

\*II Klinika Okulistyki Akademii Medycznej w Lublinie  
ul. Chmielna 1, 20-079 Lublin  
e-mail: okulistyka2@am.lublin.pl

\*\*Katedra i Zakład Farmakognozji z Pracownią Roślin Leczniczych  
Akademii Medycznej w Lublinie

\*\*\*Samodzielny Publiczny Szpital Kliniczny im. W. Orłowskiego CMKP w Warszawie

OLAF KALISZ\*, TADEUSZ WOLSKI\*\*, MAREK GERKOWICZ\*,  
MARCIN SMORAWSKI\*\*\*

### **Reaktywne formy tlenu (RTF) oraz ich rola w patogenezie niektórych chorób**

---

Reactive oxygen particles and their role in the pathogenesis  
of particular diseases

**Streszczenie.** W patologicznych sytuacjach, takich jak hiperoksja, stan niedokrwienia/reperfuzji, stany zapalne, czy działanie niektórych czynników zewnętrznych (np. promieniowanie lub chemioterapia) dochodzi do nadmiernej produkcji wolnych rodników, co może powodować uszkodzenie komórek lub indukować proces apoptozy. Wolne rodniki tlenowe i reaktywne formy tlenu mogą reagować z różnymi strukturami komórkowymi, powodując konwersję białek, peroksydację lipidową czy uszkodzenie struktury kwasów nukleinowych. Stres oksydacyjny jest stanem nadmiernej aktywności reaktywnych form tlenu i zaburzeniem równowagi pomiędzy ich wytwarzaniem a ich neutralizacją. Efekt działania wolnych rodników i przewlekły stres oksydacyjny leżą u podłoża wielu chorób, takich jak choroby neurodegeneracyjne, zwyrodnieniowe czy procesy zapalne. Szkodliwe skutki działania wolnych rodników mogą przyczyniać się do rozwoju chorób układu krążenia, chorób układu oddechowego, chorób nowotworowych, cukrzycy, chorób układu nerwowego, miażdżycy i niektórych schorzeń narządu wzroku, takich jak zaćma, jaskra czy zwyrodnienie plamki związane z wiekiem. Bardzo ważnym elementem obronnym jest utrzymanie prawidłowej aktywności antyoksydacyjnej w ustroju organizmów żywych.

**Słowa kluczowe:** wolne rodniki, stres oksydacyjny, reaktywne formy tlenu

#### WOLNE RODNIKI I STRES OKSYDACYJNY

Tlen jest jednym z pierwiastków niezbędnych do utrzymania życia na Ziemi. Jednak tlen i jego związki w niektórych warunkach mogą okazać się toksyczne i powodować uszkodzenie tkanek i narządów. Około 5% wdychanego O<sub>2</sub> przekształca się w reaktywne

formy tlenu – jest to około 2 kg rocznie. Reaktywne formy tlenu to pojęcie szersze niż wolne rodniki tlenowe. Obejmuje ono także wzbudzony tlen singletowy i nadtlenek wodoru [Bartosz 2003].

W warunkach zaburzenia równowagi pomiędzy wytwarzaniem i aktywnością reaktywnych form tlenu a mechanizmami obronnymi dochodzi do stanu, który określa się jako stres oksydacyjny. Do najważniejszych reaktywnych form tlenu zalicza się [Zachwieja i in. 2000]:

–  $O_2^{\cdot -}$  – anion ponadtlenkowy – rodnik raczej mało reaktywny, powstaje podczas przecieku elektronów z łańcucha oddechowego, a także wytwarzany jest przez neutrofile i makrofagi w mechanizmie tlenowego zabijania bakterii; jest produktem jednoelektronowej redukcji tlenu [Fitak i Grzegorzcyk-Jaźwińska 1999];

–  $H_2O_2$  – nadtlenek wodoru – nie jest wolnym rodnikiem, ponieważ nie ma niesparowanego elektronu; powstaje z anionu ponadtlenkowego ( $O_2^{\cdot -}$ ) w reakcji enzymatycznej katalizowanej przez dysmutazę ponadtlenkową; w komórkach może być on metabolizowany przez peroksydazę glutationu lub katalazę do  $H_2O$  lub w obecności jonów  $Fe^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ , może być także redukowany do grupy  $OH^{\cdot}$  w reakcji Fentona; biologicznie istotne są dwa rodzaje reakcji z udziałem nadtlenu wodoru – utlenianie grup tiolowych oraz utlenianie jonów metali przejściowych ( $Fe^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ) [Bartosz 2003];

–  $^{\cdot}OH$  – rodnik hydroksylowy – charakteryzuje się bardzo dużą reaktywnością i toksycznością; reaguje z większością cząsteczek występujących w organizmie; głównymi reakcjami rodnika hydroksylowego są: oderwanie atomu wodoru od alkanów i ich pochodnych oraz addycja do wiązań podwójnych [Fitak i Grzegorzcyk-Jaźwińska 1999];

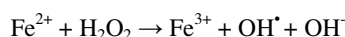
–  $^1O_2$  – tlen singletowy – oddziałuje z innymi cząsteczkami na dwa sposoby: przechodząc w stan trypletowy, przekazuje energię wzbudzenia lub wchodzi z cząsteczkami w reakcję chemiczną [Bartosz 2003].

Reakcje rodnikowe są łańcuchowe. Przykładem takiej reakcji jest peroksydacja lipidowa. Można wyróżnić trzy typy reakcji wolnorodnikowych: reakcja inicjacji, propagacji i terminacji [Bartosz 2003]. W reakcjach inicjacji dochodzi do tworzenia wolnych rodników, w reakcjach propagacji liczba rodników nie ulega zmianie, dochodzi natomiast do zmiany postaci nosicieli niesparowanych elektronów. Reakcja terminacji kończy łańcuch reakcji wolnorodnikowych.

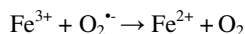
Reaktywne formy tlenu mogą powstawać wskutek takich czynników, jak: ekspozycja na wysokie ciśnienie tlenu (zaburzenia oddychania, niedokrwienie serca, okres reperfuzji niedokrwiennej), obniżone ciśnienie tlenu (wstrząs, niedotlenienie układowe), działanie związków chemicznych (pestycydy, benzopiren, barwniki azowe, czterochlorek węgla, skażenie ozonem, tlenkiem azotu, dymem papierosowym), promieniowanie (alfa, beta, gamma, ultrafioletowe, rentgenowskie, widmo światła widzialnego), procesy metaboliczne (fagocytoza, peroksydacja kwasów tłuszczowych), zaburzenia metaboliczne (awitaminoza, starzenie się organizmu), stany zapalne (infekcje, oparzenia, obrzęk mózgu, płuc), choroby przewlekłe (choroby nowotworowe, cukrzyca, urazy, alkoholizm, choroba Alzheimera), autooksydacja związków biologicznie czynnych (epinefryny, hemoglobiny), mikrosomalna oksydacja niektórych leków (np. nitrofurantoiny), reakcje enzymatyczne katalizowane przez oksydazę ksantynową, lipooksygenazę, cyklooksygenazę.

Mechanizm tworzenia wolnych rodników przy udziale jonów metali grup przejściowych przedstawiają reakcje Fentona i Habera-Weissa [Gonet 1996, Bartosz 2003].

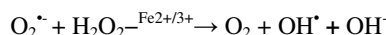
W reakcji Fentona nadtlenek wodoru w obecności jonów metali grup przejściowych ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ) ulega rozpadowi, tworząc rodnik hydroksylowy:



Utleniony metal pełni rolę katalizatora (może być on później zredukowany):



Oba te mechanizmy można przedstawić w reakcji Habera-Weissa:



Reaktywne formy tlenu są odpowiedzialne za wiele niekorzystnych procesów. Prowadzą one m.in. do utleniania związków niskocząsteczkowych (glutation, askorbinian), degradacji kolagenu, depolimeryzacji kwasu hialuronowego, utleniania hemoglobiny, inaktywacji enzymów, inaktywacji białek transportowych, pęknięć nici DNA, uszkodzenia zasad DNA, degradacji rybozy, uszkodzeń chromosomów, peroksydacji lipidów błon, lizy (rozpadu) erytrocytów, zaburzeń wewnątrzkomórkowej homeostazy  $\text{Ca}^{2+}$ , modyfikacji właściwości antygenowych komórek, agregacji płytek krwi, zmian morfologii komórek, powstawania mutacji, transformacji nowotworowej komórek [Bartosz 2003].

Należy jednak pamiętać, że wolne rodniki biorą także udział w wielu procesach fizjologicznych ustroju, takich jak: reakcje redukcji i utleniania w łańcuchu oddechowym, odtwarzanie źródeł energii (ATP), transport tlenu przez hemoglobinę, aktywacja cytochromu P450, fagocytoza drobnoustrojów czy odtruwanie organizmów z toksyn [Gonet 1996, Bartosz 2003, Włodek 2004].

W organizmie funkcjonuje wiele mechanizmów chroniących przed działaniem reaktywnych form tlenu. Do najważniejszych antyoksydantów w ustroju zalicza się: glutation, witaminy E i C, flawonoidy, jony metali –  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ , enzymy (dysmutazę ponadtlenkową, katalazę, oksydazę, peroksydazę glutationu, reduktazę glutationu), ferrytynę, transferynę, ceruloplazminę, koenzym Q, bilirubinę, kwas moczowy.

Wolne rodniki mogą być tworzone *in vivo* z wielu atomów i molekuł, jednak najgroźniejsze dla układów biologicznych są te związane z redukcją tlenu [Bartosz 2003, Djordjevic 2004]. Częsteczka tlenu może ulegać redukcji do anionu ponadtlenkowego, nadtlenu wodoru i rodnika hydroksylowego [McCord 1993]. Anion ponadtlenkowy jest szczególnie groźny dla błon biologicznych, natomiast rodnik hydroksylowy jest najbardziej reaktywny ze wszystkich rodników. Natychmiast po powstaniu reaguje z sąsiadującymi cząsteczkami, niezależnie od tego, czy są to białka, fragmenty DNA, czy inne makromolekuły. Szczególnie wrażliwe na działanie wolnych rodników są składniki błon biologicznych – zwłaszcza boczne łańcuchy wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, warunkujących płynność błon lipidowych. Proces peroksydacji lipidowej jest uruchamiany, gdy wolny rodnik pozyska atom wodoru z łańcucha bocznego wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, wskutek czego niesparowany elektron powoduje destabilizację całego łańcucha bocznego i umożliwia działanie rodnikom lipofilnym. Rodniki te są silnie reaktywne i w procesie peroksydacji lipidowej uszkadzają strukturę i integralność komórek błonowych [Hofmanova i in. 2004, Izzoti i in. 2006].

Struktura DNA może być uszkodzona w wyniku stresu oksydacyjnego w wielu mechanizmach takich jak: modyfikowanie nukleotydów, wytwarzanie nieprawidłowych połączeń pomiędzy łańcuchami DNA lub DNA i białkami, tworzenie miejsc bezpurynowych. Wszystkie te zmiany mogą powodować mutacje, których konsekwencje zależą od tkanek, w których powstały. Mutacje zwiększają ryzyko powstawania chorób nowotworowych i degeneracyjnych [De Flora i in. 1996]. Jak się wydaje, podobne mechanizmy degeneracyjne wynikające z uszkodzenia struktury DNA mogą dotyczyć komórek beleczkowania, przyczyniając się do rozwoju jaskry. Uszkodzenie oksydacyjne niektórych struktur oka uznano za czynnik etiopatogenetyczny różnych chorób okulistycznych, takich jak zaćma [Truscott 2005], zwyrodnienie plamki związane z wiekiem [Yildirim i in. 2004] oraz jaskra [Chen i Kadlubar 2003].

#### WOLNORODNIKOWE MECHANIZMY PATOGENETYCZNE NIEKTÓRYCH CHOROÓB

##### **Jaskra**

Wiele dowodów wskazuje na to, że stres oksydacyjny odgrywa istotną rolę w patogenezie jaskry pierwotnej otwartego kąta (JPOK) [Chen i Kadlubar 2003, Izzoti i in. 2003].

Na początku lat 80. postawiono hipotezę, że stres oksydacyjny ma istotny wpływ na uszkodzenie jaskrowe [Alvarado i in. 1981, 1984]. Niektórzy autorzy sugerowali, że postępująca utrata komórek beleczkowania u pacjentów z jaskrą może być związana z długotrwałym działaniem stresu oksydacyjnego wywołanego przez wolne rodniki. W ciągu następných lat przeprowadzono wiele badań *in vitro* i *in vivo*, zarówno na zwierzętach, jak i z udziałem ludzi, w celu potwierdzenia tej teorii. Jak wykazano w badaniu przeprowadzonym na szczurach z podwyższonym ciśnieniem wewnątrzgałkowym (IOP), połączone leczenie czynnikami troficznymi i antyoksydantami chroniło komórki zwojowe siatkówki przed śmiercią [Ko i in. 2000, Izzoti i in. 2006].

Teoria stresu oksydacyjnego jako czynnika wpływającego na rozwój jaskry łączy się z naczyniową teorią patogenetyczną tej choroby. Zaburzenia autoregulacji naczyniowej, prowadząc do niedokrwienia i reperfuzji, mogą indukować uszkodzenia oksydacyjne [Siskova i Wilhelm 2001, Hirose i in. 2004]. Zależność pomiędzy funkcjonowaniem naczyń a stresem oksydacyjnym jest związana również z fizjologiczną aktywnością śródbłonna naczyń, który reguluje ich przepuszczalność, uwalniając endoteliny i tlenek azotu (NO) – związek, który może uszkadzać trabekulum [Tamm i in. 1996, Wiederholt 1998]. Endoteliny także mogą wpływać na funkcjonowanie beleczkowania [Wiederholt 1998] i regulację ciśnienia wewnątrzgałkowego (IOP) [Haefliger i in. 1999], szczególnie przez indukowanie skurczu naczyń [Orgul i in. 1999].

W badaniach *in vitro* wykazano, że nadtlenuk wodoru dodany do komórek beleczkowania zaburza adhezję komórek i zagraża ich integralności [Zhou i in. 1999]. W badaniu *in vivo* nadtlenuk wodoru zaburzał odpływ cieczy wodnistej z komory przedniej [Kahn i in. 1983]. W badaniach *in vivo* przeprowadzonych z udziałem ludzi wykazano, że oksydacyjne uszkodzenie DNA jest znacznie częstsze w komórkach beleczkowania u pacjentów z jaskrą w porównaniu z osobami zdrowymi [Izzoti i in. 2003]. Ponadto wykazano, że u ludzi zarówno podwyższenie IOP, jak i ubytki w polu widzenia są związane ze zjawiskiem stresu oksydacyjnego, występującego w komórkach trabekulum [Sacca i in. 2005].

Produkcja wolnych rodników w beczkowaniu jest spowodowana wieloma czynnikami i wynika z różnych mechanizmów działania, jednak główną rolę wydaje się odgrywać endogenny metabolizm tlenowy. Układy biologiczne mają efektywne mechanizmy chroniące przed działaniem wolnych rodników. W oku istotną rolę protekcyjną odgrywa kwas askorbinowy, a jego wysokie stężenie odnotowano w ciele szklistym [Hanashima i Namiki 1999], rogówce [Brubaker i in. 2000], filmie łzowym [Dreyer i Rose 1993], śródbłonu rogówki [Ringvold i in. 2000] i cieczy wodnistej [Giblin 1984, Richer i Rose 1998]. Kolejnym antyoksydantem występującym w strukturach oka jest zredukowany glutation – tripeptyd zbudowany z trzech aminokwasów (cysteiny, kwasu glutaminowego, glicyny) [Barksdale-Sbhuyan 1986]. Chroni on tkanki przed uszkodzeniami spowodowanymi działaniem nadtlenu wodoru, podobnie jak układ katalaza – dysmutaza ponadtlenkowa [Riley 1990, Costarides i in. 1991]. Wysokie stężenia glutationu występują w cieczy wodnistej i w trabekulum [Kahn i in. 1983]. Wykazano, że najpoważniejsze zmiany w beczkowaniu w JPOK występują w warstwie anatomicznej, pozostającej w bliskim kontakcie z komorą przednią [Alvarado i in. 1984]. Może to sugerować, że substancje toksyczne (wolne rodniki) obecne w cieczy wodnistej przyczyniają się do uaktywnienia patologicznych procesów w trabekulum, którego komórki są narażone na większe stężenia nadtlenu wodoru [Kahn i in. 1983]. W warunkach fizjologicznych nadtlenek wodoru jest neutralizowany przez układ antyoksydacyjny, zanim dojdzie do uszkodzenia drogi odpływu cieczy wodnistej [Kahn i in. 1983]. Jednak gdy mechanizm ten nie funkcjonuje prawidłowo, dochodzi do uszkodzenia oksydacyjnego struktur trabekulum.

Wykazano liniową zależność pomiędzy redukcją komórek beczkowania a wiekiem. Szacuje się, że co roku traconych jest około 0,58% komórek. Wykazano także, że opór odpływu cieczy wodnistej wzrasta w obecności wysokich poziomów nadtlenu wodoru [Kahn i in. 1983]. Nadtlenek wodoru wpływa na przyleganie komórek beczkowania do białek macierzy zewnątrzkomórkowej, zaburzając ich adhezję i powodując ich utratę [Zhou i in. 1999]. Także inne badania potwierdzają, że stres oksydacyjny może zaburzać prawidłowe funkcjonowanie beczkowania [Barksdale-Sbhuyan 1986, Tamm i in. 1996, Caballero i in. 2003, Veach 2004].

Hipoteza, że neuropatia jaskrowa jest wynikiem postępującego uszkodzenia oksydacyjnego beczkowania została potwierdzona w badaniach *in vivo*. Jak wykazano, uszkodzenie oksydacyjne DNA komórek beczkowania występuje częściej u osób chorujących na jaskrę niż u osób zdrowych [Izzoti i in. 2003]. Potwierdzają to także wyniki innych badań [Sacca i in. 2005]. Również inne czynniki przemawiają za faktem, że jest to raczej przyczyna, a nie skutek uszkodzenia jaskrowego, bowiem u pacjentów z jaskrą odnotowano zmniejszenie całkowitego potencjału antyoksydacyjnego w cieczy wodnistej [Ferreira SM i in. 2004]. Zaobserwowano także wzrost poziomu przeciwciał przeciwko transferazie-S-glutationu w surowicy [Yang i in. 2001], obniżenie osoczowego poziomu glutationu [Gherghel i in. 2005] i wzrost produktów peroksydacji lipidowej w osoczu [Yildirim i in. 2005].

Powstawanie wolnych rodników tlenowych w siateczce trabekulum wynika zarówno z metabolizmu tlenowego, jak i z zaburzeń autoregulacji naczyniowej. Śródbłonek naczyń uwalnia endoteliny i tlenku azotu (NO). Obecność wolnych rodników i NO prowadzi do powstawania toksycznych związków reagujących z tlenem, żelazem lub miedzią

[Haefliger i in. 1999], co może upośledzać prawidłowe funkcjonowanie beleczkowania [Tamm i in. 1996, Orgul i in. 1999, Izzoti i in. 2006].

Rola NO nie ogranicza się tylko do przeciwdziałania wzrostowi napięcia naczyń, jak sugeruje naczyniowa teoria patogenetyczna jaskry [Richer i Rose 1998]. Tlenek azotu odgrywa istotną rolę w procesach fizjologicznych układu nerwowego, zarówno jako cząsteczka sygnałowa, jak i modulator komórkowej pompy sodowej [Nathanson i in. 1995]. Tlenek azotu zwiększa produkcję glutamianu i innych cząsteczek sygnałowych, które z kolei zaburzają aktywność zależnej od ATP pompy sodowo-potasowej. Mechanizm ten leży u podłoża wielu chorób degeneracyjnych [Choi 1998], w tym jaskry [Ellis i Nathanson 1998]. Tlenek azotu reagując z anionem ponadtlenkowym może tworzyć związki potencjalnie neurotoksyczne. Zjawisko to dotyczy też neuronów w siatkówce [Lipton 1999].

Dane te sugerują, że stres oksydacyjny odgrywa istotną patogenetyczną rolę nie tylko w indukowaniu procesów degeneracyjnych w komórkach beleczkowania, ale również w uszkodzeniach tarczy nerwu wzrokowego i nerwowych dróg dośrodkowych [Sacca i in. 2005].

W badaniach przeprowadzonych na modelach zwierzęcych wykazano, że komórki zwojowe siatkówki obumierają na drodze apoptozy [Kerrigan 1997]. Genetycznie uwarunkowana, zaprogramowana śmierć komórki może indukować postępujące uszkodzenie neuronalne siatkówki [Levin 1999, Kikuchi i in. 2000, Tatton i in. 2001]. Jednym z głównych czynników wywołujących apoptozę komórek zwojowych siatkówki jest niedotlenienie [Tezel i Yang 2004], toksyczny efekt działania glutamianu [Meldrum i Garthwaite 1990] i stres oksydacyjny [Moreno i in. 2004]. Można więc przypuszczać, że stres oksydacyjny indukujący proces jaskrowy powoduje postępującą degenerację beleczkowania, siatkówki i nerwu wzrokowego, przebiegającą na drodze apoptozy [Izzoti i in. 2006].

Istnieją doniesienia świadczące, że stosowanie preparatów o właściwościach antyoksydacyjnych (Ginkgo biloba) może korzystnie wpływać na przebieg jaskry [Quaranta i in. 2003, Kalisz 2007].

### **Zwyrodnienie plamki związane z wiekiem (AMD)**

Jest to choroba centralnej części siatkówki. Schorzenie jest jedną z najczęstszych przyczyn ślepoty, zwłaszcza w krajach rozwiniętych. Przyczyną są zmiany zanikowo-degeneracyjne siatkówki oraz neowaskularyzacja podsiatkówkowa w centralnej części siatkówki, zwanej plamką żółtą. Jak się wydaje, jedną z przyczyn tej choroby jest uszkodzenie wolnorodnikowe siatkówki [Kałużny i Kałużny 2002, Polaczek-Krupa i Czechowicz-Janicka 2004].

Siatkówka jest dobrym miejscem do tworzenia się wolnych rodników ze względu na bardzo wysokie zużycie tlenu. Oko narażone jest na działanie promieniowania UV oraz promieniowania widzialnego. Promieniowanie UV jest absorbowane przez soczewkę, a światło niebieskie dociera do siatkówki, gdzie jest pochłaniane.

Jak wykazano, chromatofory siatkówki, takie jak retinol i rodopsyna, generują tworzenie wolnych rodników. Komórki siatkówki charakteryzują się bardzo silnym metabolizmem i to prowadzi do powstawania wolnych rodników w trakcie przemian w łańcuchu oddechowym w mitochondrium. Ze względu na ciągłą ekspozycję na światło, szczególnie narażona jest plamka [Kałużny i Jurgowiak 1996].

Złogi lipofuscyny w nabłonku barwnikowym przyczyniają się do powstawania zwyrodnienia plamki związanego z wiekiem (AMD). Jak wykazano, mają one zdolność tworzenia wolnych rodników. Innym powodem wzrostu stężenia wolnych rodników w siatkówce jest proces fagocytozy szczytowych segmentów fotoreceptorów. Na działanie wolnych rodników narażone są głównie obwodowe części czopków, ze względu na zwiększoną zawartość wielonienasyconych kwasów tłuszczowych. W wyniku gromadzenia produktów rozpadu czopków tworzą się druzy. Powoduje to zaburzenia transportu substancji odżywczych i tlenu oraz wzrost oporu naczyń siatkówki. Efektem tych procesów są zaburzenia przepływu krwi, niedożywienie i atrofia [Kałużny i Jurgowiak 1996, Head 1999].

Siatkówka zawiera liczne mechanizmy obronne, takie jak zwiększone zawartości enzymów antyoksydacyjnych w warstwie barwnikowej (katalazy, peroksydazy glutationowej i dysmutazy ponadtlenkowej) oraz witaminy C, E, a także karotenoidów (luteina, zeaksantyna). Substancje te leżą powierzchnie i chronią przed promieniowaniem ultrafioletowym. Związki te wykazują także aktywność wymiataczy wolnych rodników. Do antyoksydantów działających ochronnie na siatkówkę należą także cynk oraz flawonoidy. Innym mechanizmem obronnym jest ciągła wymiana zewnętrznych części fotoreceptorów. Badania epidemiologiczne wykazały, że wysokie stężenie antyoksydantów w siatkówce i surowicy krwi działa ochronnie, zmniejszając ryzyko rozwoju AMD [Age-related Eye Disease Study Group 2001].

### **Zaćma**

Reaktywne formy tlenu oddziałujące z makrocząsteczkami soczewki są odpowiedzialne za jej zmętnienie. Wraz z wiekiem w soczewce obniża się aktywność wielu enzymów, takich jak dysmutaza ponadtlenkowa czy katalaza. Do soczewki, która nie jest unaczyniona dociera stosunkowo niewiele tlenu, głównie z otaczających tkanek. Soczewka charakteryzuje się także niskim poziomem metabolizmu. Głównym źródłem wolnych rodników w soczewce są reakcje fotochemiczne. Do soczewki dochodzą fale o długości większej niż 290 nm. Energia fotonów absorbowana jest przez chromatofory (np. ryboflawinę), które w obecności tlenu tworzą anionorodnik ponadtlenkowy. Przy udziale dysmutazy ponadtlenkowej anionorodnik ponadtlenkowy ( $O_2^{\cdot-}$ ) przechodzi w  $H_2O_2$ , który w reakcji Fentona przekształcany jest w rodnik hydroksylowy ( $OH^{\cdot}$ ), co doprowadza do uszkodzenia struktur soczewki. Do głównych antyoksydantów obecnych w soczewce należy witamina C i glutation, jednak z wiekiem ich zapasy wyczerpują się. Największe stężenie glutationu występuje w korze i w nabłonku soczewki, stosunkowo małe w jądrze. Glutation wykazuje aktywność wymiatacza wolnych rodników i jest niezbędnym składnikiem reakcji zachodzących z udziałem peroksydazy glutationowej. Kwas askorbinowy występuje w wysokich stężeniach w płynach i tkankach oka (w cieczy wodnistej oka w stężeniu 20 razy większym niż we krwi). W powstawaniu zaćmy korowej istotną rolę odgrywa uszkodzenie nabłonka soczewki przez promieniowanie UVB. Nabłonek ma najaktywniejszy metabolizm w soczewce, znajduje się tu także najwięcej enzymów antyoksydacyjnych. Mimo to, nabłonek jest najbardziej narażoną na stres oksydacyjny strukturą soczewki. Do nabłonka w pierwszej kolejności docierają fotony po przejściu przez rogówkę i ciecz wodnistą. Nabłonek jest także wrażliwy na działanie  $H_2O_2$ , znajdujący się w cieczy wodnistej. Uszkodzenia wolnorodnikowe dotyczą przede wszystkim grup sulfhydrylowych. Dochodzi do powstawania mostków dwusiarczkowych, co prowadzi do zmiany struktury grup i ich agregacji. Uszkodzeniu ulegają białka

strukturalne i enzymatyczne. Dochodzi także do procesu peroksydacji lipidowej, co prowadzi do zmian przepuszczalności błon komórkowych i zaburzeń jonowych w soczewce. Doprowadza to do zwiększenia zawartości wody i w efekcie do pęcznienia soczewki i tworzenia się przestrzeni wodnych. Pod wpływem stresu oksydacyjnego dochodzi również do apoptozy komórek nabłonka soczewki. W zaćmie jądrowej nie występują zmiany w stężeniu jonów sodu i potasu. Dochodzi do tworzenia złogów agregatów białkowych, które są wynikiem utleniania grup sulfhydrylowych. Powoduje to zmniejszenie przejrzystości soczewki. W badaniach przeprowadzonych na zwierzętach wykazano, że dodanie witaminy C lub E opóźnia rozwój zaćmy. Także w badaniach przeprowadzonych z udziałem ludzi wykazano, że u osób, u których nie występuje zaćma jest wyższe stężenie witamin o właściwościach antyoksydacyjnych (A, C i E), a suplementacja tymi witaminami zmniejsza ryzyko wystąpienia choroby [Kałużny i Jurgowiak 1996, Polaczek-Krupa i Czechowicz-Janicka 2004].

### **Choroby układu oddechowego**

Udział stresu oksydacyjnego w tych chorobach jest bardzo istotny. U osób z przewlekłym zapaleniem oskrzeli, astmą czy przewlekłą obturacyjną chorobą płuc zaobserwowano obniżoną aktywność dysmutazy nadadtlenkowej oraz podwyższoną aktywność oksydazy ksantynowej – enzymu odpowiedzialnego za powstawanie rodnika nadadtlenkowego [Zawadzka-Bartczak i in. 2001].

### **Choroby układu krążenia**

Jednym z ważnych elementów patogenetycznych chorób układu krążenia jest aktywność wolnych rodników. Bardzo ważnym elementem tego procesu jest uszkodzenie śródbłonna naczyń, który wydziela wiele substancji wazoaktywnych.

Oksydacyjna przemiana lipoprotein jest jednym z najważniejszych mechanizmów odpowiedzialnych za rozwój procesu miażdżycowego, który odgrywa kluczową rolę w patogenezie chorób układu krążenia. Proces ten doprowadza do tworzenia nadadtlenków lipidowych. W wyniku fagocytozy utlenionych cząsteczek lipoprotein powstają komórki piankowe, które przyczyniają się do rozwoju miażdżycy. Przeciwutleniacze i zmiatacze wolnych rodników mogą w znacznym stopniu ograniczyć stopień zaawansowania miażdżycy. Efekt działania wolnych rodników wpływa niekorzystnie na funkcje śródbłonna, powodując zahamowanie syntezy prostacykliny i tlenu azotu oraz zwiększenie syntezy endoteliny. W wielu badaniach wykazano wpływ działania wolnych rodników na rozwój choroby niedokrwiennej serca [Zawadzka-Bartczak i in. 2001, Ball 2001].

### **Choroby trzustki**

Wolne rodniki odgrywają istotną rolę w patogenezie ostrego zapalenia trzustki, a zaburzenia mechanizmów obronnych, w tym równowagi układu utleniacze – przeciwutleniacze, mogą korelować z przebiegiem choroby. Istnieją doniesienia świadczące o tym, że suplementacja witaminami C i E zmniejsza dolegliwości bólowe, zapobiega nawrotom choroby i łagodzi proces zapalny [Zawadzka-Bartczak i in. 2001].

### **Choroby wątroby**

Jednym z najważniejszych mechanizmów obronnych zapobiegających replikacji i penetracji wirusa zapalenia wątroby typu B w ostrej fazie zakażenia jest wytwarzanie wolnych rodników. W przewlekłych procesach zapalnych dochodzi do nadmiernego



wytwarzania wolnych rodników, co powoduje uszkodzenie enzymów błonowych hepatocytów. Może to prowadzić do włóknienia i marskości wątroby.

Wirus zapalenia wątroby typu C powoduje opóźnienie aktywacji systemu antyoksydacyjnego oraz uszkadza wątrobę przez wzrost peroksydacji związanej z odkładaniem żelaza. Proces ten, uszkadzając DNA i powodując mutacje genowe, może prowadzić do transformacji nowotworowej. Zaobserwowano także, że w tym schorzeniu dochodzi do zmniejszenia aktywności dysmutazy ponadtlenkowej. Podobne mechanizmy uszkodzenia wolnorodnikowego oraz korzystne działanie antyoksydantów opisywano w cholestazie wątrobowej oraz w alkoholowym zapaleniu wątroby [Zawadzka-Bartczak i in. 2001].

### **Choroby przełyku**

W zapaleniach przełyku wykazano wzrost aktywności wolnych rodników oraz obniżenie aktywności dysmutazy ponadtlenkowej. Jak się wydaje, może to mieć istotne znaczenie w mechanizmie procesu zapalnego [Zawadzka-Bartczak i in. 2001].

### **Cukrzyca**

Glukoza reaguje w ustroju z napotkanymi grupami aminowymi, a w wyniku tej reakcji białka ulegają nieenzymatycznej glikozylacji (glikacji). Proces ten jest nasilony w cukrzycy ze względu na podwyższony poziom glukozy we krwi. Reakcje te są hamowane przez antyoksydanty, a katalizowane przez jony metali grup przejściowych. Glukoza w obecności jonów miedzi stymuluje peroksydację lipidów i degradację białek. Produkty glikacji ulegając utlenianiu są przyczyną powstawania reaktywnych form tlenu. Cukrzyca towarzyszy ogólnoustrojowy stres oksydacyjny. Także niektóre z powikłań cukrzycy, jak np. retinopatia cukrzycowa, są – jak się wydaje – spowodowane działaniem wolnych rodników [Derejczyk 1999, Ball 2003].

### **Choroby ośrodkowego układu nerwowego**

Mózg jest szczególnie wrażliwy na działanie stresu oksydacyjnego. Przypuszcza się, że mechanizm uszkodzenia wolnorodnikowego może odgrywać istotną rolę w patogenezie niektórych chorób ośrodkowego układu nerwowego. Istnieją doniesienia świadczące, że wzmożone utlenianie dopaminy, prowadzące do wytwarzania reaktywnych form tlenu może być przyczyną postępującego obumierania neuronów substancji czarnej mózgu podczas starzenia się i w chorobie Parkinsona. Niektórzy autorzy sugerowali, że reaktywne formy tlenu (RFT) mogą odgrywać istotną rolę w epizodach demielinizacji występujących w przebiegu stwardnienia rozsianego. Reaktywne formy tlenu mogą odgrywać również ważną rolę w etiopatogenezie choroby Alzheimera. W osoczu krwi pacjentów cierpiących na to schorzenie wykazano podwyższony poziom nadtlenków lipidów oraz obniżony poziom dysmutazy ponadtlenkowej. Jak wykazano, niektóre leki o właściwościach antyoksydacyjnych przedłużają życie neuronu. Do leków tych należą: selegilina, idebenon oraz duże dawki witaminy E [Ball 2003, Wehr 2006].

### **Choroby nowotworowe**

Powstawanie nowotworów jest procesem wieloetapowym, kontrolowanym przez wiele genów, które w swojej normalnej postaci określane są jako protoonkogeny. Jak wykazano, reaktywne formy tlenu (RFT) zwiększają ekspresję niektórych protoonkogenów. W badaniach *in vitro* stwierdzono, że RFT mogą stymulować ekspresję takich onkogenów jak *c-fos*, *c-myc* i *H-ras*. Reaktywne formy tlenu mogą uszkadzać DNA, powodując mutacje, co może przyspieszać transformację nowotworową. Istnieją doniesienia

wskazujące, że działanie mutagenów odpowiedzialne za inicjację procesu nowotworowego może wyrażać się wytwarzaniem wolnych rodników. Stosowanie diety z dużą zawartością antyoksydantów ma działanie ochronne. Warto dodać, że spośród wszystkich zewnętrznych czynników ryzyka zachorowań na raka pierwsze miejsce zajmuje niewłaściwa dieta [Derejczyk 1999, Ball 2003, Wolski i Karwat 2004, Wolski i in. 2005].

### **Aktywność antyoksydacyjna**

Antyoksydanty to substancje, które w niewielkich stężeniach chronią przed utlenianiem lub opóźniają utlenianie substratów. Jest to duża grupa związków chemicznych, takich jak dysmutaza ponadtlenkowa, glutation, tokoferole, polifenole, lignany czy terpenoidy. Przeciwutleniaczami nazywa się także niektóre półsyntetyczne analogi substancji roślinnych, naturalne ekstrakty roślinne, syntetyczne dodatki do żywności czy leki [Wolski i Karwat 2004, Wolski i in. 2005]. Nie wszystkie mechanizmy patologiczne związane z aktywnością wolnych rodników są do końca poznane, jednak już teraz wiadomo, że spożywanie antyoksydantów w diecie i utrzymywanie ich prawidłowego poziomu w organizmie ma kluczowe znaczenie dla zachowania zdrowia. Takie antyoksydanty jak związki polifenolowe, flawonoidy, taniny, kwas askorbinowy, karotenoidy czy antocyjanozydy mają korzystny wpływ na wiele chorób [Kalisz i in. 2005, Wolski i in. 2007].

### PIŚMIENNICTWO

- Age-related Eye Disease Study Group 2001. A randomized, placebo-controlled, clinical trial of high-dose supplementation with vitamins C and E, beta carotene, and zinc for age-related macular degeneration and vision loss: AREDS report no. 8. *Arch. Ophthalmol.* 119(10), 1417–1436.
- Alvarado J. A. i in. 1984. Trabecular meshwork cellularity in primary open-angle glaucoma and nonglaucomatous normals. *Ophthalmology* 91, 564–579.
- Alvarado J. A. i in. 1981. Age-related changes in trabecular meshwork cellularity. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 21, 714–727.
- Ball S. 2001. Antyoksydanty w medycynie i zdrowiu człowieka. Medyk, Warszawa.
- Ball S. 2000. Naturalne substancje przeciwnowotworowe. Medyk, Warszawa.
- Barksdale-Sbhuyan K. 1986. Oxidative stress in cultured human trabecular cells suppression of prostaglandin production. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 27 (Suppl) 210–214.
- Bartosz G. 2003. Druga twarz tlenu. PWN, Warszawa.
- Brubaker R.F. i in. 2000. Ascorbic acid content of human corneal epithelium. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 41, 1681–1683.
- Caballero M. i in. 2003. Proteasome inhibition by chronic oxidative stress in human trabecular meshwork cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 308, 346–352.
- Chen JZ, Kadlubar F. F. 2003. A new clue to glaucoma pathogenesis. *Am. J. Med.* 114, 697–698.
- Choi D. W. 1998. Glutamate neurotoxicity and diseases of nervous system. *Neuron* 1, 623–634.
- Costarides M. V. i in. 1991. Roles of catalase and the glutathione redox cycle in the regulation of the anterior-chamber hydrogen peroxide. *Ophthalmol. Res.* 23, 284–294.
- De Flora S. i in. 1989. Role of glutathione and N-acetylcysteine as inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. CRC Press, Boca Raton, Florida USA, pp. 19–53.
- De Flora S. i in. 1996. DNA Adducts and chronic degenerative diseases. Pathogenetic relevance and implications in preventive medicine. *Mutat. Res. Rev.* 366, 197–238.
- Derejczyk J. 1999. Znaczenie reakcji wolnorodnikowych w powstawaniu chorób. *Post. Nauk Med.* 12(4), 8–14.

- Djordjevic V.B. 2004. Free radicals in cell biology. *Int. Rev. Cytol.* 237, 57–89.
- Dreyer R., Rose R.C. 1993. Lachrymal gland uptake and metabolism of ascorbic acid. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 202, 212–216.
- Ellis D., Nathanson J. 1998. Nitric oxide in the human eye: sites of synthesis and physiologic actions on intraocular pressure, blood flow, sodium transport and neuronal viability [in:] I.O. Haefliger, J. Flammer (eds) Nitric oxide and endothelin in the pathogenesis of glaucoma, Lippincut-Raven, Philadelphia, New York, pp. 178–204.
- Ferreira S.M. i in. 2004. Oxidative stress markers in aqueous humor of glaucoma patients. *Am. J. Ophthalmol.* 137, 62–69.
- Fitak E. Grzegorzczak-Jaźwińska A. 1999. Wolne rodniki i ich aktywność w układach biologicznych. *Nowa Stomatologia* 3, 27–30.
- Gherghel H.R. i in. 2005. Systemic reduction in glutathione levels occurs in patients with primary open-angle glaucoma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 46, 877–883.
- Giblin F.J. 1984. A direct correlation between the levels of ascorbic acid and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in aqueous humor. *Exp. Eye. Res.* 38, 87–93.
- Gonet B. 1996. Wolne rodniki i antyoksydanty w zdrowiu i chorobie. *Czynniki Ryzyka* 1(11), 5–14.
- Haefliger L.O. i in. 1999. Potential role of nitric oxide and endothelin in the pathogenesis of glaucoma. *Surv. Ophthalmol.* 43, 51–58.
- Hanashima C., Namiki H. 1999. Reduced viability of vascular endothelial cells by high concentration of ascorbic acid in vitreous humor. *Cell. Biol. Int.* 23, 287–298.
- Head K. 1999. Natural therapies for ocular disorders, Part 1: diseases of the retina. *Altern. Med. Rev.* 4(5), 342–359.
- Hirose F. i in. 2004. *In vivo* evaluation of retinal injury after transient ischemia in hypertensive rats. *Hypertension* 43, 1098.
- Hofmanova J. i in. 2004. The effects of parenteral lipid emulsions on cancer and human colon epithelial cells *in vitro*. *Physiol. Res.* 9.
- Izzoti A. i in. 2006. The role of oxidative stress in glaucoma. *Mutat. Res.* 612, 105–114.
- Izzoti A., Sacca S.C. i in. 2003. Oxidative deoxyribonucleic acid damage in the eyes of glaucoma patients. *Am. J. Med.* 114, 638–646.
- Kahn M. G. i in. 1983. Glutathione in calf trabecular meshwork and its relation to aqueous humor outflow facility. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 24, 1283–1287.
- Kalisz O. 2007. Wpływ neuroprotektoryjnych i antyoksydacyjnych właściwości Ginkgo biloba na przebieg jaskry z normalnym ciśnieniem wewnątrzgałkowym. Rozprawa doktorska, AM Lublin.
- Kalisz O., Wolski T., Gerkowicz M. 2005. Terapia zaburzeń krążenia obwodowego i mózgowego przy użyciu preparatów z miłorzębu dwuklapowego (Ginkgo biloba). *Postępy Fitoterapii* 6 3/4, 91–97.
- Kałużny B., Kałużny J. 2002. Czynniki ryzyka i profilaktyka starczego zwyrodnienia płamki. *Okulistyka* 5(2), 9–14.
- Kałużny J., Jurgowiak M. 1996. Udział reaktywnych form tlenu w patogenezie wybranych chorób oczu. *Klinika Oczna* 98(2), 145–149.
- Kerrigan L.A. 1997. Tunel-positive ganglion cells in human primary open-angle glaucoma. *Arch. Ophthalmol.* 115, 1031–1035.
- Kikuchi M. i in. 2000. Role of p38 mitogenactivated protein kinase in axotomy-induced apoptosis of rat retinal ganglion cells. *J. Neurosci.* 1 (20), 5037–5044.
- Ko M.L., Hu D.N. i in. 2000. The combined effect of brain-derived neurotrophic factor and a free radical scavenger in experimental glaucoma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 41, 2967–2971.
- Levin L. A. 1999. Direct and indirect approaches to neuroprotective therapy of glaucomatous optic neuropathy. *Surv. Ophthalmol.* 43, 98–101.

- Lewiński A., Sewerynek E. 2000. Zmianacze wolnych rodników. *Praktyczna Medycyna* 9(23), 100–104.
- Lipton S. A. 1999. Neuronal protection and destruction by NO, *Cell Death Differ.* 6, 943–951.
- McCord J. 1993. Oxygen-derived free radicals. *New Horizons*, 1, 70–76.
- Meldrum B., Garthwaite J. 1990. Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease. *Trends. Pharmacol. Sci.* 11, 379–387.
- Moreno M.C., Campanelli J., Sande P., Sandez D. A. 2004. Retinal oxidative stress induced by high intraocular pressure. *Free Radic. Biol. Med.* 37, 803–812.
- Nathanson J. A. i in. 1995. The cellular Na<sup>+</sup> pump as a site of action for carbon monoxide and glutamate: a mechanism for long-term modulation of cellular activity. *Neuron*. 14, 781–794.
- Orgul S. i in. 1999. Physiology of perfusion as it relates to the optic nerve head. *Surv. Ophthalmol.* 43, 17–26.
- Polaczek-Krupa B., Czechowicz-Janicka K. 2004. Rola antyoksydantów w profilaktyce i leczeniu chorób oczu. *Ordynator Leków* 4(30).
- Quaranta L. i in. 2003. Effect of Ginkgo biloba extract on preexisting visual field damage in normal tension glaucoma. *Ophthalmology* 110(2), 359–362. 362.
- Richer S.P., Rose R.C. 1998. Water soluble antioxidants in mammalian aqueous humor: interaction with UV B and hydrogen peroxide. *Vision. Res.* 38, 2881–2888.
- Riley M. V. 1990. Physiologic neutralization mechanisms and their response of the corneal endothelium to hydrogen peroxide. *CLAO J* 16, 16–21.
- Ringvold A. i in. 2000. Distribution of ascorbate in the anterior bovine eye. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 41, 20–23.
- Sacca S. C. Et i in. 2005. Oxidative DNA damage in human trabecular meshwork and its correlation with intraocular pressure and visual field in primary open angle glaucoma. *Arch. Ophthalmol.* 123, 458–463.
- Siskova A. Wilhelm J. 2001. The effects of hyperoxia, hypoxia, and ischemia/reperfusion on the activity of the rat retina. *Physiol. Res.* 50, 267–273.
- Tamm E.R. i in. 1996. Human and monkey trabecular meshwork accumulate alpha B-crystallin in response to heat shock and oxidative stress. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 37. 2402–2413.
- Tatton N.A. i in. 2001. *In situ* detection of apoptosis in normal pressure glaucoma. A preliminary examination. *Surv. Ophthalmol.* 45, 268–272.
- Tezel G., Yang X. 2004. Caspase-independent component of retinal ganglion cell death, *in vitro*. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 45, 4049–4059.
- Truscott R.J. 2005. Age-related nuclear cataract oxidation is the key. *Exp. Eye. Res.* 80, 709–725.
- Veach J. 2004. Functional dichotomy: glutathione and vitamin E in homeostasis relevant to primary open angle glaucoma. *Br. J. Nutr.* 91. 809–829.
- Wehr H. 2006. Stres oksydacyjny i choroby neurodegeneracyjne. *Czynniki Ryzyka* 1, 3–8.
- Wiederholt M. 1998. Nitric oxide and endothelin in aqueous humor outflow regulation, New York, pp. 168–177.
- Włodek L. 2004. Reaktywne formy tlenu (RFT) w warunkach fizjologicznych i patologicznych. Komórkowe systemy antyoksydacyjne. *Farmacja Polska* 60(9), 404–419.
- Wolski T., Kalisz O., Gerkowicz M., Smorawski M. 2007. Rola i znaczenie antyoksydantów w medycynie ze szczególnym uwzględnieniem chorób oczu. *Postępy Fitoterapii* 2.
- Wolski T., Karwat I.D. 2004. Profilaktyka i terapia skutków wadliwego żywienia. *Postępy Fitoterapii* 4, 178–182.
- Wolski T., Karwat I.D. Najda A. 2005. Kontaminacja i suplementacja żywności a zdrowie. *Postępy Fitoterapii*, 1–2, 35–41.
- Yang J. i in., 2001. Serum autoantibody against glutathione-S-transferase in patients with glaucoma. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 42, 1273–1276.

- Yildirim O. i in. 2004. Changes in antioxidant enzyme activity and malondialdehyde level in patients with age-related macular degeneration. *Ophthalmologica* 218, 202–206.
- Yildirim O. i in. 2005. Role of oxidative stress enzymes in open angle glaucoma. *Eye* 19, 580–583.
- Zachwieja J. i in. 2000. Wolne rodniki i mechanizmy antyoksydacyjne – ich rola w patogenezie chorób. *Pediatrica Praktyczna* 8(3), 267–274.
- Zawadzka-Bartczak E. i in. 2001. Rola wolnych rodników ponadtlenukowych w wybranych chorobach wewnętrznych. *Przegl. Med. Lotniczej* 3(7), 235–244.
- Zhou L. i in. 1999. Oxidative stress affects cytoskeletal structure and cell-matrix interactions in cells from an ocular tissue: the trabecular meshwork. *J. Cell. Physiol.* 180, 182–189.

**Summary.** In some pathological situations, like hyperoxy, ischemia/reperfusion, inflammation, the effect of some external factors (radiation or chemotherapy), over-production of free radicals occurs, which can lead to cellular damage or apoptosis induction. Both, free radicals and reactive oxygen particles may react with various cellular structures, which results in protein conversion, peroxidation of lipids or nucleic acids damage. Hyperactivity of reactive oxygen particles and disturbance of their production-neutralisation balance is described as oxidative stress. Free radicals' action and chronic oxidative stress is the primary ground for many neuro- degenerative, degenerative diseases and inflammation processes. Side effects of free radicals might contribute to heart, neurological and respiratory diseases, neoplasms, diabetes, atherosclerosis and some particular ophthalmic disorders, including cataract, glaucoma and age related macular degeneration. It is an important protective component to keep antioxydative activity at the proper level.

**Key words:** free radicals, oxydative stress, reactive oxygen particles