Białka spełniają funkcję antyoksydacyjną z jednej strony przez wiązanie jonów metali przejściowych, w tym w szczególności jonów żelaza (Fe^{2+}), co usuwa substrat reakcji Fentona prowadzącej do powstawania niezwykle reaktywnego rodnika hydroksylowego, z drugiej zaś przez enzymatyczne i nieenzymatyczne reakcje z ROS prowadzące do ich eliminacji. Dysmutaza nadadtlenkowa (SOD) usuwa ze swojego otoczenia anionorodnik nadadtlenkowy. Nadtlenek wodoru jest redukowany do wody przez katalazę i peroksydazy, w tym peroksydazę glutationu i peroksydazę cytochromu c.

Z czynnościowego punktu widzenia mechanizmy obrony antyoksydacyjnej można podzielić na trzy grupy: 1) prewencyjne, których istotą jest niedopuszczenie do reakcji ROS ze związkami biologicznie czynnymi, 2) interwencyjne, w wyniku których dochodzi do terminacji (przerwania) niepożądanych reakcji utleniania, w tym łańcuchowych reakcji wolnorodnikowych oraz 3) eliminujące i naprawcze, polegające na usuwaniu niepożądanych skutków reakcji wolnorodnikowych.

Korzystny wpływ antyoksydantów w zaburzeniach metabolicznych i chorobach przypisywanych szkodliwemu działaniu ROS

Badania doświadczalne wskazują na korzystny wpływ antyoksydantów w modelowych układach stresu oksydacyjnego i w zaburzeniach metabolicznych związanych z ROS. Opisano m.in. ochronny wpływ N-acetylocysteiny na komórki wątrobowe poddane toksycznemu działaniu ksenobiotyków [1], neuroprotekcyjne działanie kwasu moczowego i kwasu liponowego [18, 19], hamowanie utleniania lipoproteidów frakcji LDL (witamina C), hamowanie przez witaminy C i E oraz flawonoidy rozwoju miażdżycy [20], zmniejszenie wykładników stresu

oksydacyjnego w przebiegu nadciśnienia tętniczego i cukrzycy (kwas liponowy) [21], protekcyjne działanie antyoksydantów w uszkodzeniu siatkówki oka wywołanym cukrzycą (kwas liponowy, tauryna) [19], protekcyjny wpływ na serce w warunkach ischemii i reperuzji (melatonina, tempol) [22, 23], zapobieganie agregacji i adhezji leukocytów związanej z dysfunkcją śródbłonna (witamina C) [1]. Badania kliniczne ujawniły, że podawanie antyoksydantów: witaminy C i tauryny, poprawia czynność śródbłonna w grupie palaczy tytoniu z udokumentowaną angiograficznie chorobą wieńcową lub dysfunkcją śródbłonna [24]. Istotną rolę antyoksydantów w prewencji zgonów sercowo-naczyniowych sugerowały badania epidemiologiczne, w których udokumentowano, że niskie stężenia antyoksydantów w osoczu: witamin C, E i A, korelują ze wzrostem ryzyka chorób sercowo-naczyniowych i ogólnej śmiertelności [25]. Na zmniejszenie ryzyka wystąpienia miażdżycy i choroby niedokrwiennej serca w wyniku stosowania witamin A, E i C oraz β -karotenu wskazywały pierwsze duże próby kliniczne: Western Electric Study przeprowadzone na 1556 ludziach w średnim wieku, NHANES I z udziałem 11 348 dorosłych ochotników w wieku od 25 do 74 lat, ARIC wykonane na 6318 kobietach i 4989 mężczyznach w wieku od 45 do 64 lat oraz badanie ankietowe zrealizowane w ramach *The US Nurses' Health Study*, w którym uczestniczyło prawie 87 000 ochotników przyjmujących preparaty witaminy E [26–28].

Nieoczekiwane wyniki wieloośrodkowych prób klinicznych, podważające korzyści z prewencyjnego stosowania wybranych czynników o uznanym działaniu antyoksydacyjnym

Optymistyczne wnioski uzyskane w modelowych układach doświadczalnych i w pierwszych próbach klinicznych przyczyniły się do wdrożenia wieloośrodkowych programów badawczych ukierunkowanych na obiektywną ocenę korzyści stosowania antyoksydantów w prewencji pierwotnej i wtórnej chorób sercowo-naczyniowych w oparciu o prospektywne, randomizowane próby kliniczne. Wyniki większości podjętych prób okazały się zaskakujące, podważając mozolnie budowaną koncepcję o jedynie korzystnym profilu działania antyoksydantów. Badanie *Iowa Women's Health Study*, opublikowane w 1996 r. ujawniło, że wśród 34 387 kobiet po menopauzie systematycznie przyjmujących kwas askorbinowy (500 mg/dobę) lub/i α -tokoferol (10 000 jedn./dobę) niezamiennie zwiększyło się ryzyko wystąpienia raka piersi [29]. W ostatnim raporcie *Iowa Women's Health Study* opublikowanym w lipcu 2005 r. nie wykazano istotnego wpływu tej witaminy na śmiertelność ogólną i na śmiertelność z powodu chorób nowotworowych w populacji 39 876 kobiet w wieku powyżej 45. roku życia, któ-

re przyjmowały 600 jedn. witaminy E pochodzenia naturalnego [30]. Częstość występowania groźnych incydentów sercowo-naczyniowych odpowiadała częstości w grupie referencyjnej. Stwierdzono co prawda zmniejszenie o 24% ($P=0,03$) śmiertelności z przyczyn sercowo-naczyniowych, ale w końcowych wnioskach z *Iowa Women's Health Study* autorzy podkreślają, że nie ma przekonujących dowodów dla rekomendowania długotrwałego podawania witaminy E w diecie u kobiet po menopauzie. Niepokojące wnioski przyniosła metaanaliza opublikowana w styczniu 2005 r., po zsumowaniu wyników 19 dużych prób klinicznych, w których uczestniczyło 135 967 pacjentów. Wykazano, że śmiertelność ogólna była o 3,9% ($P=0,035$) większa w grupie długotrwałe przyjmującej duże dawki witaminy E (>400 mg/dobę) w porównaniu do populacji referencyjnej i że niekorzystny efekt witaminy E zaznacza się po przekroczeniu dawki 150 mg/dobę. W badaniu *CARET* obejmującym 18 314 palaczy tytoniu i pracowników ekspozowanych na azbest, w którym testowano wpływ β -karotenu (30 mg/dobę) i retinolu (25 000 jedn./dobę) na prewencję pierwotną chorób sercowo-naczyniowych, wykazano istotne zwiększenie ryzyka zgonu z przyczyn sercowo-naczyniowych i raka płuc w grupach przyjmujących antyoksydanty [31]. Z kolei wśród 27 271 zdrowych palaczy tytoniu w przedziale wiekowym 50–69 lat, uczestniczących w fińskim badaniu *ATBC* i przyjmujących witaminę E (50 mg/dobę), β -karoten (20 mg/dobę) lub oba czynniki przez średnio 6 lat, stwierdzono zmniejszenie o 4% częstości występowania pierwotnych incydentów wieńcowych i o 8% śmiertelności z powodu niewydolności wieńcowej w grupie przyjmującej witaminę E, natomiast suplementacja β -karotenem nie miała istotnego znaczenia [32]. Z kolei w grupie 1 862 palaczy tytoniu w tym samym przedziale wiekowym, z zawałem serca w wywiadzie, wykazano, że przyjmowanie witaminy E i β -karotenu nie miało znaczenia we wtórnej prewencji ostrych incydentów wieńcowych, natomiast przyczyniało się do zwiększenia śmiertelności w następstwie nagłych incydentów sercowych [33]. Analogicznie, włoskie badanie *GISSI-P* z udziałem 11 324 chorych po zawałe serca wskazywało na brak korzyści ze stosowania α -tokoferolu w dawce 300 mg/dobę we wtórnej prewencji zawału serca i śmierci z przyczyn sercowo-naczyniowych [34]. W badaniu *CHAOS* prowadzonym na 2 002 pacjentach z angiograficznie udokumentowaną chorobą wieńcową ujawniono co prawda istotne statystycznie zmniejszenie ryzyka zawału serca podczas przewlekłego (średnio 510 dni) stosowania α -tokoferolu (800 jedn./dobę), ale jednocześnie wykazano niezamienny wzrost ryzyka zgonów z przyczyn sercowo-naczyniowych w tej grupie [35]. Wnioski z kolejnych prób klinicznych: *HPS* (20 356 pacjentów) i *HOPE* (9 541 pacjentów) dotyczących wpływu antyoksydantów na

pierwotną i wtórną prewencję incydentów sercowo-naczyniowych wskazują na brak istotnego wpływu stosowania antyoksydantów na ryzyko wystąpienia choroby sercowo-naczyniowej lub zgonu z powodu choroby sercowo-naczyniowej [36, 37].

Opublikowane w 2003 i 2004 r. trzy ogromne metaanalizy oparte na wieloośrodkowych próbach klinicznych z randomizacją nie tylko nie rozwiały wątpliwości związanych ze stosowaniem antyoksydantów, ale jeszcze je pogłębiły. Z zestawienia opracowanego przez zespół badaczy z Uniwersytetu w Sydney, na podstawie wcześniej opublikowanych wyników 7 wieloośrodkowych prób klinicznych, dotyczących wpływu flawonoidów zawartych w diecie na prewencję incydentów wieńcowych wynika, że wysokie spożycie flawonoidów jest związane ze zmniejszonym ryzykiem zgonu z powodu incydentu sercowo-naczyniowego [38]. Z kolei w analizie statystycznej opracowanej w 2003 r. pod egidą zespołu z Cleveland (USA) [39] wykorzystano dane pochodzące z 7 randomizowanych prób klinicznych dotyczących suplementacji witaminą E stosowaną w dawce dobowej od 50 do 800 jedn. u 81 788 pacjentów oraz z 8 prób klinicznych, których uczestnicy otrzymywali β -karoten w dawce dobowej od 15 do 50 mg. Czas suplementacji wybranymi antyoksydantami wynosił od 16 mies. do 12 lat. U pacjentów, którzy przyjmowali β -karoten, stwierdzono nieznaczne, ale statystycznie istotne (o 0,4%; $P=0,003$) zwiększenie śmiertelności ogólnej i śmiertelności spowodowanej przyczynami sercowo-naczyniowymi (o 0,3%; $P=0,003$). Witamina E nie miała znaczącego wpływu na śmiertelność ogólną (wzrost o 0,2%; $P=0,42$), śmiertelność z przyczyn sercowo-naczyniowych ($P=0,86$) i z powodu udarów mózgu (wzrost o 0,1%; $P=0,31$). Brak wpływu podawania witaminy E i karotenoidów w prewencji incydentów wieńcowych oraz na ryzyko zgonu z przyczyn sercowo-naczyniowych potwierdził raport opublikowany przez grupę badaczy z Uniwersytetu w Helsinkach w grudniu 2004 r. [40]. Na metaanalizę składały dane uzyskane z 9 wieloośrodkowych prób klinicznych, których celem była ocena skuteczności witamin C i E oraz karotenoidów w prewencji choroby wieńcowej i ryzyka incydentów wieńcowych. Przy dziesięcioletnim okresie obserwacji w badaniach wzięły udział 293 172 osoby, które przewlekłe przyjmowały wybrane antyoksydanty. Zachęcające wyniki: istotne zmniejszenie częstości poważnych incydentów sercowych, uzyskano w grupie pacjentów, która systematycznie przyjmowała witaminę C, szczególnie w stosunkowo dużych dawkach dobowych, przekraczających 700 mg.

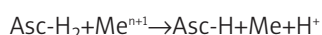
Rozbieżności między pożądanymi efektami przyjmowania antyoksydantów, opisywanymi w licznych pracach doświadczalnych i początkowych doniesieniach klinicznych a brakiem istotnych korzyści ujawnionym przez ba-

dania epidemiologiczne przeprowadzone na dużych populacjach, w których przewlekłe stosowano wybrane antyoksydanty, nadal wzbudzają ogromne zakłopotanie środowiska naukowego i skłaniają do podejmowania nowych poszukiwań. Niepowodzenia suplementacji antyoksydantami kontrastują z wnioskami z badań epidemiologicznych, w których wykazano ewidentne korzyści ze stosowania diety bogatej w warzywa i owoce i przez to zawierającej duży ładunek antyoksydantów.

Wątpliwości dotyczące założeń wstępnych i metodyki badań

Niektórzy badacze podważają metodykę opublikowanych metaanaliz, zaznaczając, że w różnych próbach klinicznych składających się na poszczególne zestawienia uczestniczyły odmienne subpopulacje, różniące się od siebie wiekiem i nawykami dietetycznymi oraz że stosowano różne dawki antyoksydantów przy nieporównywalnym okresie obserwacji. Słabą stroną tych zastrzeżeń jest fakt, że jedynie w niewielu perfekcyjnie wystandaryzowanych badaniach, obejmujących wyselekcjonowanych pacjentów, udało się wykazać istotny wpływ stosowania antyoksydantów na ryzyko zgonu i występowanie ostrych incydentów wieńcowych.

Pomijanym aspektem działania wielu czynników uznawanych za antyoksydanty, w tym kwasu askorbinowego i tokoferolu, są ich właściwości prooksydacyjne, które ujawniają się w odpowiednim przedziale stężeń, zależnie od otaczającego środowiska, a zwłaszcza w obecności jonów metali przejściowych [1]. W reakcjach zachodzących przy udziale witaminy C (Asc) i tokoferolu powstają ich postaci utlenione, kwas dehydroaskorbinowy (DHA) z rodnikiem askorbylowym (Asc[•]) jako pośrednim produktem reakcji. Utlenioną postacią tokoferolu jest rodnik tokoferylowy (Toc[•]), zaś utlenionymi postaciami karotenoidów są stosunkowo reaktywne rodniki, które łatwo prowadzą do powstawania nadtlenków lipidów i tworzenia adduktów karotenowych z udziałem kilku rodników nadtlenkowych, posiadające niesparowane elektrony zaabsorbowane przez atomy węgla. DHA wykazuje działanie biologiczne jako utleniacz, inaktywując białka zawierające grupy tiolowe, przez co może hamować syntezę ATP i mechanizmy transportu przez błonę, m. in. glukozy, wywoływać hemolizę erytrocytów i nekrozę komórek β wysp Langerhansa trzustki. Askorbinian (Asc) może redukować jony metali przejściowych według schematu:



gdzie przy dostępności jonów żelaza, jony Fe³⁺ są redukowane do Fe²⁺. Z kolei jony Fe²⁺ inicjują w obecności nadtlenków, m. in. nadtlenku wodoru i nadtlenków lipi-

dów, reakcję Fentona, prowadzącą do powstania jednego z najsilniejszych znanych utleniaczy – rodnika hydroksylowego. Układ Asc + jony żelaza jest standardowym zestawem do inicjowania peroksydacji lipidów.

Należy podkreślić, że większość spożywanych produktów roślinnych zawiera obok bogatego arsenału antyoksydantów liczne włókna i kwasy organiczne, takie jak np. kwas fitynowy, kwas winowy, kwas szczawowy, które skutecznie wiążą jony żelaza, eliminując substrat reakcji generującej rodniki tlenowe przy udziale antyoksydantu. Środowisko zasadowe charakterystyczne dla wielu roślinnych składników diety nie sprzyja przetrwaniu większości utlenionych postaci popularnych antyoksydantów. Antyoksydanty stosowane w postaci preparatów farmakologicznych mogą łatwiej ujawniać właściwości prooksydacyjne niż ich odpowiedniki zawarte w diecie, gdyż nie towarzyszą im kofaktory (np. o właściwościach chelatujących jony żelaza) zawarte w pokarmach roślinnych.

Odrębnym zagadnieniem, które nie zostało uwzględnione w próbach klinicznych, jest fakt, że antyoksydanty tworzą *in vivo* hierarchiczny, złożony układ wzajemnych powiązań, dostosowany do lokalnych potrzeb metabolicznych, który zapewnia utrzymanie względnej równowagi między utlenionymi i zredukowanymi postaciami antyoksydantów, w tym ich rodnikami. Żeby antyoksydant mógł spełniać swoją rolę, musi być zapewniona recyrkulacja pomiędzy jego postacią utlenioną i zredukowaną, tak aby była zapewniona możliwość oddawania elektronów przy spotkaniu cząsteczki antyoksydanta z ROS. Recykling zapewniają z jednej strony białka enzymatyczne, jak np. reduktaza kwasu askorbinowego i reduktaza rodnika tokoferylowego, z drugiej jest zależny od mechanizmów sprzęgających ich przemiany. Przykładowo redukcję rodnika tokoferylowego zapewnia wewnątrz komórki jego reakcja z glutationem (GSH), zaś w płynie zewnątrzkomórkowym i częściowo wewnątrz komórki reakcja w kwasem askorbinowym (Rycina 1.). Hipotetycznie, nagłe zwiększenie stężenia jednego ze składników tej układanki, np. wskutek izolowanej suplementacji jednego z antyoksydantów, może paradoksalnie zwiększyć stężenie rodników tlenowych – pochodnych innego antyoksydantu i w efekcie może promować reakcje utleniania.

Dysproporcja między kinetyką powstawania ROS i kinetyką reakcji zachodzących z ich udziałem a szybkością eliminowania ROS przez antyoksydanty

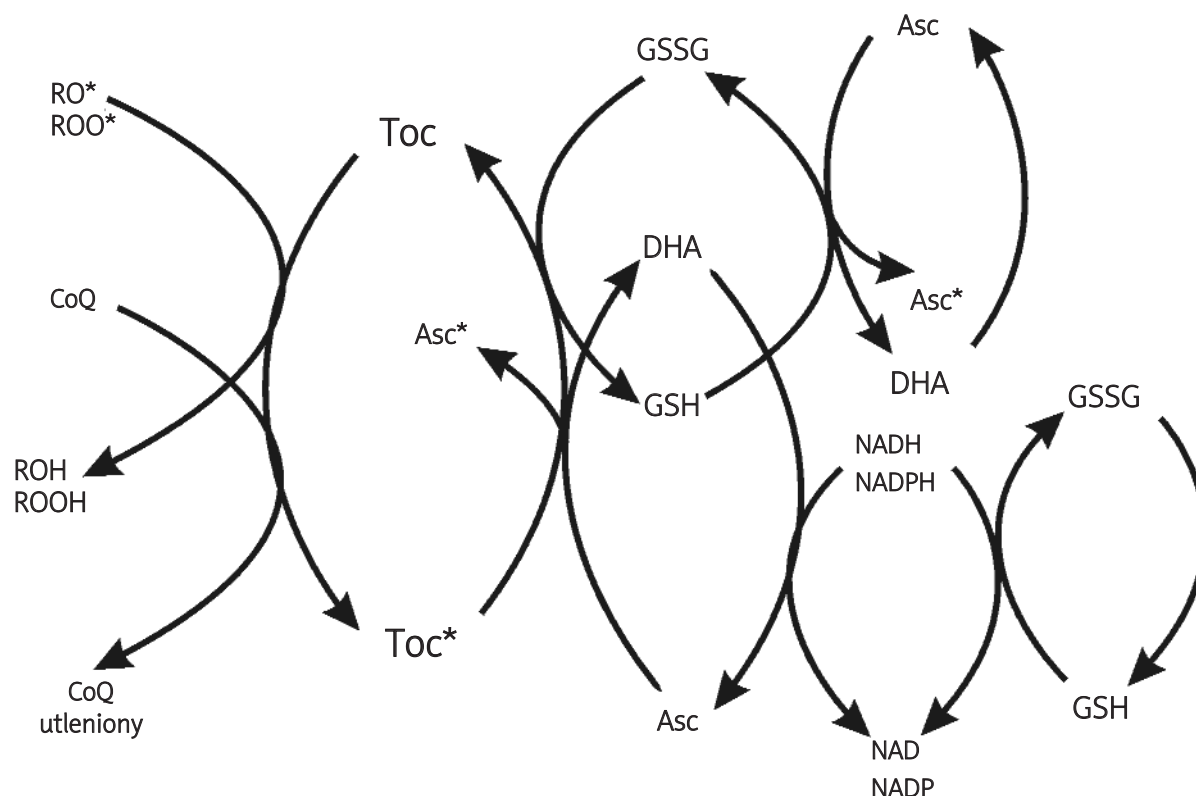
Podstawowym problemem w badaniach dotyczących antyoksydantów jest kinetyka reakcji z ich udziałem, która jest o wiele rzędów wielkości wolniejsza od

szybkości powstawania podstawowych ROS: anionorodnika ponadtlenkowego, rodnika hydroksylogowego nadtlendioazotyru i rodników lipidowych [1]. Ogromna reaktywność i niespecyficzność działania takich rodników tlenowych, jak np. rodnik hydroksylogowy, sprawia z jednej strony, że czas ich istnienia od chwili powstania jest niezwykle krótki, z drugiej zaś, że mogą one reagować niemal z każdą cząsteczką, którą napotkają na drodze. Dla rodnika hydroksylogowego głównym czynnikiem ograniczającym możliwości jego działania jest tzw. bariera dyfuzyjna, czyli dystans, który cząsteczka rodnika może przebyć od momentu powstania do jej destrukcji w wyniku reakcji z najbliższą napotkaną molekułą. Oznacza to, że antyoksydant niejako przeznaczony do unicestwienia utleniacza ma stosunkowo niewielkie szanse, aby w sposób preferencyjny uprzeczyć reakcje zachodzące z udziałem rodnika i zapobiec ewentualnym uszkodzeniom powstałym przy jego udziale. Szybkość reakcji dysmutacji nadtlenu wodoru prowadzącej do powstania anionorodnika ponadtlenkowego, reakcji anionorodnika ponadtlenkowego z tlenkiem azotu (NO) generującej nadtlendioazotyn,

a także wielu innych reakcji prowadzących do powstawania rodników tlenowych jest o kilka rzędów wielkości większa od kinetyki reakcji anionorodnika ponadtlenkowego i innych rodników z większością egzogennych antyoksydantów [1]. Czy zatem można przyjąć, że antyoksydanty nie mają szansy przeciwdziałania nadmiernym procesom endogennego utleniania? Wdrożone ostatnio metody fizykochemiczne pozwalające na detekcję rodników tlenowych i ich bezpośrednich produktów w chwili ich powstawania jednoznacznie wskazują, że tak nie jest. Badania doświadczalne bezpośrednio wskazują, że antyoksydanty mogą ograniczać endogenne procesy utleniania [11].

Skuteczność antyoksydantów a stres oksydacyjny

Pomiędzy całkowitą destrukcją zależną hipotetycznie od niepoahamowanego utleniania a śmiercią wynikającą z braku oksydantów, co w praktyce oznacza brak tlenu, rozciąga się przestrzeń zjawisk, w której ROS uczestniczą w przemianach fizjologicznych. Gdyby antyoksydanty były w stu procentach skuteczne, to zgi-



Rycina 1. Schemat powiązań czynnościowych umożliwiających utlenianie i regenerację witaminy E

Gwiazdkę oznaczono rodniki poszczególnych antyoksydantów. Toc – tokoferol, Asc – kwas askorbinowy, DHA – kwas dehydroaskorbinowy, GSH – glutation, RO*, ROO* – rodniki tlenków i nadtlendioazotyru

nęlibyśmy natychmiast. ROS i mechanizmy ochrony przed nimi tworzą delikatną równowagę dynamiczną na każdym poziomie żywego organizmu, która dostosowuje się do zmieniających się warunków otoczenia. Naruszenie tej równowagi, z przewagą ROS prowadzącą do potencjalnych uszkodzeń, jest określane jako stres oksydacyjny. Można przyjąć, że wieloosrodkowe badania epidemiologiczne, obejmujące bardzo duże populacje, składały się w większości z osobników względnie zdrowych, gdzie istniały warunki do zbilansowania endogennych reakcji utleniania i redukcji, czyli gdzie nie występowało zjawisko stresu oksydacyjnego w skali ogólnoustrojowej. Dlatego nie należało oczekiwać, że uzupełnienie antyoksydantów przyniesie wymierny efekt, gdyż kinetyka reakcji z udziałem antyoksydantów jest zbyt mała, aby spowodować zakłócenie sprawnie funkcjonujących mechanizmów kompensacyjnych.

Czy zatem można przyjąć, że ROS nie mają istotnego znaczenia w patogenezie wielu chorób? Zaprzeczają temu badania ostatnich lat przy wykorzystaniu metod bezpośredniej detekcji ROS. Przy użyciu tych metod udowodniono zwiększoną generację anionorodnika ponadtlenkowego i rodnika hydroksylowego w niewydolnym sercu [11].

Na korzystne efekty suplementacji antyoksydantami wskazywały głównie prace, w których w materiale badawczym były spełnione warunki do zaistnienia stresu oksydacyjnego. Dotyczy to zwłaszcza efektów antyoksydantów obserwowanych w patologicznie lub celowo zmienionych tkankach i komórkach, w izolowanych układach subkomórkowych, a także wyselekcjonowanych grupach chorych, np. w niewydolności wieńcowej, niewydolności krążenia, po udarach mózgu i urazach ośrodkowego układu nerwowego.

Antyoksydanty jako czynniki przeciwdziałające fizjologicznym efektom ROS

Praktycznie niemal każda cząsteczka organiczna: narząd, tkanka, komórka lub jej fragmenty stoją przed wyzwaniem ataku wolnorodnikowego. Z drugiej strony, gdyby rodniki tlenowe były aż tak niebezpieczne, to z pewnością w procesie ewolucji udałoby się ich unikać. W rzeczywistości są one wykorzystywane w procesach życiowych i są nieodzownym warunkiem życia. Zdecydowana większość opublikowanych prac naukowych dotyczących antyoksydantów pomija aspekt regulacyjny działania antyoksydantów, chociaż dane doświadczalne wskazują na kluczowe znaczenie ROS w systemach regulacji ogólnoustrojowej, tkankowej i komórkowej.

ROS uczestniczą w obrocie komórkowym białek, przyczyniając się do eliminacji uszkodzonych uprzednio

molekuł lub ich fragmentów, co z kolei umożliwia ich reparację lub zastąpienie przez nowe białka [1]. Istnieją liczne przesłanki wskazujące, że ROS pełnią funkcję przekaźników, które decydują o przemianach metabolicznych komórki, jej różnicowaniu i dojrzewaniu, adaptacji komórki do zmian środowiska zewnętrznego, a także przeżyciu. ROS wpływają na dyfuzję i transport przez błony oraz na aktywację szlaków przekaźniczo-wewnątrzkomórkowego [1]. Intrygującym zjawiskiem jest zachodząca przy udziale ROS zmiana konformacji przestrzennej receptorów błonowych, gdyż zjawisko to w praktyce oznacza, że receptor może pełnić nie tylko funkcję sensora w stosunku do swojego liganda, ale także może pełnić dodatkowo funkcję czujnika wewnątrzkomórkowej równowagi redoks. W takim układzie odpowiedź komórkowa inicjowana przez pobudzenie określonej puli receptorów błonowych ma charakter zintegrowany, zależny od obecności liganda i od chwilowego statusu metabolicznego komórki [41]. Wiele ligandów, np. angiotensyna II, uruchamia reakcje generujące ROS w komórce [42]. Przyczynia się to do utleniania wewnątrzkomórkowych przekaźników, np. grup SH kinaz białkowych, jak również do zwiększonej fosforylacji reszt tyrozynowych białek. Taki profil działania sprzyja samoograniczeniu odpowiedzi wywołanej pobudzeniem

Tabela I. Procesy ustrojowe, w których uczestniczą ROS

1. Regulacja czynnościowa na poziomie subkomórkowym, komórkowym i tkankowym umożliwiająca dostosowanie przemian metabolicznych do zmian środowiska zewnętrznego
2. Regulacja przemian energetycznych, w tym dostępności substratów energetycznych i tlenu
3. Przekazywanie sygnałów metabolicznych
4. Odruchowa regulacja krążenia przy udziale mechanizmów chemodetekcji tlenu
5. Miogenna regulacja dopływu krwi do tkanek
6. Mechanizmy termoregulacji związane z redystrybucją krwi i z indukcją termogenezy bezdrżeniowej
7. Adhezja i agregacja płytek krwi do śródbłonna naczyniowego
8. Protekcja przed inwazją patogenów i ich eliminacja. Realizacja funkcji cytotoksycznych przez makrofagi i komórki mikrogleju
9. Zapłodnienie i rozmnażanie
10. Synteza niezbędnych czynników endogennych, np. tyroksyny, prostaglandyn, leukotrienów, protrobiny
11. Reakcje kataboliczne, w tym w przemiany metaboliczne kseniobiotyków
12. Indukowanie zjawiska przerostu, proliferacji oraz apoptozy, umożliwiających dostosowanie tkanek i narządów do wieku i zmiany warunków funkcjonowania, np. serca w nadciśnieniu tętniczym, podczas ischemii i reperfuzji, w niewydolności krążenia

danych receptorów. W Tabeli I przedstawiono skrótowo kierunki fizjologicznych działań ROS w układach biologicznych. Skuteczne ograniczenie którejkolwiek z wymienionych funkcji przez antyoksydanty powinno w założeniu prowadzić do istotnych zaburzeń funkcji organizmu w skali ogólnoustrojowej. Stąd też nie należy oczekiwać, że podawanie antyoksydantów o wysokim współczynniku biodostępności, które mogą potencjalnie zakłócać szereg procesów życiowych, przyniesie wymierne korzyści w prewencji pierwotnej i wtórnej choroby wieńcowej, incydentów sercowo-naczyniowych i że zmniejszy ryzyko zgonu. Znacznie większą szansę korzystnego działania wydają się mieć antyoksydanty o działaniu lokalnym, wiążące się ze swoistymi ligandami o wysokiej specyficzności działania.

Hipotetyczny wpływ antyoksydantów na regulację krążenia

Jednym z podstawowych ogniw w łańcuchu powiązań czynnościowych regulujących układ krążenia są odruchy z chemoreceptorów tętnicznych i chemodetektorów OUN. Przyjmuje się, że hipoksja powoduje pobudzenie przede wszystkim chemoreceptorów obwodowych, zaś hiperkapnia – ośrodkowych. Niedotlenienie mózgu może niezależnie inicjować pobudzenie układu krążenia. Niedawne badania ujawniły, że kluczowym elementem aktywacji chemoreceptorów obwodowych są ROS, które powstają w wyniku niepełnej redukcji jego podstawowej formy O₂. Stąd sugestia, że możliwość wyłączenia ROS poprzez zastosowanie skutecznych antyoksydantów może spowodować przesunięcie równowagi regulacyjnej w sposób charakterystyczny dla niedoboru tlenu. Zmniejszone oddziaływanie ROS na chemoreceptory może hipotetycznie spowodować zwiększenie ich aktywności w sposób odpowiadający hipoksji, czyli powodujący wzrost aktywności układu współczulnego i spadek aktywności układu przywspółczulnego. Wiadomo, że zwiększenie udziału komponenty współczulnej regulacji rytmu serca jest niezależnym czynnikiem wystąpienia nagłego incydentu sercowego i wiąże się ze zwiększonym ryzykiem nagłego zgonu. Ujawnienie dyskretnych przesunięć w autonomicznej regulacji serca umożliwia analiza zmienności rytmu serca (HRV), która dotychczas nie była wykorzystywana w znaczącym stopniu w ocenie działania antyoksydantów. Nadal nie rozstrzygnięto, dlaczego w grupie pacjentów przyjmującej witaminę E w ramach badania CHAOS istotne zmniejszenie ryzyka zawału mięśnia sercowego wiązało się z aż 18% wzrostem ryzyka nagłego zgonu [35]. Można spekulatywnie założyć, że zwiększona śmiertelność mogła być pochodną zwiększonej aktywności dosercowych włókien współczul-

nych, co mogło inicjować krytyczne zaburzenia rytmu serca. Niekorzystny wpływ relatywnie dużych dawek kwasu askorbinowego oraz troluksu, rozpuszczalnego w wodzie analogu witaminy E, na wykładniki HRV odzwierciedlające autonomiczną regulację rytmu serca, został ostatnio potwierdzony w badaniach doświadczalnych wykonanych na szczurach [43].

Zaburzenia czynnościowe i strukturalne wywołane przez nadmierne reakcje utleniania są podstawowym zagrożeniem dla żywego ustroju indukowanym przez czynniki zewnętrzne. Środowisko zewnętrzne komórki i organizmu nierzadko szybko się zmienia. Warunkiem przetrwania w niestabilnym otoczeniu jest wytworzenie i sprawne uruchamianie mechanizmów przystosowawczych, które pozwalają zachować integralność środowiska wewnętrznego. Zarówno organizmy wyższe, jak też niższe wykształciły w odpowiedzi na stres oksydacyjny szereg mechanizmów aktywujących endogenne mechanizmy obrony antyoksydacyjnej [1, 4]. Przykładowo, intensywny wysiłek fizyczny powoduje z jednej strony uszkodzenia DNA i utlenianie lipidów i białek, z drugiej zaś pobudza mechanizmy obrony antyoksydacyjnej, w tym wzrost aktywności SOD, katalazy, peroksydazy glutationu, a także indukuje przebudowę mięśnia i zwiększenie ekspresji jego białek kurczliwych. Stres oksydacyjny jest warunkiem *sine qua non* poprawy wydolności fizycznej w wyniku treningu fizycznego. Zjawisko pobudzającego organizm, korzystnego działania małej ekspozycji lub małych dawek czynnika, który w dawkach większych jest ewidentnie szkodliwy, zauważył już Hipokrates, a w czasach nowożytnych Paracelsus, i zostało ono nazwane hormezą, co w tłumaczeniu z greki oznacza *wprowadzić w ruch*. Istnieją liczne przesłanki, że ROS są nieodzownym elementem hormezy. Rattan wykazał, że powtarzana ekspozycja na czynnik wywołujący łagodny stres oksydacyjny opóźnia starzenie, stymuluje proteasomy, co przyczynia się do przyspieszonego usuwania oksydacyjnie uszkodzonych białek komórkowych, zmniejsza wrażliwość izolowanych komórek na destrukcyjne działanie etanolu i nadtlenu wodoru oraz aktywuje enzymatyczne mechanizmy antyoksydacyjne [44]. Analogicznie, powtarzane epizody krótkotrwałego niedokrwienia, znane jako *hartowanie przez niedokrwienie (ischemic preconditioning)* w znacznym stopniu ograniczają uszkodzenia serca wywołane późniejszym ciężkim niedokrwieniem [45, 46], a nadtlenek wodoru i rodniki tlenowe uruchamiają komórkową odpowiedź adaptacyjną [45, 47, 48]. W tym kontekście nieumiejętne zastosowanie antyoksydantów działających ogólnoustrojowo może zasadniczo utrudnić dostosowanie organizmu do zmienionych warunków funkcjonowania. Hipotetycznie można przyjąć, że wysoka podaż antyoksydantów może przynosić korzyści w ograniczonym czasie, kiedy warun-

ki środowiska zewnętrznego są ustabilizowane. W dłuższym okresie zewnętrzne i wewnętrzne warunki funkcjonowania organizmu zwykle ulegają zmianom, czasem gwałtownym, i wtedy przydają się zaindukowane wcześniej przez ROS mechanizmy adaptacyjne.

Uwagi końcowe

Niepowodzenia wielośrodkowych programów badawczych dotyczących zastosowania antyoksydantów w prewencji choroby wieńcowej i nagłych zgonów wyraźnie zniechęcają do rekomendowania suplementacji antyoksydantami w szerokich grupach społecznych. Zasadne wydaje się prowadzenie dalszych dobrze wystandaryzowanych badań, być może z wykorzystaniem odmiennych antyoksydantów niż dotychczas, przy włączeniu do testowanej populacji przede wszystkim osób, u których warunki stresu oksydacyjnego występują z dużym prawdopodobieństwem. Racjonalną strategią poszukiwań naukowych wydają się być dwa kierunki badań. Pierwszy dotyczyłby opracowania i wprowadzenia do praktyki antyoksydantów o specyficznym ukierunkowanym działaniu. Drugi kierunek badań odnosi się do oceny mechanizmów odruchowej regulacji rytmu serca i ciśnienia tętniczego, np. przy użyciu analizy zmienności rytmu serca (HRV) i ciśnienia tętniczego (BPV) u osób przyjmujących antyoksydanty, gdyż w ten sposób można zapewne określić subpopulację podatną na niepożądane działania antyoksydantów przejawiające się zwiększonym ryzykiem wystąpienia zaburzeń rytmu serca oraz zdefiniować konkretne przeciwwskazanie do stosowania konkretnego antyoksydanta u poszczególnych pacjentów.

Piśmiennictwo

1. Bartosz G. Druga twarz tlenu. *PWN*, Warszawa 2003.
2. Ueda S, Masutani H, Nakamura H, et al. Redox control of cell death. *Antiox Redox Signal* 2002; 4: 405-14.
3. Kannan K, Jain SK. Oxidative stress and apoptosis. *Pathophysiology* 2000; 7: 153-63.
4. Halliwell B, Gutteridge JM. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch Biochem Biophys* 1986; 246: 501-14.
5. Harrison D, Griendling KK, Landmesser U, et al. Role of oxidative stress in atherosclerosis. *Am J Cardiol* 2003; 91: 7A-11A.
6. Di Matteo V, Esposito E. Biochemical and therapeutic effects of antioxidants in the treatment of Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and amyotrophic lateral sclerosis. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 2003; 2: 95-107.
7. Cooke MS, Herbert KE, Butler PC, et al. Further evidence for a possible role of conformation in the immunogenicity and antigenicity of the oxidative DNA lesion, 8-oxo-2-deoxyguanosine. *Free Radic Res* 1998; 28: 459-69.
8. Cao C, Leng Y, Li C, et al. Functional interaction between the c-Abl and Arg protein-tyrosine kinases in the oxidative stress response. *J Biol Chem* 2003; 278: 12961-7.
9. Sgambato A, Zannoni GF, Faraglia B, et al. Decreased expression of the CDK inhibitor p27Kip1 and increased oxidative DNA damage in the multistep process of cervical carcinogenesis. *Gynecol Oncol* 2004; 92: 776-83.
10. Ferrari R, Guardigli G, Mele D, et al. Oxidative stress during myocardial ischaemia and heart failure. *Curr Pharm Des* 2004; 10: 1699-711.
11. Ide T, Tsutsui H, Kinugawa S, et al. Direct evidence for increased hydroxyl radicals originating from superoxide in the failing myocardium. *Circ Res* 2000; 86: 152-7.
12. Tsutsui H, Ide T, Hayashidani S, et al. Enhanced generation of reactive oxygen species in the limb skeletal muscles from a murine infarct model of heart failure. *Circulation* 2001; 104: 134-6.
13. Kumar D, Jugdutt BI. Apoptosis and oxidants in the heart. *J Lab Clin Med* 2003; 142: 288-97.
14. Adegate E. Molecular and cellular basis of the aetiology and management of diabetic cardiomyopathy: a short review. *Mol Cell Biochem* 2004; 261: 187-91.
15. Demiryurek AT, Cakici I, Wainwright CL, et al. Effects of free radical production and scavengers on occlusion-reperfusion induced arrhythmias. *Pharmacol Res* 1998; 38: 433-9.
16. Ochoa JJ, Vilchez MJ, Mataix J, et al. Oxidative stress in patients undergoing cardiac surgery: comparative study of revascularization and valve replacement procedures. *J Surg Res* 2003; 111: 248-54.
17. Phillips M, Boehmer JP, Cataneo RN, et al. Prediction of heart transplant rejection with a breath test for markers of oxidative stress. *Am J Cardiol* 2004; 94: 1593-4.
18. Zaidi SM, Banu N. Antioxidant potential of vitamins A, E and C in modulating oxidative stress in rat brain. *Clin Chim Acta* 2004; 340: 229-33.
19. Obrosova IG, Minchenko AG, Marinescu V, et al. Antioxidants attenuate early up regulation of retinal vascular endothelial growth factor in streptozotocin-diabetic rats. *Diabetologia* 2001; 44: 1102-10.
20. Prasad K, Kalra J. Oxygen free radicals and hypercholesterolemic atherosclerosis: effect of vitamin E. *Am Heart J* 1993; 125: 958-73.
21. Midaoui AE, Elimadi A, Wu L, et al. Lipoic acid prevents hypertension, hyperglycemia, and the increase in heart mitochondrial superoxide production. *Am J Hypertens* 2003; 16: 173-9.
22. Reiter RJ, Tan DX. Melatonin: a novel protective agent against oxidative injury of the ischemic/reperfused heart. *Cardiovasc Res* 2003; 58: 10-19.
23. Wierzbicka TH, Cherek M, Wszędybył-Winklewska Z, et al. Effect of substituted piperidine nitroxides on functional characteristics of the isolated heart challenged with ischemia. *Pol J Sport Med* 2001; 17: S44-S8.
24. Fennessy FM, Moneley DS, Wang JH, et al. Taurine and vitamin C modify monocyte and endothelial dysfunction in young smokers. *Circulation* 2003; 107: 410-15.
25. Gey KF, Moser UK, Jordan P, et al. Increased risk of cardiovascular disease at suboptimal plasma concentrations of essential antioxidants: an epidemiological update with special attention to carotene and vitamin C. *Am J Clin Nutr* 1993; 57: 787S-97S.
26. Pandey DK, Shekelle R, Selwyn BJ, et al. Dietary vitamin C and beta-carotene and risk of death in middle-aged men. The Western Electric Study. *Am J Epidemiol* 1995; 142: 1269-78.

27. Enstrom JE, Kanim LE, Klein MA. Vitamin C intake and mortality among a sample of the United States population. *Epidemiology* 1992; 3: 194-202.
28. Kritchevsky SB, Shimakawa T, Tell GS, et al. Dietary antioxidants and carotid artery wall thickness. The ARIC Study. Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Circulation* 1995; 92: 2142-50.
29. Kushi LH, Folsom AR, Prineas RJ, et al. Dietary antioxidant vitamins and death from coronary heart disease in postmenopausal women. *N Engl J Med* 1996; 334: 1156-62.
30. Lee IM, Cook NR, Gaziano JM, et al. Vitamin E in the primary prevention of cardiovascular disease and cancer: the Women's Health Study: a randomized controlled trial. *JAMA* 2005; 294: 56-65.
31. Omenn GS, Goodman GE, Thornquist MD, et al. Effects of a combination of beta carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. *N Engl J Med* 1996; 334: 1150-5.
32. Virtamo J, Rapola JM, Ripatti S, et al. Effect of vitamin E and beta carotene on the incidence of primary nonfatal myocardial infarction and fatal coronary heart disease. *Arch Intern Med* 1998; 158: 668-75.
33. Rapola JM, Virtamo J, Ripatti S, et al. Randomised trial of alpha-tocopherol and beta-carotene supplements on incidence of major coronary events in men with previous myocardial infarction. *Lancet* 1997; 349: 1715-20.
34. Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: results of the GISSI-Prevenzione trial. Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'infarto miocardico. *Lancet* 1999; 354: 447-55.
35. Stephens NG, Parsons A, Schofield PM, et al. Randomised controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS). *Lancet* 1996; 347: 781-6.
36. Yusuf S, Dagenais G, Pogue J, et al. Vitamin E supplementation and cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* 2000; 342: 154-60.
37. Collins R, Peto R, Armitage J. The MRC/BHF Heart Protection Study: preliminary results. *Int J Clin Pract* 2002; 56: 53-6.
38. Huxley RR, Neil HA. The relation between dietary flavonol intake and coronary heart disease mortality: a meta-analysis of prospective cohort studies. *Eur J Clin Nutr* 2003; 57: 904-8.
39. Vivekananthan DP, Penn MS, Sapp SK, et al. Use of antioxidant vitamins for the prevention of cardiovascular disease: meta-analysis of randomised trials. *Lancet* 2003; 361: 2017-23.
40. Knekt P, Ritz J, Pereira MA, et al. Antioxidant vitamins and coronary heart disease risk: a pooled analysis of 9 cohorts. *Am J Clin Nutr* 2004; 80: 1508-20.
41. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002; 82: 47-95.
42. Kimura S, Zhang GX, Nishiyama A, et al. Mitochondria-derived reactive oxygen species and vascular MAP kinases: comparison of angiotensin II and diazoxide. *Hypertension* 2005; 45: 438-44.
43. Wierzba TH, Borkowski T, Gawiński Ł. Do antioxidants play with heart rate variability? In: Bertoli E, Usukura J, Tanaka M (ed.). *Proceedings for Progress in Biomedical Science*, Gdańsk 2004; 1: 11-8.
44. Rattan SI. Mechanisms of hormesis through mild heat stress on human cells. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1019: 554-8.
45. Otani H. Reactive oxygen species as mediators of signal transduction in ischemic preconditioning. *Antioxid Redox Signal* 2004; 6: 449-69.
46. Glantz L, Avramovich A, Trembovler V, et al. Ischemic preconditioning increases antioxidants in the brain and peripheral organs after cerebral ischemia. *Exp Neurol* 2005; 192: 117-24.
47. Tang XL, Takano H, Rizvi A, et al. Oxidant species trigger late preconditioning against myocardial stunning in conscious rabbits. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 282: H281-H91.
48. Yaguchi Y, Satoh H, Wakahara N, et al. Protective effects of hydrogen peroxide against ischemia/reperfusion injury in perfused rat hearts. *Circ J* 2003; 67: 253-8.