

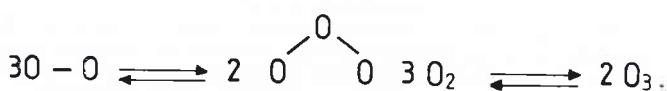
Biochemiczne podstawy przeciwnowotworowego działania ozonu (O_3)

Katedra Anatomii Patologicznej i Weterynarii Sądowej Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR,
ul. Norwida 31, 50-375 Wrocław,
* Specjalistyczne Gabinety Lekarskie, Pracownia Ozonoterapii, pl. Sikorskiego 8, 41-900 Bytom

Ozon (O_3) jest allotropową odmianą wolnego tlenu cząsteczkowego. Łatwo przekształca się on w zwykły O_2 , wyzwalając jednocześnie bardzo aktywny tlen atomowy: $O_3 \rightarrow O_2 + (O)$. Cząsteczka ozonu ma kształt kątowy z kątem pomiędzy wiązaniami wynoszącymi 127° , przy czym długość $O-O$ jest taka sama. Wyróżnia się dwie odmiany rezonansowe ozonu (10):



Ozon powstaje w atmosferze wg reakcji:



W żywym organizmie ozon nie jest produkowany.

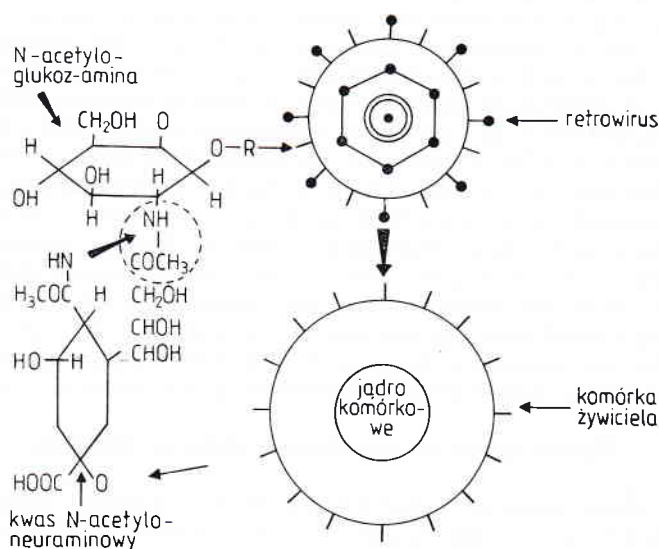
Ozon usuwa szkodliwe dla organizmów żywych promieniowanie UV-C z docierającego do atmosfery światła słonecznego i osłabia promieniowanie UV-B, sięgające powierzchni Ziemi. Promieniowanie ultrafioletowe uszkadza w komórce DNA, przy czym należy zaznaczyć, że widmo absorpcyjne tego kwasu nukleinowego przebiega równoległe do widma ozonu (1).

W ostatnich latach wykazano, że sztuczne, odpowiednio dobrane infuzje ozonu wywierają korzystny wpływ na organizmy żywe. W związku z tym ozon znalazł zastosowanie zarówno w leczeniu niektórych schorzeń u ludzi, jak i zwierząt (4, 6, 11, 13, 16, 17, 22, 23). Między innymi niszczy on niektóre bakterie chorobotwórcze, grzyby oraz wirusy, np. wirusa *hepatitis A/B*, wirusa *hepatitis nie-A — nie-B*, herpeswirusa opryszczki (*herpes zoster — HV 1 i HV 2*) oraz retrowirusy (6, 11, 13, 16, 22). Ozon podany do organizmu działa dezynfekcyjnie i dotleniająco na tkanki, powodując lepsze ich ukrwienie i odżywienie, wzmacnia ogólną i miejscową odporność oraz osłabia procesy zapalne. Powoduje m.in. wzrost ilości limfocytów T i T_s , nieznaczny natomiast spadek limfocytów B i T_h (3, 5). Ozon wykazuje także działanie przeciwnowotworowe (6, 10, 15, 17).

Działanie ozonu na wirusy

Wczesnym etapem ataku wirusa, np. retrowirusa, jest przyłączenie się go w miejscu receptorowym błony komórkowej gospodarza. Zjawisku temu, oprócz immunoglobulin powierzchniowych, przeciwdziałają także glikoproteidy i glikolipidy. Część cukrowa tych związków jest najczęściej zlokalizowana na powierzchni błony w fazie wodnej i tym samym warunkuje strukturalną asymetrię błon komórkowych, co manifestuje się obecnością tzw. warstwy powierzchniowej (glikokaliksu) pokrywającej powierzchnię błony od strony środowiska zewnętrznego.

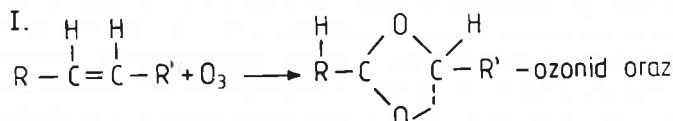
Warstwa ta decyduje o ładunku elektrycznym powierzchni komórki, co ma zasadnicze znaczenie w przenikaniu do jej wnętrza różnych substancji, np. wirusów. Wykazano między innymi, że w błonie komórki nowotworowej jest duża zawartość kwasu sialowego, związku wywodzącego się z kwasu neuraminowego i będącego N-acetylo-N-glikolilo-lub, N-O-dwuacetylopochodnymi, który tworzy płaszcz cukrowcy, osłaniający antygeny powierzchniowe atakujących komórek nowotworowych przed kontrolą immunologiczną ze strony gospodarza (20, 21).



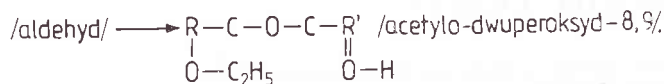
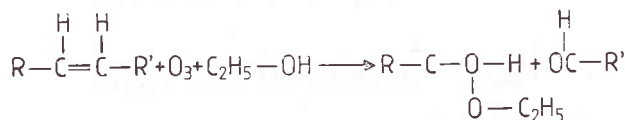
Ryc. 1. Hamujący wpływ ozonu przy zakażeniu komórki retrowirusem

Na ryc. 1 przedstawiono schemat hamującego wpływu ozonu na wnikanie retrowirusa do wnętrza komórki żywiciela. Miejszem ataku elektrofilnych cząsteczek ozonu jest wolna para elektronów na wiązanie azotowe w N-acetylo-glukozaminie, co może powodować deacylację tego związku i powstanie glukozaminy, z następującą zmianą charakteru reszty cukrowej receptora komórki. Następuje utlenienie receptorów komórki potencjalnego żywiciela oraz zaburzenia w cyklu reprodukcji wirusa poprzez uszkodzenie budowy jego kwasu nukleinowego. Efektem jest „utlenienie” wirusa i zablokowanie jego aktywności. Podobne działanie jak ozon wykazują także jego peroksydy (10).

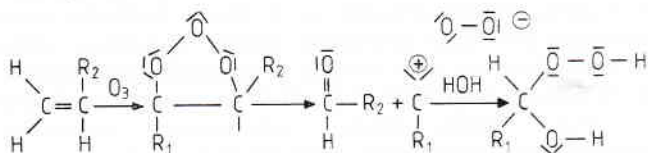
Ozon wchodzi w reakcję z nienasyconymi kwasami tłuszczowymi (PUFA — polyunsaturated fatty acids) w dwojaki sposób, tj.:



II. w obecności rozpuszczalnych związków alkoholowych:



Ozon dzięki swoim właściwościom elektrofilnym może również wpływać na nienasycone kwasy tłuszczowe błon komórkowych zakażonych przez wirusy, powodując ich peroksydację. Reakcja ta przebiega wg wzoru:



Badanie tlenowej degradacji nienasyconych kwasów tłuszczowych pozwoliło na stwierdzenie, że np. dehydrogenaza aldehydowa ma różną lokalizację w komórce. I tak w komórkach nowotworowych jest ona obecna tylko w 30% w mitochondriach, mikrosomach i cytozolu, a w komórkach prawidłowych w 80% w cytozolu (19). Aktywność tego enzymu w komórkach nowotworowych spada o 65% w stosunku do komórek prawidłowych. Wynika to prawdopodobnie z faktu, że mitochondria komórek nowotworowych są bardzo wrażliwe na działanie aldehydów, blokujących syntezę DNA i syntezę białek, wydłużających fazę S cyklu komórkowego (19). Nienasycone aldehydy łączą się wybiórczo z białkowymi i niebiałkowymi grupami SH w komórce, co prowadzi do eliminacji grup tiolowych cytoplazmatycznych enzymów oddechowych i enzymów glikolitycznych (19).

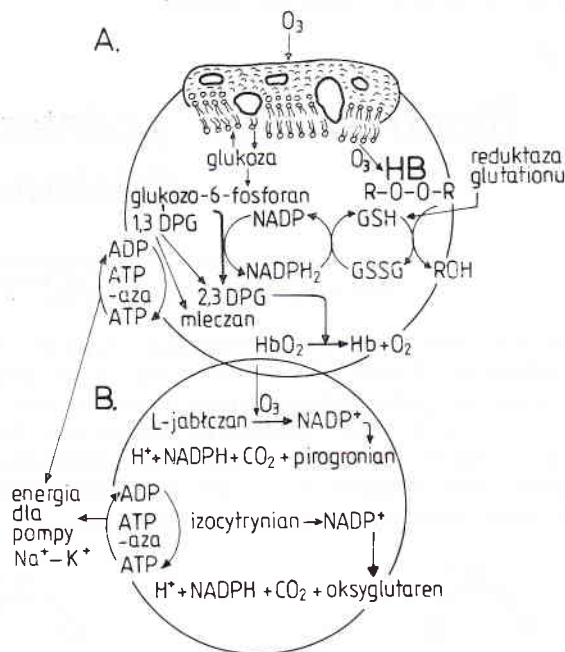
Wpływ ozonu na metabolizm tlenu w komórce

Ozon wzmagają przez błonowy transport tlenu, działa indukująco i reaktywująco na takie enzymy, jak: katalaza, peroksydaza cytochromowa i dysmutazy nadtlenkowe (FeSOD, MgSOD i CuZnSOD) oraz usprawnia utylizację O₂ w mitochondrialnym łańcuchu oddechowym, np. poprzez oksydację NADH lub utlenienie systemu cytochromu C (10). Dokładnie procesy te zostały poznane w erytrocytach (ryc. 2 A) i nieco słabiej w komórkach jądrazstych (ryc. 2 B). Sumarycznie reakcję tę w erytrocytach można wyrazić wzorem: HbO₂ + 2, 3 DPG \longrightarrow Hb + 2,3 DPG + O₂.

W przedstawionym schemacie reduktorem jest np. GSH (trójpeptyd glutationu). W reakcji z wodorotlenkiem tworzy się alkohol, zaś glutation utlenia się z formy wolnego tiolu do GSSG (10).

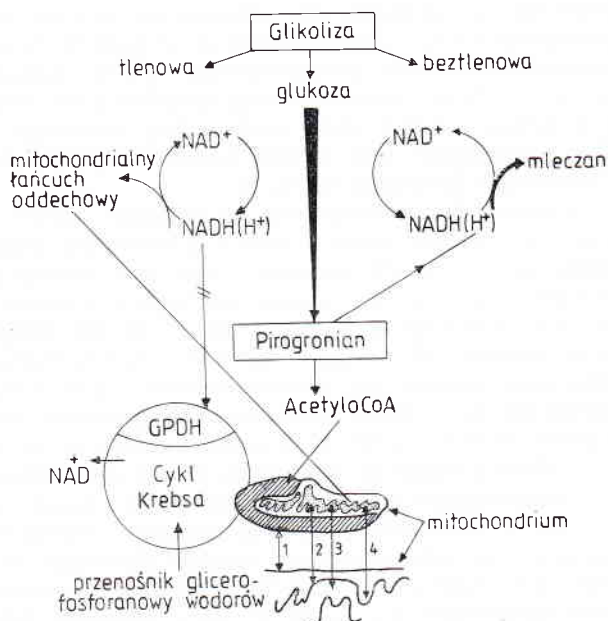
Reakcje hamowania nowotworzenia przez ozon

Na ryc. 3 przedstawiono reakcje metaboliczne w komórce nowotworowej po zadziałaniu na nią sztucznej infuzji ozonowej. Manifestuje się to kumulacją m.in. mleczanu i wzrostem zużycia NAD. Niedobór NAD prowadzi do zaburzeń w cyklu Krebsa poprzez hamowanie beta-oksydacji kwasów tłuszczowych oraz do zmian w łańcuchu oddechowym, a także przenośnikach glicero-fosforanowych wodorów. Niezależnie od tej reakcji donorem elektronów do redukcji tlenu może być zreduko-



Ryc. 2. Wpływ ozonu na metabolizm tlenowy w erytrocycie (A) oraz w komórce jądrazstej (B) wg Rillinga i Viebahn (zmodyfikowana)

Objaśnienia: DPG — difosfoglicerynian, NADP — fosforan dinukleotydu nikotynamidoadeninowego, NADPH — fosforan dinukleotydu nikotynamidoadeninowego zredukowany, GSH — zredukowana forma glutationu, GSSG — utleniona forma glutationu.



Ryc. 3. Hamowanie metabolizmu komórki nowotworowej przez ozon wg Rillinga i Viebahn (zmodyfikowana)

Objaśnienia: NAD⁺ — dinukleotyd nikotynamidoadeninowy, NADH — dinukleotyd nikotynamidoadeninowy zredukowany, GPDH — dehydrogenaza glicero-1-fosforanowa, 1 — błona zewnętrzna, 2 — błona wewnętrzna, 3 — matriks, 4 — grzebień.

wany fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NADPH), powstający w bocznym szlaku przemian monofosforanu heksozy (cyklu pentozowym). Jest to bardzo wydajna reakcja, w której utlenienie jednej cząsteczki glukozy daje 12 cząsteczek NADPH (18). Z kolei mleczan jest w znacznie mniejszym stopniu wykorzystany jako źródło energii niż pirogronian, co wskazuje, że metabolizm komórki jest także regulowany

przez odpowiedni stosunek stężeń NADH/NAD. Wysoki stopień redukcji tych nukleotydów ogranicza w dużym procencie aktywność dehydrogenazy izocytrynianowej, hamując niską w tym okresie aktywność cyklu Krebsa (18). W pewnym stopniu wyjaśnia to pytanie, dlaczego komórki nowotworowe mają wysoką aktywność glikolityczną, będącą wynikiem obniżonej wydolności oddychowej mitochondrium tych komórek. Może to powodować spadek poziomu ATP w tych komórkach i zwiększenie szybkości glikolizy w warunkach aerobowych.

Oprócz ozonu w procesie hamowania metabolizmu komórek nowotworowych, a nawet ich zabijaniu współuczestniczącą rolę ma spełniać także nadtlenek wodoru (H_2O_2). Powoduje on liżę komórek nowotworowych linii P 388 D₁ poprzez przyspieszenie przemian w cyklu pentozowym, co wskazuje na wzrost szybkości cyklu redukcyjno-glutationu. W następstwie dochodzi do rozrywania nowotworowego łańcucha DNA i spadku puli wewnątrzkomórkowego ATP wskutek zakłócenia fosforylacji ADP (8). Nadtlenek wodoru współpracuje również z mieloperoksydazą, co powoduje powstanie wolnych rodników tlenkowych (WR), które niszczą komórki nowotworowe (2).

Zarówno komórki prawidłowe, jak i nowotworowe pozbawione tlenu są ogólnie bardziej odporne na radioterapię. W związku z tym, że tkanki zdrowe są lepiej utlenowane niż komórki nowotworowe, część z nich może przetrwać mimo leczenia odpowiednimi dawkami promieniowania, które nie szkodzi otaczającym je tkankom prawidłowym. Dlatego też szukając nowych metod terapeutycznych albo zwiększa się ciśnienie cząsteczkowe tlenu, albo uwrażliwia lekami niedotlenione komórki nowotworowe na stosowaną radioterapię. Właściwości takie posiada ozon. Między innymi wzmacnia on wrażliwość komórek nowotworowych, np. komórki raka macicy *in vitro* u ludzi na działanie promieni jonizujących, jak również wykazuje właściwości synergistyczne z 5-fluoro-uracylem w przypadku raka sutka i raka okrężnicy (7, 14).

W patologii weterynaryjnej infuzje ozonowe stosuje się nie tylko do likwidacji niektórych chorób wirusowych, np. parwowirusowego zapalenia żołądka i jelit, ale także w terapii onkologicznej. Wykazano korzystne działanie ozonu w regresji guzów nowotworowych u psów i kotów po infuzji doguzowej, okołoguzowej, jak również w leczeniu kooperacyjnym (11). U szczurów obserwowano wycyfywanie się mięsaka Walkera po stosowaniu tego gazu (10).

Ostatnio przyjmuje się, że przy zahamowaniu ekspresji odpowiednich onkogenów komórki nowotworowe mogą powrócić do prawidłowego fenotypu (cyt. za 12). Duże znaczenie przypisuje się tu antysensowym oligodeoksy-nukleotydów (antisense oligodeoxynucleotides), które są sekwencjami specyficznymi hamującymi ekspresję onkogenów. Są to sekwencje złożone z kilkunastu par zasad, które po wnikięciu do komórki docelowej przyłączają się do onkogenów, hamując syntezę mRNA, białka i proliferację komórek nowotworowych (12). Prawdopodobnie pewną rolę w tym procesie odgrywa także ozon.

Podsumowanie

Wstępne, pozytywne wyniki uzyskane w leczeniu niektórych nowotworów ozonem i to zarówno u ludzi, jak i zwierząt, wskazują na możliwość wykorzystania tego gazu w onkoterapii. Stosowany w polskiej medycynie ozon pochodzi z tlenu medycznego przetworzonego w aparacie BIOOZON HOT firmy Prochaska — OZON Apparate Vertriebs GmbH (RFN). Tak powstały ozon mieszany jest następnie z tlenem i podawany pacjentom zewnętrznie, domięśniowo, donaczyniowo lub do jam ciała. Stosuje się także leczenie krwią własną pacjenta ozonowaną w zestawie jednorazowym do przetaczania krwi.

Piśmiennictwo

1. Brit W. J.: Sci. Am. 216, 53, 1977.
2. Clark R. A., Scot S.: J. Immunol. 123, 1295, 1981.
3. Eistner E. F.: Med. Welt 35, 728, 1984.
4. Enzelberger H., Metka M., Salzer H.: Gebursh. u. Frauenheilk. 47, 943, 1987.
5. Flückiger J.: Erfahr. hk. 33, 762, 1984.
6. Karlic H., Kucera H., Metka M., Schönbauer M., Söregi G.: Strahlentherapie u. Onkologie 163, 37, 1987.
7. Krall J., Bagley A. C., Mullenbach G. T., Hallewell P. A., Lynk R. E.: Biol. Chem. 253, 1910, 1988.
8. Mattassi R.: Seminar Sauerstoff-Ozon-Therapie. Salzburg 1985, s. 37.
9. Ohlschläger G.: Biozon J. 5, 22, 1983.
10. Rilling S.: Ozon-Weltkongress. 9-12 September, Tokio 1985, s. 221.
11. Rilling S., Viebahn R.: Praxis der Ozon-Sauerstoff-Therapie. Verlag für Medizin Dr. Ewald Fischer. Heidelberg 1990, s. 38.
12. Schütz S.: Ozon-Nachrichten 3, 2, 1984.
13. Schaufstatter I. U., Hinshaw D. B., Hyslop P. A., Spragg R. G., Cochran Ch. G.: J. clin. Invest. 77, 1312, 1983.
14. Shacter E., Beechem E. J., Covey J. M., Kohn K. W., Potter M.: Carcinogenesis 9, 7297, 1988.
15. Swett F., Kaos S., Lee S. Ch. D.: Science 209, 131, 1980.
16. Washüttle J., Viebahn R., Steiner I.: Sci. Eng. 12, 23, 1990.
17. Wendel A.: Adv. clin. Enzymol. 5, 161, 1988.
18. Weinberg R. A.: Sci. Am. 249, 1, 1983.
19. Yozgeswaren G.: J. natn. Cancer Inst. 66, 373, 1981.
20. Yozgeswaren G., Salk P. S.: Science 112, 1514, 1981.
21. Viebahn R.: Erfahr. hk. 34, 334, 1985.
22. Viebahn R.: Sci. Eng. 7, 175, 1985.

Adres autora: prof. dr hab. Janusz A. Madej, ul. Liskego 4/5, 50-345 Wrocław

CUNNINGHAM A. A., WELLS G. H. A., SCOTT A. C., KIRKWOOD J. K., BARNETT J. E. F.: Gąbczasta encefalopatia u wielkiego kudu. (Transmissible encephalopathy in greater kudu). Vet. Rec. 132, 68, 1993 (3)

W ogrodach zoologicznych w Wielkiej Brytanii zdiagnozowano 6 przypadków gąbczastej encefalopatii (BSE). W dwóch przypadkach choroba występowała u kudu. Przypuszcza się, że podobnie jak u bydła, również u kudu źródłem zakażenia był pokarm zawierający dodatek białka pochodzenia zwierzęcego, zanieczyszczonego czynnikiem scrapie. Istnieje też możliwość zakażeń pionowych od matki. Zachorowanie dwóch następnych kudu na BSE, które nie miały żadnego kontaktu z pokarmem wzbogaconym w białko zwierzęce, wskazuje na możliwość również innego sposobu zakażenia. Rozpoznanie BSE oparto o objawy neurologiczne i wyniki badania w mikroskopie elektronowym kory mózgowej i rdzenia kręgowego.

MC EVOY J. D., MC COY M.: Ostre zatrucie ołowiem w stadzie bydła związane z zanieczyszczeniem kisonki. (Acute lead poisoning in a beefherd associated with contaminated silage). Vet. Rec. 132, 89, 1993 (4)

Najczęstszą przyczyną zatrucia bydła ołowiem jest farba ołowiowa, rzadziej pokarm skażony związkami ołowiu stosowanymi do bejcowania ziarna. W stadzie liczącym 42 krowy i cielęta wypasanych na pastwisku w marcu 1990 r. uzupełniono dietę kisonką. Po tygodniu u wszystkich zwierząt wystąpiły typowe objawy zatrucia ołowiem. Na czoło objawów klinicznych wysuwała się atonia żwacza, depresja, ataksja, utrata wzroku, ruchy maseżowe. Wszystkie zwierzęta otrzymały BVetC dożylnie w płynie fizjologicznym przez okres 7 dni. W ciężkich przypadkach leczenie powtarzano częściej. Pomimo leczenia 6 krowy i 10 cieląt padło. Kisonka była silnie zanieczyszczona ołowiem (1200 mg ołowiu/kg suchej masy). Poziom ołowiu w nerkach wynosił 116-166 mg/kg wilgotnej masy.