

## **Efekty Niszczące FRC001 - Eliksiru China No.1 Tian Xian na Wolne Rodniki Tlenowe**

Przedmiot • Wprowadzenie • Materiały i Metody • Wyniki i omówienia

Ba-Lu Zhao<sup>1</sup> Ph.D., Wen-Juan Xin<sup>1</sup> Ph.D., Chung-Yu Kao<sup>2</sup> MD, Hong Zhang<sup>3</sup> MD. Ph.D.

1. Institute of Biophysics, Academia Sinica, Beijing

2. FRC Free Radical Biology and Medical Research Center, Taipei

3. Department of Pathology, University of Linköping, Sweden

### **PZEDMIOT**

Badania niszczących efektów działania FRC001 na wolne rodniki tlenowe metodą ESR, metodą chemoluminiscencji B JL oraz przy pomocy wielu innych technik wykazały, że są one porównywalne z działaniem witamin z grupy C i E. Wykazano również, że FRC001 może efektywnie niszczyć wolne rodniki tlenowe wytwarzane w PMN, pobudzane przez PMA i utlenianie xantynowo/xantynowe, napromieniowanie ryboflawiny /EDTA i Reakcję Fentona. Odkryto również, że hamuje on różnorodne martwice i oddziaływanie produktów reakcji TBA (tzw. TBARAM) które tworzą się odpowiednio w wyniku tłuszczowej peroksydacji kwasu linolinowego i liposomów. Posiada on także zdolność efektywnego niszczenia ONOO.

Słowa Kluczowe : FRC001, Wolne rodniki tlenowe, lipid peroksydacja tłuszczów, ESR, B JL-chemiluminescencja.

powrót [w GÓRE](#).

### **WPRPWADZENIE**

Aktywne, wolne rodniki tlenowe mogą niszczyć poszczególne części komórek, zabijać zdrowe komórki jak również powodować ich przyspieszone starzenie się. Zazwyczaj w organizmie zdrowego człowieka zarówno produkcja wolnych rodników tlenowych jak też ich oddziaływanie pozostają w stanie równowagi. Wskutek braku równowagi ustrojowej w wyniku niepoprawnego wydzielania enzymów (takich jak np. SOD), może wystąpić zwiększone wydzielanie wolnych rodników tlenowych w organizmie. Możliwe, że czynniki oddziaływujące niszcząco na wolne rodniki tlenowe mogą mieć pozytywne działanie prewencyjne w w/w procesach chorobotwórczych, a w konsekwencji przyczyniać się do poprawy zdrowia człowieka. Dlatego też należy prowadzić dalsze badania nad czynnikami skutecznie niszczącymi wolne rodniki tlenowe. W niniejszym opracowaniu badano wpływ efektów niszczącego działania FRC001 na wolne rodniki tlenowe metodą ESR, metodą chemoluminiscencji B JL oraz za pomocą innych technik badawczych. Badania te wykazały, że są one porównywalne z działaniem witamin z grupy C i E. Wykazano, że FRC001 może efektywnie niszczyć wolne rodniki tlenowe wytwarzane w PMN, pobudzane przez PMA i utlenianie xantynowo/xantynowe, napromieniowanie ryboflawin /EDTA i Reakcję Fentona. Odkryto również, że hamuje on różnorodnie martwice i produkty reakcji TBA (tzw. TBARAM) które tworzą się odpowiednio w wyniku tłuszczowej peroksydacji kwasu linolinowego i liposomów.

powrót [w GÓRE](#).

## MATERIAŁY I METODY

Środki : DMPO (5.5-dimethyl-pyrroline-1-oxide) zakupiony od Sigma Chem Co. i oczyszczony przy pomocy aktywnego węgla przed użyciem PMA (phorbol myristate acetate), kwas lanolinowy, lipoksydaza, SOD (6500 U/mg), tlenek xantyno/xantyny (2.125 U/ml) i luminol zostały zakupione od Sigma Chem Co., PMA rozpuszczono w odrobinie acetonu i rozcieńczono 50 mM roztworu buforowego fosoranu do właściwego stężenia. Inne środki poziomu AR wyprodukowano w Chinach. Zmierzono aktywność SOD zawartą w FRC001.

Miara BJL-chemiluminescencji : Reakcja oksydazy xanthynowo/ksantynowej może generować wytwarzanie wolnych rodników tlenowych, które powodują lumino-zależną chemiluminescencję. SOD może niszczyć chemiluminescencję generowaną tym sposobem, tak więc jego aktywność może być właśnie poprzez pomiar jej wartości. System pomiaru zawiera 0.2 mM luminolu, 0.32 mM xanthyny, i 0.09 U/ml tlenu xantyny. Chemiluminescencję mierzono przy pomocy chemiluminescimetru WDD-1.

Działanie FRC001 na O<sub>2</sub> zostało zdefiniowane następująco :

$$E = ((h_o - h_x) / h_o) \times 100\%$$

h<sub>o</sub> - jest tutaj systemem kontrolnym Chemiluminescencji xanthynowo/tlenkowo xantynowej, a h<sub>x</sub> jest chemiluminescencją xantynowo/tlenkowo xantynową po dodaniu roztworu FRC001.

System pomiarowy był taki sam jak powyżej, poza tym, że dodano do niego dawki różnego stężenia FRC001. Najpierw została określona w tym systemie standardowa krzywa aktywności SOD. Następnie została określona krzywa niszczącej aktywności FRC001 na wolne rodniki tlenowe. Na podstawie obu tych krzywych można było określić aktywność SOD w roztworze FRC001.

Niszczące działanie FRC001 na wolne rodniki OH wytwarzane w wyniku reakcji Fentona.

Wykonano roztwór, mieszając ze sobą 50 mM DMPO 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oraz 100 μM Fe(II) w formie siarczanu żelazowo-amonowego i przeniesiono go do kwarcowej kapilary w celu zmierzenia objętości EZR. Gdy zmierzono już niszczący efekt działania FRC001, dodawano do systemu roztwory FRC001 o różnym stężeniu. Efekt niszczący obliczony został jak powyżej, lecz w tym przypadku wartości drugiej krzywej zostały użyte do kalkulacji. Warunki ESR : Wszystkie spektra ESR zostały zarejestrowane przy pomocy spektrometru ESR Varian E-109. Parametry : moc mikrofalowa 20 mW. X-falowa, 100 kHz modulacja o amplitudzie 1G, centralnym polu magnetycznym 3250 G, zakresie skanowania 200 G, przy stałym czasie 0.128 S, w temperaturze pokojowej.

Niszczący efekt działania FRC001 na O<sub>2</sub> wytwarzany przez napromieniowanie ryboflawin/w systemie EDTA.

Mieszanina zawierająca 0.3 mM ryboflawiny, 5 mM EDTA oraz 0.1 M DMPO została przeniesiona do kapilary kwarcowej i umieszczona w gnieździe spektrometru ESR. po napromieniowywaniu próbki przez 20 sekund lampą xenonową (500 W, odległość 70cm), natychmiast rejestrowano spektra ESR. Gdy już zmierzono efekt niszczący FRC001, dodawano

do systemu roztwory FRC001 o różnym stężeniu. . Efekt niszczący obliczony został jak powyżej, lecz w tym przypadku wartości pierwszej krzywej zostały użyte do kalkulacji. Warunki wykonania pomiaru były takie same jak opisane powyżej.

Pomiar niszczącego efektu FRC001 na sprzężone węglowodory dienowe wytwarzane z tłuszczów w wyniku peroksydacji kwasu lanolinowego w trakcie lipooksydazy.

0.1 mM kwasu lanolinowego w PBS zostało zmieszane z 480 U/ml lipooksydazy i zmierzono w czasie przy 232 nm. W trakcie pomiaru efektu hamowania przez FRC001 wytwarzania sprzężonych węglowodórów dienowych, różne stężenia FRC001 dodawano do systemu. Efekt niszczący obliczony został jak powyżej, lecz w tym przypadku wartości h oraz hx zostały użyte odpowiednio jako współczynniki kontrolne i próbkowania w reakcji.

Pomiar współczynnika niszczącego działania FRC001 na produkty reakcji TBA (TBARM) wytwarzane z peroksydacji tłuszczów liposomów wywołanej przez Fe<sup>2+</sup>.

Liposomy złożone z lecytyny (10mg/ml) zostały peroksydowane przez dodanie do nich Fe<sup>2+</sup> (100 μM), następnie 95°C mieszanego z 6.7 mg/ml TBA oraz 0.05 M HCL. Próbkę inkubowano przez 60 minut w temp. 95 C, a potem schłodzono do temperatury pokojowej. Następnie ekstraktowano z niej TBARM przy użyciu butanolu : metanol (85:15) i odmierzony w 532 nm. W trakcie pomiaru efektu hamowania przez FRC001 na produkty reakcji TBA, różne stężenia FRC001 dodawano do systemu. Efekt niszczący obliczono podobnie jak powyżej.

Niszczące działanie FRC001 na wolne rodniki tlenowe wytwarzane z PMA pobudzone PMN.

Wyodrębnienie PMN : Świeżą, pełną próbkę krwi zdrowego dawcy zakupiono od Red Cross Blood Center of Beijing. wyseparowano z niej PMN, oddzielając je od innych komórkowych składników , używając w tym celu 6% sedymentację dextranu, hipersoniczne rozpuszczanie pozostałych czerwonych ciałek i metody stopniowego, konfiguracyjnego oddzielania monojądrowych komórek. według skali gęstości Ficolla.

Wytwarzanie i pomiar ilości aktywnych rodników tlenowych wytwarzanych przez PMN przy stymulacji PMA : W typowym eksperymencie mieszaninę zawierającą 107 /ml PMN, 0.1 mM DETAPAC (kwas dietylenetriaminopentacetyczny) i 100 ng/ml PMA inkubowano przez okres 2 minut w temp. 37°C, następnie dodano 0.1 M luminalu i jednorodnie zmieszano przed pomiarem BFL-chemiluminescencji. W trakcie pomiaru niszczącego efektu FRC001 na wolne rodniki tlenowe, różne stężenia FRC001 dodawano do systemu. Efekt niszczący obliczono podobnie jak powyżej.

Niszczące oddziaływanie FRC001 na ONOO

Synteza Peroxynitrytu : Peroxynitryt był syntezowany w hartowanym reaktorze pływowym.[12]. Roztwory (i) 0.6 mol/L NaNO<sub>2</sub> , i (ii) 0.6 mol/L HCL/0.7 mol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pompowano jednocześnie w tempie 26 ml/min do rozgałęźnika-T i mieszano w 3 mm średnicy gardle zwężenia 2,5 cm szklanego cylindra Wywoływano reakcję katalizy kwasowej kwasu azotowego z H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> do którego wtłaczano kwas peroksyazotowy przez pompowanie 15 mol/L NaOH w tych samych dawkach poprzez inną złączkę-T na drugim końcu cylindra. Nadmiar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, został usunięty przez kolumnowy przewód odprowadzający 1 X5 cm wypełniony 4g granulowanego

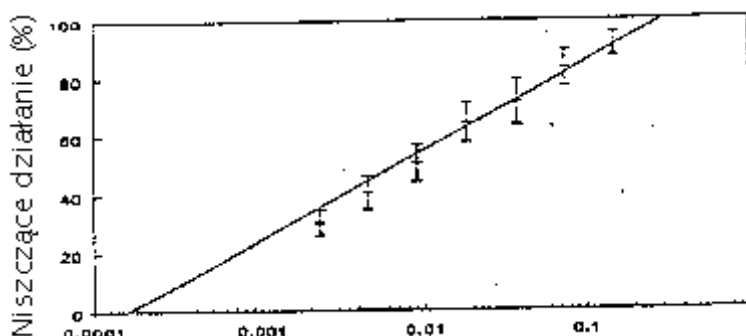
MnO<sub>2</sub>. Następnie roztwór chłodzono w temp. -20 °C przez czas około tygodnia. Peroxynitryt zdołał utlenić luminol i spowodować jego bardzo silną luminescencję. Efekt niszczący FRC001 na peroksynitryt zmierzono za pomocą metody badania luminescencji i obliczono podobnie jak powyżej.

powrót [w GÓRE](#).

## WYNIKI I OMÓWIENIA

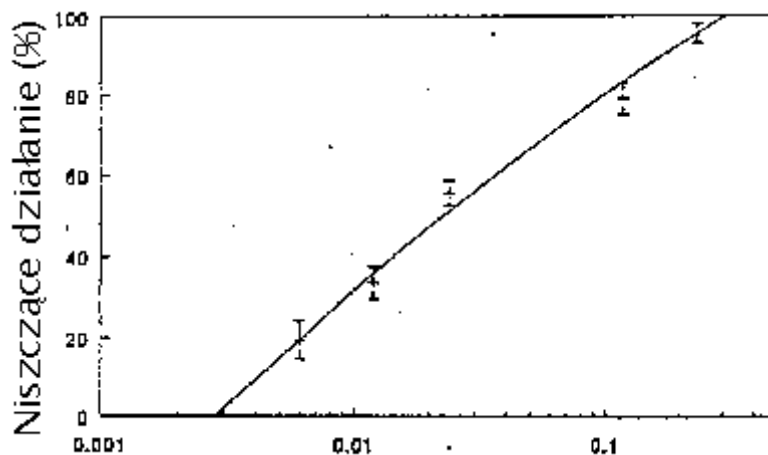
1. Niszczące działanie FRC001 na wolne rodniki tlenowe wytwarzane przez system ksantynowo/tlenkowo ksantynowy.
2. Standardowa krzywa niszczącego wpływu SOD na wolne rodniki wytwarzane przez system ksantynowo/tlenkowo ksantynowy pokazuje Wykres 1.

Aktywność SOD (U/ml)



Wykres 1. Standardowa krzywa niszczącego wpływu SOD na wolne rodniki wytwarzane przez system ksantynowo/tlenkowo ksantynowy

Niszczące działanie FRC001 na wolne rodniki tlenowe wytwarzane przez system ksantynowo/tlenkowo ksantynowy pokazuje Wykres 2.

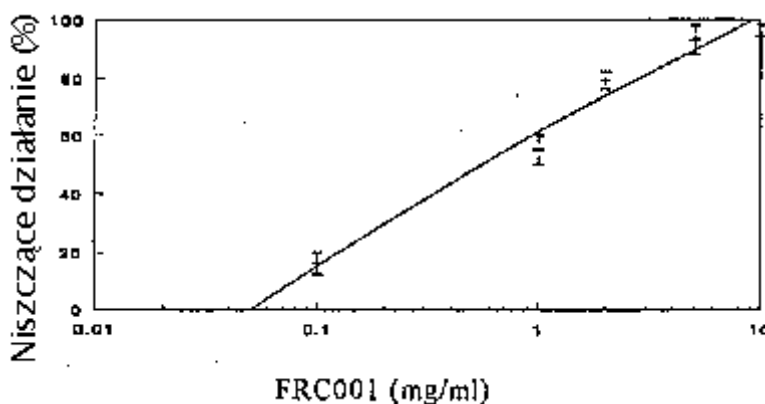


Wykres 2. Niszczące działanie FRC001 na wolne rodniki tlenowe wytwarzane przez system ksantynowo/tlenkowo ksantynowy.

Z obu powyżej przedstawionych krzywych ZOSTAŁA OBLICZONA AKTYWNOŚĆ SOD ZAWARTA W 1g FRC001 I WYNIOSŁA ONA 300.000 U/ml.

2. Niszczące działanie FRC001 na wolne rodniki tlenowe wytwarzane z PMA pobudzane PMN.

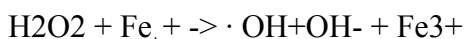
Gdy PMN są stymulowane lub znajdują się w fagocytach, następuje zakłócenie oddychania komórkowego i wytwarzanie aktywnych rodników tlenowych. Aktywne rodniki tlenowe wytwarzane w tym procesie, odgrywają bardzo ważną rolę w bakteriobójczych i zwalczających nowotwory procesach i zabezpieczeniu naszego organizmu przed wpływem różnych chorób. Lecz jeżeli w naszym organizmie nastąpi znaczna nadwyżka wolnych rodników tlenowych, mogą one powodować uszkodzenia niektórych części składowych komórek, a nawet zabijać normalne komórki, powodując szybsze ich starzenie się oraz wiele bardzo groźnych chorób, takich jak np. choroby serca i choroby nowotworowe. Zjawisko to zostało wykorzystane do zbadania wpływu FRC001 na wolne rodniki tlenowe. Wykres 3. pokazuje niszczący wpływ FRC001 na wolne rodniki tlenowe wytwarzane z PMA pobudzanych PMN. Poziom PMN mierzono za pomocą BJL-chemiluminescencji. Zostało ono określone na poziomie  $C_{50}=0.62$  mg/ml co było wynikiem mniejszym niż w przypadku witaminy C ( $C_{50}=0.2$  mg/ml), a większym niż w przypadku witaminy E.



Wykres 3. Niszczący wpływ FRC001 na wolne rodniki tlenowe wytwarzane z PMA pobudzanych PMN

3. Niszczące działanie FRC001 na wolne rodniki  $\cdot\text{OH}$  wytwarzane w wyniku reakcji Fentona.

Reakcja Fentona może generować powstawanie ujemnych jonów  $\cdot\text{OH}$  i została użyta do zbadania właściwości niszczących wolne rodniki  $\cdot\text{OH}$ .



W tym przypadku została ona użyta do zbadania niszczącego wpływu FRC001 na wolne rodniki  $\cdot\text{OH}$ . Zarejestrowane spektrum ESR jonów DMPO-OH pokazano na Wykresie 4b. ( $a_N=a_H=14.9\text{G}$ ). Niszczący wpływ FRC001 na jony  $\cdot\text{OH}$  został odwzorowany za pomocą Wykresu 5.



Wykres 4. Uchwycone spektra ESR DMPO. O<sub>2</sub> generowany przez napromieniowanie systemu ryboflawiny/EDTA (a) oraz wolne rodniki - OH wytwarzane w reakcji Fentona (b).

Niszczący efekt FRC001 pokazuje Wykres 5. FRC001 potrafi efektywnie niszczyć wolne rodniki hydroksylowe wytwarzane podczas reakcji Fentona, podczas gdy witamina C ma na nie niewielki tylko wpływ, zaś efekt niszczący witaminy E oscyluje w granicach ok. 37,5% przy stężeniu 5mg/ml.

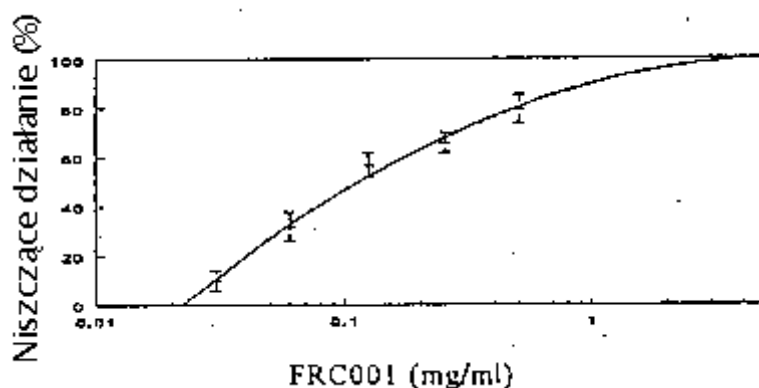


Figure 5. Niszczący wpływ FRC001 na wolne rodniki - OH wytwarzane w reakcji Fentona,

4. Niszczący efekt działania FRC001 na . O<sub>2</sub> wytwarzany przez napromieniowanie riboflavin/w systemie EDTA.

Napromieniowana ryboflawina/EDTA została użyta do wytworzenia ujemnych jonów wodorowych -O<sub>2</sub> i badania ich niszczenia w foto systemie. Zjawisko to zostało użyte do zbadania niszczącego wpływu FRC001 na jony - O<sub>2</sub>. Spektrum ESR jonów tlenowych - O<sub>2</sub> i DMPO-OOH generowanych przez napromieniowaną ryboflawinę obrazuje Wykres 4a (aN=14.3, aH $\beta$ =11.3G, aH $\gamma$  =1.25G).

Zgodnie z definicją niszczącego wpływu, jego krzywa dla FRC001 dotycząca jonów tlenowych O<sub>2</sub>- generowanych z napromieniowanej ryboflawiny/systemu EDTA zobrazowana została na Wykresie 6. Stężenie FRC001 przy 50% niszczeniu wynosi ok.

17 mg/ml. Jego niszczący wpływ jest mniejszy niż w przypadku witaminy C (C50 = 0.0009 mg/ml), lecz silniejszy niż witaminy E.

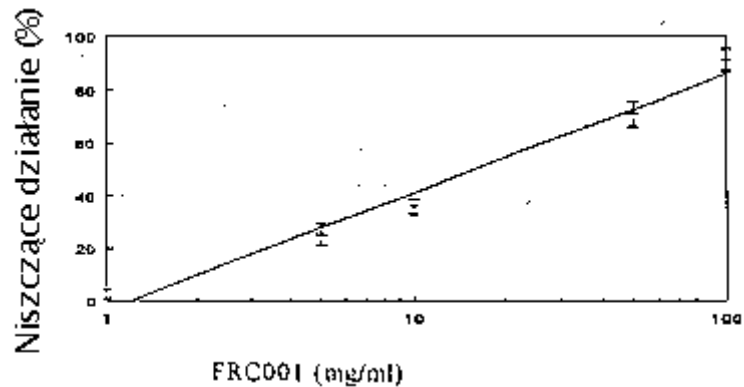
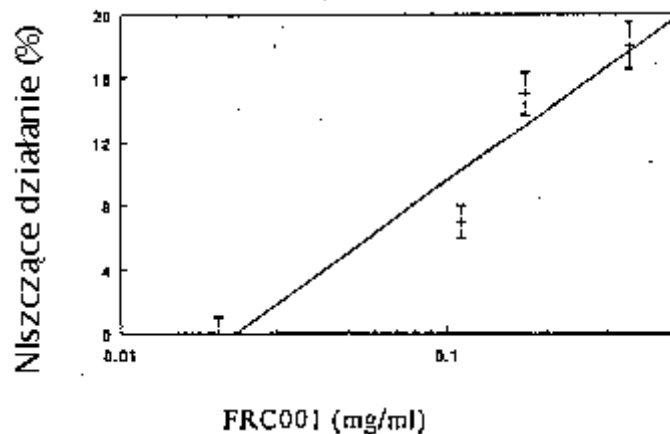


Figure 6. Efekt niszczący FRC001 na -O<sub>2</sub> generowane przez napromienioną ryboflawinę/systemu EDTA.

5. Hamujące działanie FRC001 na sprzężone węglowodory dionowe wytwarzane z tłuszczów w wyniku peroksydacji kwasu lanolinowego w trakcie lipooksydazy.

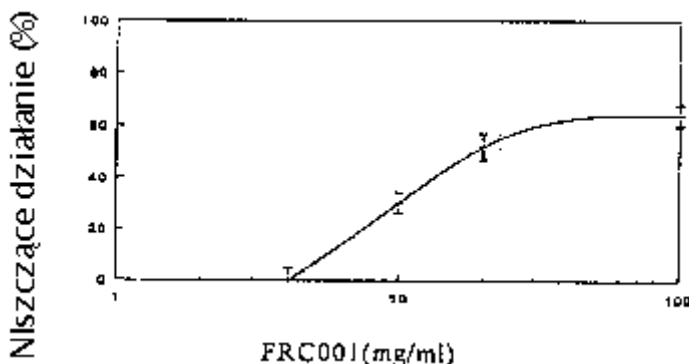
Sprzężone diony są wytwarzane w pierwszej fazie preoksydacji lipidów, która wykazuje absorpcję na poziomie 233nm. Efekt hamowania przez FRC001 wytwarzania sprzężonych dionów wytwarzanych z tłuszczów w wyniku peroksydacji kwasu lanolinowego w trakcie lipooksydazy został zobrazowany na Wykresie 7. Z wykresu tego wynika, że hamujący wpływ FRC001 wzrastał proporcjonalnie do jego stężenia użytego w systemie. Przy stężeniu FRC001 0.35mg/ml, zostało zniszczonych około 20% sprzężonych dionów. Przy wzroście stężenia, wzrosła też absorpcja na poziomie 233 co powodowało zakłócenie wyników przy wysokim stopniu stężenia.



Wykres 6. Hamujące działanie FRC001 na wytwarzanie sprzężonych dionów z tłuszczów w wyniku peroksydacji kwasu lanolinowego w trakcie lipooksydazy lipooksydazy.

6. Hamujące działanie FRC001 na produkty reakcji TEA (TBARM) wytwarzane z peroksydacji tłuszczów liposomów.

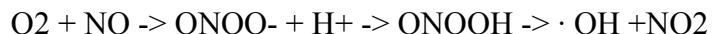
Hamujący wpływ FRC001 na produkty reakcji TBA wytwarzane z peroksydacji tłuszczów liposomów obrazuje wykres 7. Z przebiegu krzywej wynika, że efekt hamowania TBARM wzrastał wraz ze wzrostem stężenia dawki FRC001. Przy hamowaniu rzędu ok. 50% stężenie dawki wynosiło 19 mg/ml. Jego hamujący wpływ na produkty reakcji TBA był mniejszy niż w przypadku witaminy C (C50=1mg/ml), lecz większy niż w przypadku witaminy E.



Wykres 7. Hamujący wpływ FRC001 na produkty reakcji TBA wytwarzane z peroksydacji tłuszczów liposomów pobudzanej przez Fe<sup>2+</sup>.

7. Niszczące działanie FRC001 on peroxynitrit.

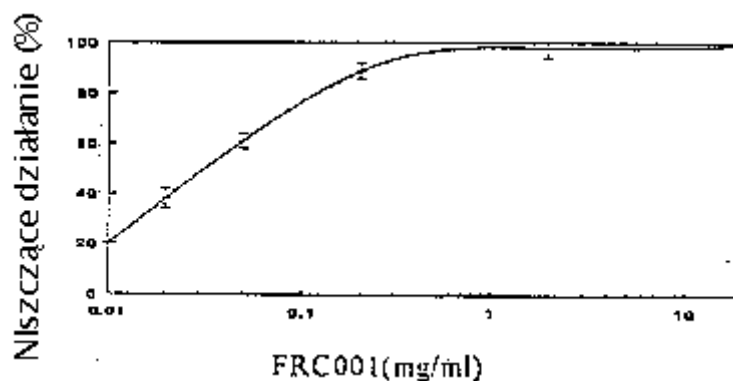
Tlenek azotu posiada wiele różnorodnych funkcji biologicznych, takich jak śródbłonkowo-ochodny wskaźnik relaksacji (EDRF), który odpręża gładkie komórki naczyniowe hamuje blaszkową koagulację oraz impulsy zwrotne w przekazie neuronowym. Biosynteza tlenu azotu z L-argininy może być drogą do regulacji funkcji i komunikacji na poziomie komórkowym. Makrofagi produkują tlenek azotu jako część swoistego cytotoksycznego oręża. Z drugiej zaś strony tlenek azotu, zawierający niesparowane (wolne) elektrony wykazuje właściwości paramagnetyczne i aktywujące wolne rodniki, może on reagować z  $\cdot\text{O}_2$  tworząc formy anionu peroxynitrytowego (ONOO<sup>-</sup>). W roztworach alkalicznych aniony ONOO<sup>-</sup> są stabilne, lecz mają Ph na poziomie 6.6 i w temp. ok. 0°C rozpadają się gwałtownie podczas reakcji protonowych odpowiednio na rodniko-podobny hydroksyl oraz wolne rodniki NO<sub>2</sub> zgodnie z następującą reakcją:



Ostatnio, wysunięto tezę, że tlenek azotu wchodząc w reakcję z O<sub>2</sub>- powoduje wiele patologicznych procesów wytwarzając przy tym typowo cytotoksyczne związki. Badaniom peroxynitrytu poświęca się ostatnio coraz większą uwagę. Jego utlenianie sulfohydrolów oraz błon tłuszczowych może powodować toksyczność komórkową oraz wiele różnych chorób. W badaniu tym mierzono niszczący wpływ FRC001 na aniony ONOO<sup>-</sup>, co zostało zobrazowane na Wykresie 8. Odkryto, że FRC001 może bardzo efektywnie niszczyć aniony ONOO<sup>-</sup> (C50 = 0.03



mg/ml). Jego niszczący wpływ na peroxynitryt jest jednak mniejszy niż w przypadku witaminy C ( $C_{50} = 0.00003$  mg/ml) lecz silniejszy niż witaminy E.



FRC001 jest lekiem zaprojektowanym na bazie teorii niszczenia wolnych rodników. Z wyników powyższego eksperymentu wynika, że FRC001 potrafi efektywnie niszczyć wolne rodniki tlenowe wytwarzane z PMN stymulowanego przez PMA ksantyno/tlenkowo-ksantynową i, napromieniowanie ryboflawiny/EDTA oraz reakcję Fentona. Dowiedziono również, że może on hamować reakcje sprzężonych dionów produktów reakcji TBA (TBARM) tworzących się odpowiednio podczas peroksydacji lipidowej kwasu lanolinowego i liposomów oraz niszczyć jony ONOO<sup>-</sup>. Wyniki te sugerują, że osiągnięty efekt terapeutyczny FRC001 jest wynikiem niszczenia przez niego toksycznych, wolnych rodników tlenowych w ludzkim organizmie.

powrót [w GÓRĘ](#).