1. ROLA WOLNYCH RODNIKÓW W BIOLOGII

Wyjaśnienie mechanizmów reakcji chemicznych, zwłaszcza reakcji utleniania i redukcji, dało podstawy do wysunięcia hipotezy, że również wiele reakcji biochemicznych przebiega in vivo poprzez stadia wolnorodnikowe. Zastosowanie spektroskopii EPR do badań materiału biologicznego pozwoliło na weryfikację doświadczalną tej hipotezy, dzięki stwierdzeniu obecności wolnych rodników w tkankach liofilizowanych, a następnie w żywych komórkach. Zagadnienia te omówiliśmy bardziej szczegółowo w artykułach przeglądowych [109, 112, 113].

Badania przeprowadzone w okresie ostatnich 15 lat pozwoliły na oszacowanie, że stacjonarne stężenie wolnych rodników w tkankach zwierzęcych jest rzędu wielkości 10^{15}/g tkanki. Działanie czynników środowiskowych (promieniowanie jonizujące i UV, ultradźwięki, różnorodne substancje chemiczne) może przyczynić się do wzrostu zawartości wolnych rodników w tkankach.

1.1. Powstawanie wolnych rodników w komórce

Wolne rodniki mogą powstawać w wyniku reakcji kilku typów:

a) homolitycznego rozpadu cząsteczek - inicjatorów,

b) jednoelektronowych reakcji utleniania-redukcji,

c) radiolizy,

d) fotolizy.

W warunkach fizjologicznych głównym źródłem wolnych rodników są reakcje typu b. Wiele składników komórek ulega utlenieniu jednoelektronowemu, które może przebiegać spontanicznie lub być katalizowane przez enzymy. Akceptorem elektronu jest cząsteczka tlenu; w wyniku reakcji powstaje anionorodnik ponadtlenkowy($O_2^{\cdot}$) i

odpowiedni rodnik organiczny lub nieorganiczny. Właściwości anionorodnika ponadtlenkowego zostaną omówione bliżej w rozdziale 2.1.1. Związki, które reagują w powyższy sposób w warunkach fizjologicznych, to zredukowane pterydyny, flawiny, nukleotydy, aromatyczne aminokwasy i ich pochodne takie jak dopamina i adrenalina, związki tiolowe jak cysteina czy glutation oraz siarczyny [113].

Tlen cząsteczkowy może odrywać wodór od olefin z utworzeniem rodnika wodoronadtlenkowego ($HO_2^{\cdot}$), przy czym reakcja katalizowana jest przez jony metali. Jony żelazawe katalizują wolnorodnikowy rozkład nadtlenku wodoru, prowadzący do powstania bardzo reaktywnego rodnika hydroksylowego ($^{\cdot}OH$) (rozdz. 2.1.2).

Oddziaływanie wielu ksenobiotyków z komórkami uwarunkowane jest tworzeniem wolnych rodników, np. toksyczność czterochlorku węgla jest m. in. wynikiem powstawania rodników $CCl_3^{\cdot}$. Wolne rodniki tworzą się w wyniku reakcji ozonu z wieloma związkami organicznymi, zwłaszcza z podstawionymi alkenami, alkoholami, fenolami i wielonienasyconymi kwasami tłuszczowymi. Wolne rodniki generowane są także przez niektóre antybiotyki, jak streptonigryna czy bleomycyna. Inne grupy związków, które in vivo metabolizowane są poprzez stadia wolnorodnikowe, to związki nitroaromatyczne (np. metronidazol, nitrofurazon), barwniki azoniowe, pochodne fenylohydrazyny i niektóre pestycydy, np. parakwat [113].

Enzymy katalizujące reakcje prowadzące do powstawania anionorodnika ponadtlenkowego omówiliśmy w uprzedniej publikacji [112]. Należą do nich oksydaza ksantynowa (E.C. 1.2.3.2), oksydaza aldehydowa (E.C. 1.2.3.1), dehydrogenaza dihydroorotanowa (E.C. 1.3.3.1), oksydaza diaminowa (E.C. 1.4.3.6), reduktaza glutationowa (E.C. 1.6.4.2), peroksydaza z chrzanu i mieloperoksydaza z leukocytów (E.C. 1.11.1.7), pirolaza tryptofanowa (E.C. 1.13.1.12) i in.

Białkiem, które wytwarza anionorodniki ponadtlenkowe, jest także hemoglobina. Rodniki ponadtlenkowe uwalniane są również podczas transportu elektronów w łańcuchu oddechowym.

Przedstawione powyżej dane nie wyczerpują listy przykładów tworzenia się wolnych rodników w komórce. Mają one stanowić jedynie ilustrację powszechności występowania wolnych rodników w materiale biologicznym.

1.2. Reakcje wolnych rodników

Wolne rodniki mogą wchodzić w reakcje kilku zasadniczych typów [113], a mianowicie:

- przeniesienia atomu lub grupy atomów,
- addycji,
- przeniesienia elektronu,
- przegrupowania,
- β-eliminacji.

Najbardziej powszechne są reakcje oderwania atomu lub grupy atomów przez wolny rodnik i reakcje addycji rodnika do innej cząsteczki. Mają one szczególnie duże znaczenie w układach biologicznych, w przypadku gdy przebiegają z udziałem atomów siarki. Powstające rodniki organiczne $RS^{\bullet}$ mogą katalizować wymianę atomów wodoru pomiędzy cząsteczkami organicznymi, zaś w oddziaływaniu z łańcuchami polipeptydowymi rodniki te odrywają atomy wodoru głównie od węgli α. Kompetycja pomiędzy reakcjami różnych typów może prowadzić do złożonych zależności pomiędzy stopniem uszkodzenia makrocząsteczek przez wolne rodniki, stężeniem makrocząsteczek i stężeniem związków sulfhydrylowych [113].

Niezależnie od swej struktury, wszystkie wolne rodniki mogą przyłączać się do wiązań podwójnych. Reakcja przyłączenia rodnika do zasady kwasu nukleinowego może prowadzić do mutacji punktowej.

Reakcje przeniesienia elektronu odgrywają istotną rolę w uszkodzeniu makrocząsteczek przez promieniowanie jonizujące oraz w wielu reakcjach biochemicznych, np. w reakcji rodnika NAD$^{\bullet}$ z tlenem, prowadzącej do powstania anionorodnika ponadtlenkowego.

Reakcje wolnorodnikowe charakteryzują się niską specyficznością. Ogólną prawidłowością jest spadek specyficzności w miarę wzrostu reaktywności. Porównawcze badania reakcji kilku wolnych rodników z alkoholami pozwoliły na uszeregowanie ich według malejącej reaktywności: $Cl^{\bullet} > {}^{\bullet}OH > H^{\bullet} > CH_3^{\bullet} \approx RCH_2^{\bullet}$. Uszeregowanie tych rodników według rosnącej selektywności dało identyczną sekwencję $Cl^{\bullet} \approx {}^{\bullet}OH < H \approx CH_3^{\bullet} \approx RCH_2^{\bullet}$.

W reakcjach propagacji powstają rodniki o strukturze odmiennej od struktury rodnika inicjującego reakcję. Między innymi w wyniku reakcji tego typu może powstać najsilniejszy utleniacz obecny w układach biologicznych - rodnik hydroksylowy (rozdz. 2.1.2).

Reaktywność rodnika charakteryzowana jest na ogół przez podanie stałej szybkości reakcji rodnika z daną cząsteczką. Z biologicznego punktu widzenia równie istotny jest współczynnik inaktywacji, tj. prawdopodobieństwo utraty funkcji biologicznej cząsteczki po zajściu reakcji z wolnym rodnikiem [113].

Wartości współczynnika inaktywacji zależą od warunków reakcji. W obecności tlenu prawdopodobieństwo, że reakcja rodnika $^{\bullet}OH$ z makrocząsteczką doprowadzi do inaktywacji makrocząsteczki może być znacznie większe niż w warunkach beztlenowych. Porównanie wartości współczynników inaktywacji dla reakcji rodników $^{\bullet}OH$ i $O_2^{\dot{-}}$ z różnymi enzymami [113] wskazuje, że anionorodnik ponadtlenkowy inaktywuje szczególnie wydajnie enzymy posiadające funkcjonalne grupy sulfhydrylowe. Inaktywacja przez rodnik wodorotlenowy jest znacznie mniej wybiórcza.

Wzmożone wytwarzanie wolnych rodników, obserwowane w przypadku działania różnych czynników fizycznych i chemicznych na komórki, prowadzi do szeregu następstw szkodliwych z fizjologicznego punktu widzenia. Ekstrapolacja tych danych do poziomu fizjologicznej produkcji wolnych rodników sugeruje, że nawet te ich ilości, które wytwarzane są w toku normalnego metabolizmu mogą być odpowiedzialne za niestabilność układów biologicznych.

Produktami dysmutacji i innych reakcji rodników tlenowych $^{\bullet}OH$, $O_2^{\dot{-}}$ mogą być związki nie mające wprawdzie charakteru wolnych rodników, lecz również bardzo reaktywne i stanowiące kolejne zagrożenie dla składników komórki (H_2O_2, $^1O_2$).

Komórki rozporządzają rozmaitymi mechanizmami obronnymi przed wolnymi rodnikami i produktami ich rozpadu. Obejmują one występowanie w cytoplazmie i w fazie lipidowej błon biologicznych szeregu związków niskocząsteczkowych, zdolnych do reakcji z wolnymi rodnikami oraz różnych specyficznych enzymów ochronnych.

Do cytoplazmatycznych "zmiataczy wolnych rodników" należy zaliczyć glutation, jony Mn^{2+}, kwas askorbinowy i kwas moczowy oraz jego pochodne. Najbardziej istotna rola przypisywana jest w tej grupie związków glutationowi. W reakcji z wolnymi rodnikami two-

rzy on rodnik tiolowy ($GS^{\cdot}$), który w wyniku rekombinacji daje utleniony dimer glutationu (GS-SG).

Glutation chroni także komórki przed nadtlenkiem wodoru i nadtlenkami lipidów, gdyż reakcje katalizowane w komórkach zwierzęcych przez peroksydazę glutationową prowadzą do utlenienia glutationu i redukcji odpowiedniego nadtlenku.

Antyoksydanty hydrofobowe, obecne w fazie lipidowej błon komórkowych, to głównie tokoferole reagujące z wolnymi rodnikami i β-karoten mogący reagować z tlenem singletowym.

Enzymy chroniące komórki przed działaniem wolnych rodników i produktów ich dysmutacji to przede wszystkim dysmutaza ponadtlenkowa oraz katalaza i peroksydaza glutationowa, omówione w odrębnych artykułach [109, 112].

1.3. Uszkodzenie błon komórkowych przez wolne rodniki

Zarówno lipidowe, jak i białkowe składniki błon mogą być "tarczą" reakcji wolnorodnikowych. Podstawową rolę w uszkodzeniu błon komórkowych odgrywa proces peroksydacji lipidów.

Peroksydacja lipidów polega na łańcuchowych reakcjach wolnorodnikowych, prowadzących do rozpadu wielonienasyconych kwasów tłuszczowych na kilkuwęglowe fragmenty [198].

Czynnikami inicjującymi proces utleniania kwasów tłuszczowych są rodniki ponadtlenkowe [36, 229, 233] hydroksylowe [234], tlen singletowy [118, 202] oraz kwas askorbinowy [168], Cu^{2+} i Fe^{2+} [37, 134, 213, 255].

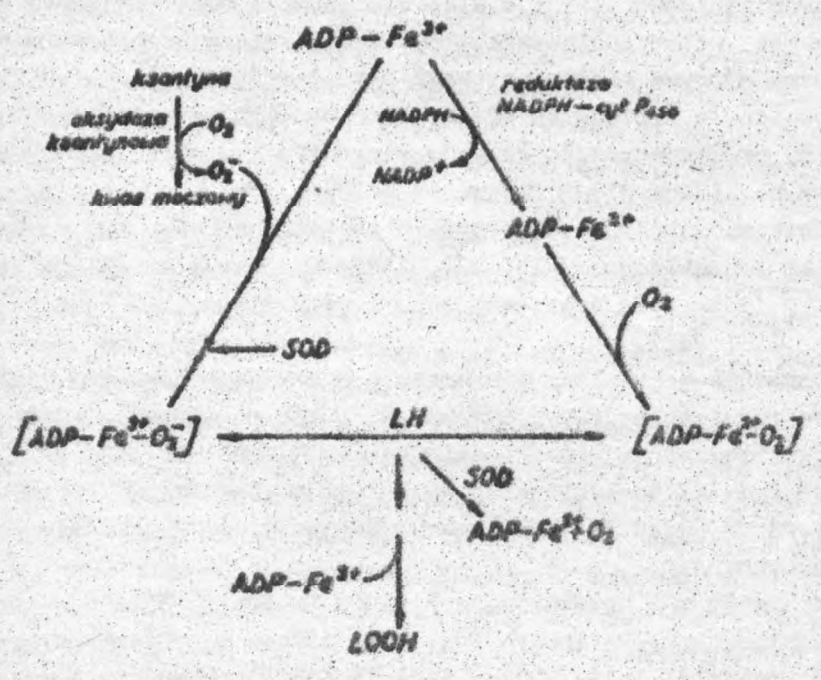
Proponowane mechanizmy przebiegu peroksydacji sugerują dominującą rolę rodników hydroksylowych w układach modelowych, w których rodniki generowane są w obecności czynników Fentona: Fe^{2+} i H_2O_2. Natomiast rodniki ponadtlenkowe stymulują peroksydację lipidów w enzymatycznych układach wytwarzania rodników, np. w układzie oksydazy ksantynowej.

Nieenzymatyczną peroksydację lipidów inhibują: katalaza, zmiatacze rodników hydroksylowych oraz EDTA dodany w stężeniu przewyższającym stężenie Fe^{2+} [234]. Podanie ADP do układu tylko w nieznacznym stopniu obniża szybkość peroksydacji lipidów. W obu przypadkach mamy do czynienia z hamowaniem procesu peroksydacji

wynikającym z samoutlenienia Fe^{2+} do Fe^{3+} w obecności chelatów żelaza. Powstający kompleks ADP-Fe^{3+}, stymuluje peroksydację lipidów, która nie jest już hamowana przez zmiatacze rodników hydroksylowych. Sugeruje to zmianę w udziale rodników w przebiegu procesu i wyłączenie rodników hydroksylowych z dalszych etapów peroksydacji z chwilą pojawienia się w układzie anionorodników ponadtlenkowych.

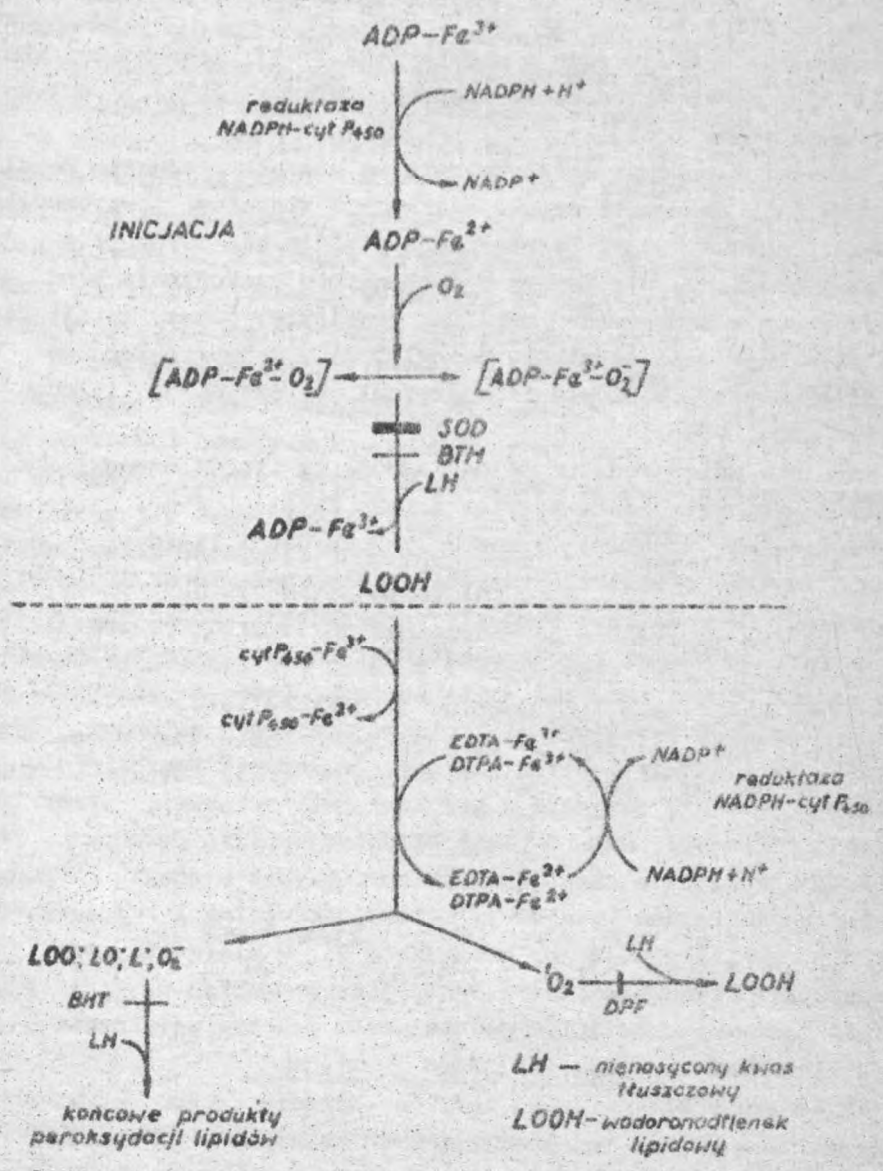
Modele enzymatycznych procesów peroksydacji lipidów sugerują identyczny mechanizm peroksydacji fosfolipidów mikrosomów wątroby inicjowanej przez NADPH [229] i fosfolipidów liposomów w obecności oksydazy ksantynowej [233].

Mechanizm enzymatycznej peroksydacji lipidów przedstawiają rys. 1 i 2. Kompleks ADP-Fe^{3+} jest albo bezpośrednio redukowany przez reduktazę NADPH-cyt P-450 w przypadku mikrosomów lub pośrednio przez anionorodniki ponadtlenkowe w obecności oksydazy ksantynowej. Rola ADP-Fe^{2+} w początkowym stapie peroksydacji lipidów polega na katalizowaniu procesu powstawania wodoronadtlenków lipidowych (LOOH).Powstałe wodoronadtlenki lipidów, zgodnie z dwustop-



Rys. 1. Powstawanie wodoronadtlenków lipidów (LOOH) stymulowane anionorodnikami ponadtlenkowymi, wytwarzanymi w układzie enzymatycznym w obecności oksydazy ksantynowej [233]

niowym mechanizmem peroksydacji (rys. 2), rozkładane są do reaktywnych intermediatów kwasów tłuszczowych przy udziale Fe^{2+}-EDTA i Fe^{2+}-DTPA. Produkty pośrednie włączając się w łańcuch reakcji wolnorodnikowych wytwarzają kilkuwęglowe fragmenty produktów peroksydacji łańcuchów nienasyconych kwasów tłuszczowych. Jednym z produktów tego rozpadu jest dialdehyd malonowy.



Rys. 2. Dwuetapowy mechanizm peroksydacji lipidów zależny od NADPH

Enzymatyczna peroksydacja lipidów hamowana jest przez dysmutazę oraz difenylofuran, zmiatacz tlenu singletowego i antyutleniacz, pochodną toluenu [36, 229, 233]. Zmiatacze rodników hydroksylowych natomiast nie hamują powyższej peroksydacji.

Procesy oksydatywnej degradacji lipidów według obu typów modeli różniących się w zasadzie tylko mechanizmem inicjacji hamowane są również przez kationy np. Mn^{2+}, Co^{2+}, Ce^{3+} i antyutleniacze rozpuszczalne w tłuszczach i wodzie [128, 165], zredukowany glutation [127], niskocząsteczkowe kompleksy miedzi [254], składniki cytoplazmatyczne [252].

Wykazano istnienie ścisłego związku pomiędzy stopniem hemolizy erytrocytów w obecności metali ciężkich a stopniem nagromadzenia produktów peroksydacji. Peroksydacja lipidów błonowych nie jest skutkiem hemolizy, ale jednym z mechanizmów uszkodzenia błon erytrocytarnych w indukowanej metalami hemolizie. Jony metali ciężkich stymulują samoutlenianie hemoglobiny z wytworzeniem rodników ponadtlenkowych, będących inicjatorami peroksydacji lipidów błonowych [204, 205].

Znacznie mniej podatne na degradację są lipidy błonowe komórek nowotworowych wątrobiaka Morrisa i raka Ehrlicha [13].

Pośrednimi skutkami procesu peroksydacji lipidów są degradacja i agregacja białek, "zszywki" białkowo-lipidowe i inaktywacja białek. Nierodnikowe produkty peroksydacji, takie jak aldehydy, ketony, nadtlenki i wodoronadtlenki lipidów mogą także uszkadzać białka błon i inne składniki komórek. Jeden z głównych produktów końcowych peroksydacji lipidów, dialdehyd malonowy, tworzy wiązania typu zasady Schiffa z grupami aminowymi fosfolipidów i białek. Może także reagować z resztami metionylowymi, tyrozylowymi i histydylowymi. Jako czynnik bifunkcyjny może powodować powstawanie agregatów białek. Inne aminoreaktywne produkty końcowe peroksydacji lipidów to aldehyd octowy, akroleina i propanal. "Barwnik starczy", lipofuscyna, gromadząca się w miarę starzenia się we wszystkich tkankach zwierzęcych, jest produktem reakcji białek i aminoreaktywnych związków powstających podczas peroksydacji lipidów błon komórkowych [113].

Zagadnienie biologicznej roli uszkodzenia błon komórkowych przez wolne rodniki i mechanizmu tych uszkodzeń od wielu lat znajduje się w centrum zainteresowania zespołu pracującego w Za-

kładzie Biofizyki Instytutu Biochemii i Biofizyki Uniwersytetu Łódzkiego. Głównym obiektem tych badań jest błona erytrocytarna, najlepiej poznana pod względem strukturalnym i funkcjonalnym błona komórkowa.

Szczególnie dogodne w badaniu roli wolnych rodników w wywoływaniu uszkodzeń błon są doświadczenia radiobiologiczne. Dobieranie odpowiedniego składu medium i warunków napromieniowania oraz użycie specyficznych zmiataczy poszczególnych typów wolnych rodników pozwalają na określenie ich udziału w popromiennym uszkodzeniu błon, a zatem i ocenę ich roli w uszkodzeniu błon komórkowych w warunkach fizjologicznych. Prace wykonane w Zakładzie Biofizyki UŁ pozwoliły na stwierdzenie, że $^{\cdot}OH$ a nie $O_2^{\cdot}$ jest produktem radiolizy odpowiedzialnym głównie za popromienną hemolizę erytrocytów. Dalsze badania tego zespołu wykazały, że działanie produktów radiolizy wody na błonę erytrocytarną powoduje zmiany konformacji białek błony, peroksydację lipidów, zmiany stopnia uporządkowania lipidów, wzrost przepuszczalności dla anionów i nieelektrolitów, zmiany oporności osmotycznej, spadek zawartości grup -SH i aktywności ATP-azy w błonie [113]. W przypadku zmian konformacyjnych białek błony i peroksydacji lipidów zmiatacze rodnika hydroksylowego wykazywały działanie ochronne, sugerując decydującą rolę $^{\cdot}OH$ w wywoływaniu tych uszkodzeń błony [82].

W Zakładzie Biofizyki UŁ prowadzone są również prace dotyczące procesów starzenia się komórek i organizmów, które powiązane są z zagadnieniem biologicznej roli wolnych rodników. Zagadnieniu temu poświęcona jest praca habilitacyjna G. Bartosza, pt. "Zmiany krwinek czerwonych krowy podczas starzenia się in vivo" (Łódź 1982).

2. MECHANIZMY POWSTAWANIA I TOKSYCZNOŚĆ WOLNYCH RODNIKÓW W KOMÓRCE

2.1. Produkty radiolizy wody

W wyniku oddziaływania promieniowania jonizującego z roztworami wodnymi w atmosferze beztlenowej po czasie około 10^{-10}s występują w wodzie

e^-_{aq}, $H^\bullet$, $^\bullet OH$, H_2 i H_2O_2

W obecności tlenu rodniki o charakterze reduktorów, tj. elektrony uwodnione i rodniki wodorowe, zanikają w czasie około 10^{-8}s po akcie pierwotnym, a w miejsce ich powstają rodniki wodoronadtlenkowe ($HO_2^\bullet$) i anionorodniki ponadtlenkowe ($O_2^{\bullet-}$). Dalsze reakcje produktów radiolizy wody zachodzą głównie z udziałem rodników hydroksylowych i anionorodników ponadtlenkowych oraz nadtlenku wodoru. Poniżej omówione zostaną ogólne właściwości dwóch ostatnich rodników z uwzględnieniem ich roli w układach biologicznych.

2.1.1. Anionorodnik ponadtlenkowy

Anionorodnik ponadtlenkowy i rodnik wodoronadtlenkowy są produktami pośrednimi wielu reakcji chemicznych. Rodzaj i ilość reaktywnych rodników powstających w roztworach zależy głównie od pH. Rodniki wodoronadtlenkowe występują przy pH < 5. W fizjologicznym zakresie pH są one prawie całkowicie zdysocjowane na proton i rodnik ponadtlenkowy

$$HO_2^\bullet \xrightleftharpoons{pK = 4,8} H^+ + O_2^{\bullet-}$$

W przypadku braku innych substancji ulegają spontanicznej dysmutacji w następujących reakcjach [21, 22]:

$$HO_2^\bullet + HO_2^\bullet \longrightarrow O_2 + H_2O_2 \qquad k = 8,6 \times 10^5\ M^{-1} \cdot s^{-1}$$

$$HO_2^\bullet + O_2^{\bullet-} \longrightarrow O_2 + HO_2^- \xrightleftharpoons{H_2O} O_2 + H_2O_2 + OH^- \qquad k = 1 \times 10^8\ M^{-1} \cdot s^{-1}$$

$$O_2^{\bullet-} + O_2^{\bullet-} \longrightarrow O_2 + O_2^{2-} \xrightleftharpoons{2H_2O} O_2 + H_2O_2 + 2OH^- \qquad k < 0,35\ M^{-1} \cdot s^{-1}$$

W reakcji enzymatycznej dysmutacji katalizowanej przez dysmutazę ponadtlenkową (E.C. 1.15.1.1) określaną skrótem SOD, anionorodniki ponadtlenkowe dysmutują do H_2O_2 i O_2

$$2O_2^{\bullet-} + 2H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2 \qquad k = 2,37 \times 10^9\ M^{-1} \cdot s^{-1} \quad [63]$$

Szybkość tej reakcji jest tak duża, że limituje ją szybkość dyfuzji i zwiększenie lepkości środowiska zwalnia przebieg enzymatycznej dysmutacji [210].

W celu bliższego scharakteryzowania anionorodnika ponadtlenkowego omówione zostaną jego właściwości fizykochemiczne oraz procesy powstawania tego rodnika.

Anionorodnik ponadtlenkowy występuje w formie mezomerycznej, zawierającej zarówno jedno- jak i trójelektronowe wiązanie chemiczne. Długość wiązania O–O w rodniku ponadtlenkowym jest wartością pośrednią pomiędzy długością wiązania dla tlenu i nadtlenku. Rodnik $O_2^{\cdot-}$ jest paramagnetyczny dzięki obecności jednego niesparowanego elektronu. Budowa elektronowa rodnika oraz inne jego właściwości fizyczne [218] są następujące:

- Budowa elektronowa, $O_2^{\cdot-}$

$$(1\sigma_s)^2\ (1\sigma_s^*)^2\ (2\sigma_s^*)^2\ (2\sigma_s)^2\ (\sigma p)^2$$

$$(\pi_z)^2\ (\pi_x)^2\ (\pi_z^*)^2\ (\pi_x^*)^1$$

- Długość wiązania O–O

$O_2^{\cdot-}$ – 1,28 Å

O_2 – 1,21 Å

O_2^{2-} – 1,49 Å

- Widmo absorpcyjne w UV

$O_2^{\cdot-}$ (w roztworach wodnych), 245 nm (ϵ = 2350 ±120 $M^{-1} \cdot cm^{-1}$)

$HO_2^{\cdot}$ (w roztworach wodnych), 225 nm (ϵ = 1400 ± 80 $M^{-1} \cdot cm^{-1}$)

$O_2^{\cdot-}$ (CH_3CN) 255 nm (ϵ = 1460 $M^{-1} \cdot cm^{-1}$)

- Widmo EPR, $O_2^{\cdot-}$

roztwory wodne (102 K), $g_{\parallel}$ = 2,10, $g_{\perp}$ = 2,00

DMSO (77 K), $g_{\parallel}$ = 2,11, $g_{\perp}$ = 2,00

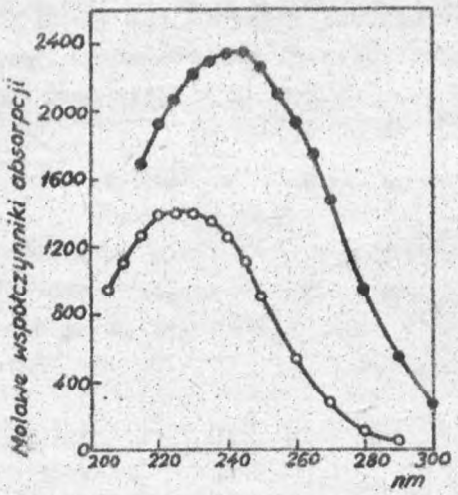
CH_3CN (77 K), $g_{\parallel}$ = 2,083, $g_{\perp}$ = 2,008

- Ciepło hydratacji, $-\Delta H \cong 418$ kJ

- Potencjał redoks, E^0,

$O_2^{\cdot-}$, H_2O (pH 7-14)	-0,16 V
DMSO	-0,60 V
$HO_2^{\cdot}$, H_2O (pH 0)	+0,12 V
DMSO	+0,12 V

Widmo absorpcyjne rodnika ponadtlenkowego i wodoronadtlenkowego przedstawia rys. 3. Rodniki te swoimi właściwościami przypominają fluorki i zdolne są tworzyć wyjątkowo silne wiązania wodorowe z wodą [218].



Rys. 3. Widma absorpcyjne, otrzymane metodą radiolizy impulsowej, rodnika wodoronadtlenkowego (o-o) w roztworze $HClO_4$, pH 1,5 i anionorodnika ponadtlenkowego (•-•) w roztworze 0,01 $mol \cdot l^{-1}$ mrówczanu sodowego zawierającego 0,1 $mol \cdot l^{-1}$ EDTA pH 10,5 [21]

Rodnik ponadtlenkowy wytwarzany jest we wszystkich organizmach tlenowych [71]. Cechują go odmienne właściwości chemiczne w roztworach wodnych i w rozpuszczalnikach organicznych. W środowisku wodnym jest słabą zasadą, umiarkowanym reduktorem i słabym utleniaczem [93]. W rozpuszczalnikach organicznych jest silniejszą zasadą, ale pod względem reaktywności wyraźnie różny jest od rodników organicznych [217]. Wbrew przyjętym wcześniej sugestiom, okazało się, że anionorodnik ponadtlenkowy nie jest tak reaktywny jak wydawało się wielu badaczom. Mimo to zadziwia wszechstronnością występowania i możliwością udziału w licznych reakcjach jako ich produkt lub prekursor.

Rodnik ponadtlenkowy reaguje z szeregiem substancji z efektywnością wyznaczoną przez charakter anionowy i potencjał oksydoredukcyjny tych substancji [196]. Uczestniczy w reakcjach redukcji i utleniania metali i ich kompleksów [103, 217, 218], tworzy związki addytywne z różnymi rodnikami [218], kompleksy nadtlenkowe z metalami, jest produktem pośrednim lub końcowym w procesie samoutleniania metali, bierze także udział w utlenianiu zredukowanych flawin, hydrazyn i hydroksyloamin [217, 218]. W reakcjach z chinonami, SO_2 i cytochromem c rodnik przyjmuje właściwości reduktora. Anionorodnik ponadtlenkowy jest również efektywnym czynnikiem redukującym dla wielu metali i ich kompleksów: Cu(II), Mn(III), Fe(III), Fe(III) EDTA, Mn(III) EDTA, $Mn(IV)_2O_2$-α-o-9,10--fenantrolina, $Co(III)(o\text{-fenantrolina})_3^{3+}$, $Ir(IV)Cl_6^{2-}$, $Ru(III)(NH_3)_5$ $(izonikotynoamid)^{3+}$, $Mo(CN)_8^{3-}$, Cu(II)salicylan [217, 218]. W powyższych reakcjach anionorodnik utlenia się do tlenu, przyjmując od wymienionych związków elektron. Rodnik ponadtlenkowy redukuje Fe(III) EDTA z szybkością określoną przez pH środowiska. W zakresie pH obojętnego redukcja kompleksu przebiega z szybkością $2 \times 10^6 - 5 \times 10^5$ $M^{-1} \cdot s^{-1}$ i maleje ze wzrostem pH [103].

W roztworach wodnych rodnik ponadtlenkowy jest słabym czynnikiem utleniającym. Większość metali i kompleksów, poza Fe(II) EDTA, nie ulega utlenieniu w obecności rodnika ponadtlenkowego, ale są utleniane przez rodniki wodoronadtlenkowe np.: $Fe(CN_6)^{4-}$, Fe(II), $Ru(II) - (NH_3)_5 - (izonikotynoamid)^{2+}$ [103, 218].

W reakcji ze zredukowanymi formami flawin, dihydrofenazyną i N-metylohydrofenazyną, anionorodnik ponadtlenkowy, przejmując atom wodoru utlenia je do odpowiednich rodników [218]:

$$CH_3N\text{-fenazyna-H} + O_2^{\cdot} \longrightarrow CH_3N\text{-fenazyna}^{\cdot} + HO_2^-$$

Podobne rodniki powstają w reakcji rodników ponadtlenkowych z hydrazyną i hydroksyloaminą [218].

W przeciwieństwie do wymienionych związków, α-tokoferol i kwas askorbinowy nie ulegają utlenieniu w bezpośredniej reakcji z anionorodnikiem ponadtlenkowym. W wyniku przeniesienia protonu z substratu na rodnik ponadtlenkowy powstają H_2O_2, tlen i forma anionowa substratu, która dopiero utlenia się w kolejnej reakcji z tlenem [180].

Rodniki ponadtlenkowe mogą być produktami samoutleniania me-

tali lub produktami pośrednimi tych reakcji. W roztworach wodnych generowanie rodników występuje w reakcjach utleniania Ag°, Hg°, Cd(I), Co(I), Zn(I) [218].

Kompleksowanie jonów metali z rodnikami do formy kompleksów ponadtlenkowych obserwowano w roztworach wodnych dla: Ba(II), Ca(II), Mn(II), witaminy B_{12} [218].

Metodą EPR wykazano ponadto powstawanie kompleksów po podaniu HO_2^- do Ti(IV), Ce(IV), Mo(VI), Zr(IV). Przyłączenie rodnika do jonów metali powoduje obniżenie wartości pK [218]. Kompleksy ponadtlenkowe metali z wyjątkiem $Li(I)O_2^{\cdot}$ są nietrwałe i ulegają redukcji do nadtlenków [181, 217]:

$$O_2^{\cdot} + Me^{n+} \longrightarrow (Me^{n+})\,(O_2^{\cdot})$$

$$(Me^{n+})(O_2^{\cdot}) \xrightarrow{e^-} (Me^{n+})\,(O_2^{2-})$$

lub w reakcji

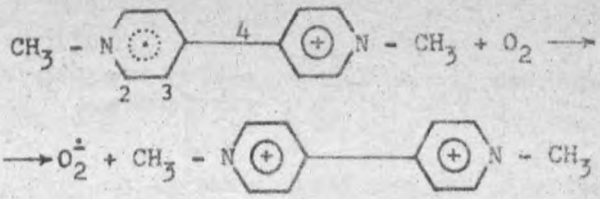
$$(Me^{n+})\,(O_2^{\cdot}) + O_2^{\cdot} \longrightarrow (Me^{n+})\,(O_2^{2-}) + O_2$$

$$2(Me^{n+})(O_2^{\cdot}) \longrightarrow (Me^{n+})\,(O_2^{2-}) + Me^{n+} + O_2$$

z których w dalszych reakcjach powstają tlenki i wodorotlenki [218].

Anionorodnik ponadtlenkowy wykorzystany został także do syntezy kompleksów metali z tlenem. Bezpośrednie wiązanie rodnika ponadtlenkowego z metali jest niekiedy łatwiejsze od reakcji metalu z tlenem, prowadzącej do powstania kompleksu $Al_2(CH_3)_6(O_2)$ i innych [218]. W układach biologicznych znany jest kompleks anionorodnika ponadtlenkowego z ADP-Fe: [ADP-Fe(II)-O_2]↔[ADP-Fe(III)-O_2^-]. Połączenie to stymuluje peroksydację lipidów w układzie enzymatycznego generowania tlenowych form wolnych rodników [229]. ADP-Fe zapoczątkowuje pierwszy etap procesu peroksydacji, prowadzący do powstawania wodorotlenków lipidów.

Inną właściwością rodnika ponadtlenkowego jest zdolność tworzenia związku addytywnego ze zredukowaną formą parakwatu i rodnikiem N^5-etylo-3-metylo-lumiflawiny [218, 247]. Zredukowany parakwat w reakcji z tlenem generuje anionorodniki ponadtlenkowe:



Anionorodnik przyłączając się w stosunku 1 : 1 do wyżej wymienionego rodnika podstawionej lumiflawiny tworzy nadtlenkowy jon obojnaczy (parakwat^{+}-$O_2^{\cdot-}$) z grupą $-OO^{-}$ w pozycji 2. Powstały związek jest nieparamagnetyczny, posiada nowe pasma absorpcji, 407 nm i 450 nm i ulega szybkiemu rozkładowi [218].

Rodnik ponadtlenkowy generowany w przebiegu szeregu procesów biologicznych jest produktem pośrednim lub końcowym wielu reakcji enzymatycznych katalizowanych, m. in. przez:

- oksydazę ksantynową (E.C. 1.2.3.2) [167], oksydazę NADPH (E.C. 1.6.99.1) [101], oksydoreduktazę NADPH: cytochrom c (E.C. 1.6.2.4) z mikrosomów wątroby szczura [191].

W reakcjach nieenzymatycznych anionorodniki ponadtlenkowe powstają podczas:

- utleniania zredukowanych flawin i chinonów [173], ferredoksyny [172], kwasu dihydroksyfumarowego [76];
- samoutleniania adrenaliny [171], pirogallolu [163], dopaminy [98];
- utleniania hydrazyny [106], fenylohydrazyny, zredukowanej ryboflawiny [161];
- utleniania hemoglobiny w reakcji z azotynami [52, 242].

Rodnik ponadtlenkowy powstaje też podczas fotolizy wody [71] i redukcji fotochemicznej tlenu [161]. Wiele z wymienionych reakcji wytwarzania anionorodników ponadtlenkowych stanowi podstawę pośrednich metod oznaczania aktywności dysmutazy ponadtlenkowej, opartej na reakcjach redukcji lub utleniania substratów przez rodnik ponadtlenkowy.

Metody otrzymywania anionorodników ponadtlenkowych w układach enzymatycznych, a także metoda radiolizy impulsowej pozwalająca na otrzymanie stosunkowo wysokich stężeń rodnika ponadtlenkowego, rzędu wielkości 10^{-5} μmol^{-1}, nie mogą być wykorzystane w badaniach chemicznej reaktywności rodników ze względu na niestabilność rodników w roztworach wodnych. Stabilne rodniki otrzymuje się w środowisku bezwodnym metodą elektrochemicznej redukcji

tlenu, z ponadtlenku tetrametyloamonowego i w procesie solubilizacji KO_2 [218].

2.1.2. Rodnik hydroksylowy

Obecność licznych układów wytwarzających anionorodniki ponadtlenkowe oraz powszechność występowania dysmutazy ponadtlenkowej w komórkach [71] sugeruje, że rodniki te powodują różnego rodzaju szkodliwe dla komórki efekty. W porównaniu z innymi tlenowymi rodnikami, takimi jak rodniki hydroksylowe i rodniki organiczne, anionorodnik w roztworach wodnych jest mało reaktywny [93]. W wielu przypadkach efekty uszkodzenia komórek, obserwowane w układach enzymatycznego generowania rodników, przypisuje się rodnikom hydroksylowym lub innym formom wolnych rodników.

W obecności nadtlenku wodoru rodniki ponadtlenkowe są prekursorami rodników hydroksylowych w reakcji:

$$O_2^{\cdot-} + H_2O_2 \longrightarrow O_2 + {}^{\cdot}OH + OH^-$$

zwanej reakcją H a b e r a-W e i s s a [88]. Wielu autorów uważało i nadal podtrzymuje, że reakcja ta jest głównym źródłem rodników hydroksylowych w materiale biologicznym. W nieobecności substancji katalizujących stałe szybkości reakcji oznaczone w szerokim zakresie pH są bardzo niskie: $k = (3{,}0 \pm 0{,}6)\ M^{-1} \cdot s^{-1}$ [130], $(2{,}25 \pm 0{,}20)\ M^{-1} \cdot s^{-1}$ [61]. Szybkość wytwarzania rodników wzrasta po dodaniu do układu jonów żelaza i jego kompleksów [44, 91, 92, 166].

Dla wyjaśnienia reakcji Habera-Weissa katalizowanej solami żelaza zaproponowano 3 różne mechanizmy:

I
$$Me^n + O_2^{\cdot-} \longrightarrow Me^{n-1} + O_2$$
$$Me^{n-1} + H_2O_2 \longrightarrow Me^n + {}^{\cdot}OH + OH^-$$

II
$$Me^n + O_2^{\cdot-} \longrightarrow (Me - O_2)^{n-1}$$
$$(MeO_2)^{n-1} + H_2O_2 \longrightarrow (MeO_2)^n + {}^{\cdot}OH + OH^-$$
$$(MeO_2)^n \longrightarrow Me^n + O_2$$

III

$$Me^{n} + H_2O_2 \longrightarrow (Me - OOH)^{n-1} + H^{+}$$

$$(Me - OOH)^{n-1} + O_2^{\cdot-} \longrightarrow (Me - O)^{n-1} + O_2 + OH^{-}$$

W dwóch pierwszych typach reakcji czynnikami utleniającymi są rodniki hydroksylowe, w trzecim przypadku rolę czynnika utleniającego spełnia tlenek metalu [31, 46].

Rodniki hydroksylowe mogą być wytwarzane w analogicznych reakcjach z kompleksami miedzi [215]:

$$\text{kompleks-}Cu^{2+} + O_2^{\cdot-} \longrightarrow \text{kompleks-}Cu^{+} + O_2$$

$$\text{kompleks-}Cu^{+} + H_2O_2 \longrightarrow \text{kompleks-}Cu^{2+} + {}^{\cdot}OH + OH^{-}$$

Istnienie wielu źródeł wytwarzania rodników hydroksylowych w materiale biologicznym wynika z faktu występowania w komórkach i płynach ustrojowych prekursorów reakcji Habera-Weissa. Anionorodniki ponadtlenkowe i H_2O_2 powstają w różnych procesach metabolicznych. Ponadto w komórkach występują inne czynniki redukujące, które też mogą być potencjalnym źródłem rodników hydroksylowych [211, 246] oraz jony żelaza. Obok znanych źródeł żelaza, takich jak transferyna, ferytyna i in., w komórce znajdują się niewielkie ilości wolnych jonów żelaza. Żelazo niezwiązane z białkiem wykryto w hepatocytach [231], retikulocytach [197], erytrocytach, a także w płynie mózgowo-rdzeniowym [94, 150].

Rola anionorodników ponadtlenkowych w reakcji Habera-Weissa, katalizowanej jonami metali polega na redukcji metalu, tj. żelaza lub miedzi:

$$Fe^{3+} + O_2^{\cdot-} \longrightarrow O_2 + Fe^{2+}$$

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{3+} + {}^{\cdot}OH + OH^{-}$$

Rodniki hydroksylowe wytwarzane są w kolejnym stadium procesu, w reakcji Fentona [93].

Połączenia zawierające grupy SH: glutation, tiomocznik, cysteamina, dodane do enzymatycznego układu generowania anionorodników ponadtlenkowych i H_2O_2, w stężeniu fizjologicznym i niższym stymulują wytwarzanie rodników hydroksylowych [211]. W wyższych stężeniach hamują generowanie rodników przy niezmienionym mechanizmie reakcji.

NADH i NADPH również w stężeniu fizjologicznym w obecności Fe^{2+} i H_2O_2 przyspieszają produkcję rodników hydroksylowych [212]. W obu przypadkach mamy do czynienia z wytwarzaniem rodników hydroksylowych przy udziale rodników ponadtlenkowych i H_2O_2. W doświadczeniach z glutationem i cysteaminą anionorodniki ponadtlenkowe generowane były w reakcji katalizowanej przez oksydazę ksantynową, w drugim przypadku powstają podczas utleniania zredukowanych form nukleotydów nikotynamidoadeninowych, procesu katalizowanego przez Fe-EDTA [211, 212].

Askorbinian wytwarza rodniki hydroksylowe bezpośrednio w reakcji z jonami żelaza i H_2O_2 [246].

$$2Fe^{3+}\text{-EDTA} + \text{askorbinian} \longrightarrow 2Fe^{2+}\text{-EDTA} + \text{dehydroaskorbinian}$$

$$Fe^{2+}\text{-EDTA} + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{3+}\text{-EDTA} + {}^{\cdot}OH + OH^{-}$$

Według W i n t e r b o u r n a askorbinian jest jednym z ważniejszych źródeł rodników hydroksylowych w układach biologicznych. W plazmie, limfie i mazi stawowej, płynach zawierających stosunkowo dużo askorbinianiu, rodniki hydroksylowe produkowane są przede wszystkim w reakcji z askorbinianem [248]. Natomiast w tkankach charakteryzujących się wzmożonym metabolizmem anionorodniki ponadtlenkowe uczestniczą w znacznym stopniu w procesie wytwarzania rodników hydroksylowych.

Inną grupę prekursorów rodników hydroksylowych w układach biologicznych stanowią połączenia: 6-hydroksydopamina (6-OHDA), 6-aminodopamina (6-ADA), kwas dialurowy i 5,7-dihydroksytryptamina (5,7-DHT). W reakcji z tlenem generują one rodniki ponadtlenkowe i H_2O_2 [42].

$$\text{6-OHDA i 6-ADA} + O_2 \xrightarrow{\text{spontanicznie}} H_2O_2 + \text{chinon}$$

$$\text{kwas dialurowy} + O_2 \xrightarrow{\text{spontanicznie}} H_2O_2 + \text{alloksan}$$

$$\text{5,7-DHT} + O_2 \xrightarrow[\text{monoaminowa}]{\text{oksydaza}} H_2O_2 + \text{aldehyd}$$

Rodniki hydroksylowe wytwarzane są z anionorodników ponadtlenkowych i H_2O_2 w reakcji Habera-Weissa katalizowanej solami żelaza. Powyżej wymienione związki mogą powodować nagromadzenie rodników hydroksylowych w tkankach.

Komórki β trzustki, produkujące insulinę, są wyjątkowo wrażliwe na działanie alloksanu i kwasu dialurowego [66, 80]. Selektywne gromadzenie neurotoksyn, hydroksy- i aminodopaminy przez katecholaminy neuronów prowadzi do uszkodzenia włókien nerwowych układu sympatycznego. Natomiast 5,7-DHT powoduje zaburzenia w przekazywaniu impulsów nerwowych poprzez oddziaływanie na noradrenalinę neuronów [42].

Odmienną grupę związków, generujących rodniki hydroksylowe w komórkach, stanowią antybiotyki stosowane w terapii nowotworowej. Toksyczność leków z grupy antracyklin zawierających ugrupowanie chinonowe, np.: adriamycyny, daunorubicyny i mitomycyny oraz pochodnych nitrofurażonu, polega na wytwarzaniu w komórkach rodników. W wyniku 1-elektronowej redukcji leków w reakcjach katalizowanych przez mikrosomalne i jądrowe enzymy (reduktazę NADPH - cytochrom P-450, E.C. 2.3.6.4) i oksydazę ksantynową (E.C. 1.2. 3.2) wytwarzane są rodniki semichinonowe [15, 18, 189]. Wolne rodniki semichinonowe są bardzo reaktywne [230]. Mogą bezpośrednio reagować ze składnikami komórki lub uczestnicząc w przenoszeniu elektronu na tlen cząsteczkowy generują anionorodniki ponadtlenkowe [15, 249, 250]. Charakteryzują się bardzo krótkimi czasami życia w roztworach wodnych w warunkach beztlenowych. W obecności tlenu czasy te są jeszcze krótsze. Dla adriamycyny wynoszą odpowiednio 50 i 8,5 μs. Natomiast rodnik adriamycyny reaguje z tlenem ze stałą szybkości $4,4 \times 10^7$ $M^{-1} \cdot s^{-1}$ [230]. Ze względu na bardzo krótki czas życia rodników semichinonowych, leki te powodują uszkodzenia komórki głównie w miejscu ich powstawania. Antybiotyki antracykliczne pełniąc funkcję przenośników elektronów pomiędzy flawoproteinami a tlenem cząsteczkowym powodują wiele uszkodzeń w komórce. Mitomycyna C i adriamycyna stymulują wytwarzanie anionorodników ponadtlenkowych i H_2O_2 w mitochondriach serc szczura [51]. Podanie pochodnych nitrofuranu powoduje wzrost poziomu rodników ponadtlenkowych i H_2O_2, czego wynikiem jest peroksydacja lipidów wątroby, nerek i mózgu szczura [48].

Antybiotyki daunorubicyna i adriamycyna w wyniku przyłączania się do kwasów nukleinowych ulegają cyklicznym reakcjom redukcji i utleniania za pośrednictwem rodników ponadtlenkowych i hydroksylowych, wywołując pojedyncze i podwójne pęknięcia łańcuchów DNA [18, 156]. Adriamycyna powoduje również redukcję methemoglobiny i cytochromu c [15]. Ponadto w obecności adriamycyny obserwowano

peroksydację lipidów [79], hamowanie aktywności ATP-azy, zmiany właściwości błon erytrocytarnych i hemolizę erytrocytów [15].

Wzrost wytwarzania wolnych rodników tlenowych obserwowano również w komórkach po podaniu: herbicydów bipirydylowych [237], menadionu [250], produktów metabolizmu organizmów bakteryjnych (pyocyjaniny, streptonigryny), plumbaginy [97]. Stwierdzono m.in., że wymienione związki powodowały utlenianie hemoglobiny w erytrocytach [250], a także wzrost poziomu anionorodników ponadtlenkowych i H_2O_2 w komórkach Escherichia coli [97]. Odpowiedzią komórek na zwiększone wytwarzanie rodników była wzmożona biosynteza dysmutazy ponadtlenkowej zawierającej Mn, tj. enzymu odpowiedzialnego za usuwanie endogennego rodnika ponadtlenkowego powstającego w wyniku reakcji metabolicznych zachodzących w komórce.

Rodnik ponadtlenkowy jest mediatorem toksycznego działania herbicydów bipirydylowych. W obecności parakwatu, który okazał się toksyczny nie tylko dla roślin ale również dla komórek bakterii [176], ludzi i zwierząt notowano: aktywację cyklazy guanylowej [239], hemolizę erytrocytów ludzkich [122], zwiększoną śmiertelność pneumocytów [201], peroksydację lipidów [32], obniżenie poziomu chlorofilu i barwników karotenowych w liścieniach lnu [257, 258]. Zredukowany parakwat reaguje z tlenem równie szybko jak leki antracykliczne:

$$\text{parakwat}^{+} + O_2 \longrightarrow \text{parakwat}^{2+} + O_2^{\cdot-}$$

$$k = 7{,}7 \times 10^{8}\ M^{-1} \cdot s^{-1}\ [259]$$

zapoczątkowując łańcuchowe reakcje wolnorodnikowe. Działanie herbicydów i antybiotyków antracyklicznych hamowane jest przez dysmutazę ponadtlenkową [15, 79, 154, 156, 258]. Biologiczna rola enzymu polega na usuwaniu rodników ponadtlenkowych i kontroli poziomu innych wolnych rodników powstających w układach biologicznych.

Antybiotyki glikopeptydowe, wysoce aktywne w zwalczaniu wielu schorzeń nowotworowych, znane są przede wszystkim z interakcji z kwasami nukleinowymi. Bleomycyna i tallisomycyna w obecności Fe^{2+} i tlenu łączą się z DNA powodując pojedyncze i podwójne pęknięcia łańcuchów [155, 183].

Mechanizm działania obu antybiotyków polega na wytwarzaniu wolnych rodników w reakcjach [155]:

$$TLM + Fe^{2+} \rightleftharpoons TLM \cdot Fe^{2+}$$

$$TLM \cdot Fe^{2+} + O_2 \longrightarrow TLM \cdot Fe^{3+} + O_2^{\cdot-}$$

$$TLM \cdot Fe^{2+} + O_2^{\cdot-} \xrightarrow{2H^+} TLM \cdot Fe^{3+} + H_2O_2$$

$$2O_2^{\cdot-} + 2H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2$$

$$2H_2O_2 \xrightarrow{\text{katalaza}} 2H_2O + O_2$$

$$TLM \cdot Fe^{2+} + H_2O_2 \longrightarrow TLM \cdot Fe^{3+} + {}^{\cdot}OH + OH^-$$

TLM - oznacza tallisomycynę.

Powyższy mechanizm zaproponowano po przeprowadzeniu badań nad określeniem wpływu zmiataczy rodników tlenowych na stopień uszkodzenia kwasów nukleinowych przez stosowane leki.

Degradacja DNA wywołana antybiotykami hamowana jest przez dysmutazę ponadtlenkową, katalazę, zmiatacze rodników hydroksylowych, kationy: Cu^{2+}, Mg^{2+}, Co^{2+} i Ni^{2+} oraz kompleks bleomycyny z Cu(II)[86, 155]. Spośród generowanych rodników największy udział w uszkodzeniu DNA przypisuje się rodnikom hydroksylowym [18, 155, 183].

Rodniki tlenowe wytwarzane są również przez komplesy Cu(I) z bleomycyną i tallisomycyną [228] oraz w reakcjach antybiotyków z połączeniami zawierającymi grupy tiolowe, spełniającymi rolę donorów elektronów [2].

$$\text{Fe(III)-bleomycyna} + RSH \rightleftharpoons \text{Fe(III)-bleomycyna-SR} + H^+$$

$$\text{Fe(III)-bleomycyna} - SR \longrightarrow \text{Fe(II)-bleomycyna} + RS^{\cdot}$$

$$\text{Fe(II)-bleomycyna} + O_2 \longrightarrow \text{Fe(III)-bleomycyna} + O_2^{\cdot-}$$

S i n h a i C o x [224] obserwowali stymulację procesu generowania rodników ponadtlenkowych w obecności cyklicznego pentapeptydu, aktynomycyny D i jego analogów.

B.U.Ł.

2.1.3. Tlen singletowy

Tlen singletowy ($^1O_2$) obok rodników hydroksylowych i ponadtlenkowych odpowiedzialny jest za toksyczność tlenu. Źródłem tlenu singletowego w komórkach są niekontrolowane procesy utleniania lipidów [7, 178], procesy towarzyszące fagocytozie [179], a także reakcje katalizowane przez peroksydazy [202]. Wzmożone wytwarzanie tlenu singletowego obserwowano w stanach chorobowych np. przy żółtaczce i porfirii [69]. Ponadto uważano, że w wyniku nieenzymatycznej dysmutacji rodnika ponadtlenkowego, w przeciwieństwie do dysmutacji katalizowanej przez enzym, powstaje tlen singletowy; w reakcji Habera-Weissa [119] lub podczas spontanicznej dysmutacji [191].

$$O_2^{\cdot-} + HO_2^{\cdot} \xrightarrow{H^+} H_2O_2 + O_2(^1O_2 \text{ lub } ^3\Sigma_g^-)$$

Trudności z wyjaśnieniem reakcji i ustaleniem jej produktu wynikały z faktu zmiatania tlenu singletowego przez anionorodniki ponadtlenkowe ze stałą szybkości reakcji - 10^9 $M^{-1} \cdot s^{-1}$ [70]:

$$O_2^{\cdot-} + {}^1O_2 \longrightarrow {}^3O_2 + O_2$$

Zastosowanie do badań cholesterolu dającego charakterystyczny produkt z tlenem singletowym [70] oraz metody selektywnego zmiatania tlenu singletowego [6] pozwoliło na stwierdzenie, że w reakcji nieenzymatycznej dysmutacji tlen singletowy wytwarzany jest w ilości nie większej niż 0,2% i należy wykluczyć go z ewentualnych produktów tej reakcji.

Tlen singletowy reaguje głównie z połączeniami zawierającymi podwójne wiązania i ze związkami siarkowymi [223]. W układach biologicznych tlenowi singletowemu przypisuje się m. in. działanie bakteriobójcze [132] i cytotoksyczne [120, 195], właściwości czynnika hemolitycznego [122] oraz udział w utlenianiu reszt aminokwasów siarkowych hemoglobiny i białek błonowych [118].

2.1.4. Metody wykrywania rodników ponadtlenkowych i hydroksylowych w materiale biologicznym

Zaproponowano wiele układów pozwalających na identyfikację rodników ponadtlenkowych. Są one oparte na reakcjach redukcji lub utleniania substratów przez rodnik ponadtlenkowy. Do pierwszej grupy metod należą reakcje redukcji cytochromu c [167], błękitu nitrotetrazolowego [73], nitrometanu [167]. W drugiej grupie metod anionorodnik oznacza się w reakcjach samoutlenienia adrenaliny [171] i pirogallolu [163], utleniania fenoli i hydroksyloamin [30]. Rodnik ponadtlenkowy o ile nie powstaje samorzutnie jako produkt pośredni reakcji utleniania wytwarzany jest w obecności tlenu w układach: ryboflawina + metionina [71], oksydaza ksantynowa + + ksantyna [167]. Wysoce specyficzne reakcje enzymatyczne znajdują stosunkowo małe zastosowanie. W metodach tych anionorodnik oznacza się w reakcji z peroksydazą i kompleksem NADH/dehydrogenaza mleczanowa (E.C. 1.1.2.3) [30].

W warunkach kiedy zawodzą konwencjonalne metody wykrywania rodników można korzystać z metody spektroskopii elektronowego rezonansu paramagnetycznego. Metoda ta jednak ze względu na niskie wartości stałych szybkości reakcji znaczników z anionorodnikami ponadtlenkowymi, w porównaniu ze stałymi szybkości reakcji innych połączeń stosowanych do wykrywania rodników, znajduje ograniczone zastosowanie. Stałe szybkości reakcji DMPO i TMPO wynoszą odpowiednio 7 $M^{-1} \cdot s^{-1}$ i 10 $M^{-1} \cdot s^{-1}$. Reakcja cytochromu c z rodnikiem ponadtlenkowym przebiega z szybkością 6 x 10^5 $M^{-1} \cdot s^{-1}$, zaś z tetranitrometanem osiąga wartość 2 x 10^9 $M^{-1} \cdot s^{-1}$ [64, 65].

Metodą EPR wykrywa się wolne rodniki w roztworach wodnych w stężeniu 1 µmola. Praktycznie oznacza to możliwość wykrycia tylko stabilnych wolnych rodników, które można gromadzić do osiągnięcia wymaganego stężenia lub niestabilnych, ale wytwarzanych w bardzo dużym stężeniu. Do wykrywania rodników tlenowych mogą być stosowane znaczniki nitroksylowe: DMPO, TMPO, 4-POBN, PBN TEMPO OXANO i OXANOH [64, 65, 208]. Rodniki ponadtlenkowe w reakcji ze znacznikami tworzą produkt reakcji typu DMPO-OOH, którego trwałość zależy od właściwości układów w jakich są wytwarzane. Powstawanie w miarę stabilnych rodników DMPO-OOH jest możliwe tylko w u-

kładach o pH kwaśnym, zawierających niewielkie ilości żelaza i nie posiadających peroksydaz [35, 64].

Najbardziej odpowiednimi znacznikami do wykrywania anionorodników ponadtlenkowych w materiale biologicznym są: OXANO i OXANOH. Ich stałe szybkości reakcji z rodnikiem wynoszą $6,7 \times 10^3$ $M^{-1} \cdot s^{-1}$ [208]. Reakcje utleniania tych znaczników nie są hamowane ani przez tiolowe związki redukujące ani w obecności reduktazy NADPH-cytochrom P-450 (E.C. 2.3.6.4), której obecność uniemożliwia wykrycie rodników w reakcji redukcji cytochromu c. Wymienione znaczniki łatwo przenikają przez błony komórkowe i mogą być wykorzystane do wykrywania anionorodników ponadtlenkowych w preparatach komórkowych [208]. Techniką znaczników spinowych wytwarzanie anionorodników ponadtlenkowych stwierdzono m. i. : w reakcjach redukcji aromatycznych połączeń nitrowych w mikrosomach [220], w układach fotochemicznych podczas naświetlania chloroplastów, barwników roślinnych [89] i protoporfiryn [33, 34].

Z bezpośrednich metod wykrywania rodników hydroksylowych w reakcjach zachodzących w układach biologicznych, stosuje się: metodę chromatografii gazowej, metodę spektrofotometryczną opartą na redukcji p-nitrozodimetyloaniliny [30] i metodę znaczników spinowych [35, 64].

W metodach chromatograficznych wykorzystuje się właściwości utleniające rodników hydroksylowych, w obecności których następuje utlenianie substratów: metionalu (3-metylo-merkaptoetanolu) i kwasu α-keto-4-merkaptomasłowego do etylenu [30, 46].

Nitroksylowe znaczniki spinowe, stosowane do wykrywania anionorodników ponadtlenkowych, znalazły również zastosowanie w metodach identyfikacji rodników hydroksylowych. Produktem ich reakcji są związki: DMPO-OH, TMPO-OH, PBN-OH [64, 65]. W przeciwieństwie do niskich stałych szybkości reakcji znaczników z rodnikami ponadtlenkowymi, znakowane związki okazały się wysoce selektywnymi detektorami rodników hydroksylowych. Stałe szybkości reakcji wynoszą dla DMPO - $3,4 \times 10^9$ $M^{-1} \cdot s^{-1}$, TMPO - $3,8 \times 10^9$ $M^{-1} \cdot s^{-1}$ i 4-POBN - $1,9 \times 10^9$ $M^{-1} \cdot s^{-1}$ [65]. Metodę EPR zastosowano do wykrywania rodników m. in. w procesie peroksydacji lipidów [136], w celu potwierdzenia produkcji rodników w obecności antybiotyków [183] i w układach DNA-Fe(II) i H_2O_2 [67].

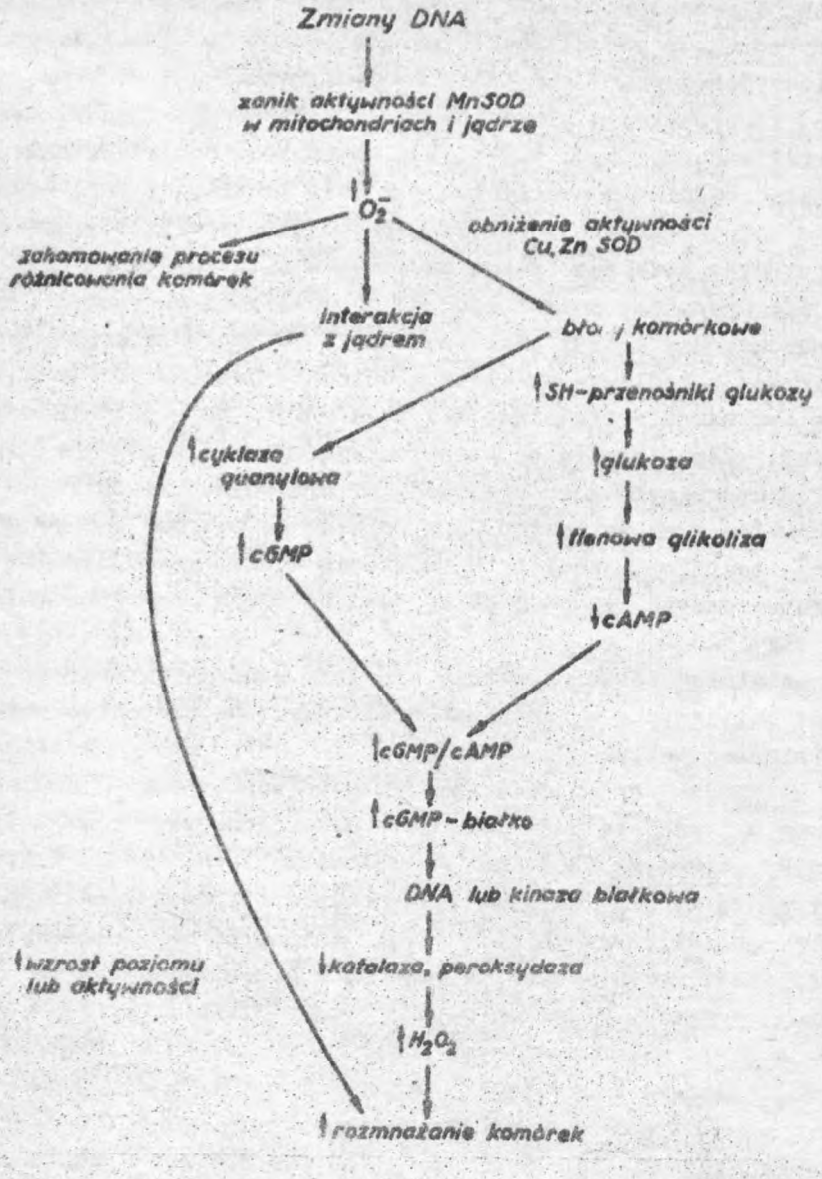
2.1.5. Regulacja poziomu wolnych rodników tlenowych w komórkach

Komórki zawierają trzy enzymy odpowiedzialne za usuwanie toksycznych produktów redukcji tlenu, powstających w przebiegu wielu reakcji procesów metabolicznych. Są to dysmutaza ponadtlenkowa (oksydoreduktaza ponadtlenek: ponadtlenek, E.C. 1.15.1.1), katalaza (oksydoreduktaza nadtlenek wodoru: nadtlenek wodoru, E.C. 1. 11.1.6) i peroksydaza glutationowa (oksydoreduktaza glutation: nadtlenek wodoru, E.C. 1.11.1.9). Dysmutaza odpowiedzialna jest za rozkład rodnika ponadtlenkowego, zaś katalaza i peroksydaza za rozkład H_2O_2. Porównując aktywności enzymów w erytrocytach różnych gatunków zwierząt można zauważyć wyjątkowo wysoką i stałą aktywność dysmutazy ponadtlenkowej oraz zmienne aktywności katalazy i peroksydazy [162]. Rola dysmutazy w ochronie organizmów żywych przed szkodliwym działaniem wolnych rodników tlenowych wydaje się być bardziej istotna niż rola peroksydazy glutationowej i katalazy. Zapobieganie przez dysmutazę tworzeniu się w komórce rodników hydroksylowych oraz innych form wolnych rodników jest równie ważną funkcją enzymu jak rozkład anionorodnika ponadtlenkowego. Zostało tu pominięte omówienie budowy i właściwości funkcjonalnych enzymu, gdyż jest to tematem dwóch prac przeglądowych [109, 112].

W ostatnich latach powstały hipotezy wiążące zaburzenia procesów metabolicznych w komórkach nowotworowych z obserwowanymi w nich zmianami aktywności dysmutazy.

W większości przypadków komórki nowotworowe charakteryzują się obniżoną aktywnością CuZn dysmutazy ponadtlenkowej oraz brakiem lub tylko znikomymi ilościami Mn dysmutazy [28, 153, 237, 245]. Konsekwencją tych zmian jest występowanie podwyższonego poziomu rodników ponadtlenkowych [47, 184]. Anionorodniki ponadtlenkowe poprzez swoje uczestnictwo w reakcjach utleniania grup SH [4], produkcji rodników hydroksylowych, redukcji Fe^{+3} do Fe^{+2} i in. powodują wiele nieodwracalnych zmian w procesach metabolicznych komórek. Zgodnie z hipotezą O b e r l e y´a [185, 186] w komórkach nowotworowych w wyniku zaniku aktywności Mn dysmutazy i obniżenia stężenia CuZn dysmutazy, nagromadzające się rodniki ponadtlenkowe powodują wzrost poziomu glukozy i obniżenie zawartości cAMP. Zmiany stężenia cyklicznego AMP zostały uznane za cechy charakterystyczne komórek nowotworowych.

Następstwem wzmożonego metabolizmu tlenowego w komórkach jest spadek aktywności enzymów peroksydatywnych prowadzący do akumulacji H_2O_2 [186] i przyspieszenia podziałów komórkowych (rys. 4).



Rys. 4. Zaburzenia procesów metabolicznych w komórkach nowotworowych wywołane zmianami aktywności dysmutazy ponadtlenkowej (Mn - SOD i CuZn - SOD) wg Oberley'a i współ. [186]

Podana hipoteza może być słuszna tylko w przypadku nowotworów charakteryzujących się obniżonym poziomem cytoplazmatycznej CuZn dysmutazy.

2.1.6. Zmiatacze wolnych rodników

Błony plazmatyczne komórek są nieprzepuszczalne dla enzymów metabolizmu nadtlenków. Egzogenne enzymy odpowiedzialne są za usuwanie rodników znajdujących się poza komórką, natomiast zarówno rodniki ponadtlenkowe jak i rodniki hydroksylowe przenikają swobodnie przez błony komórkowe [159, 160].

Działanie podobne do dysmutazy ponadtlenkowej wykazuje wiele niskocząsteczkowych kompleksów miedzi. W większości przypadków są to kompleksy rozpuszczalne w wodzie, przenikające poprzez błony i bardzo aktywne, charakteryzujące się wysokimi stałymi szybkości reakcji z rodnikiem ponadtlenkowym. Aktywnością dorównują Mn i Fe dysmutazom, a niekiedy przewyższają nawet CuZn dysmutazę [144], co obrazuje tab. 1.

Tabela 1

Stałe szybkości reakcji anionorodników ponadtlenkowych z kompleksami o aktywności dysmutazowej [144]

Cu-kompleks	$k\ M^{-1} \cdot s^{-1}$
$Cu^{2+}(HCO_2^-, SO_4^{2-})$	$2{,}70 \pm 0{,}20 \times 10^9$
$Cu(lys)_2$	$0{,}60 \pm 0{,}10 \times 10^9$
$Cu(gly\text{-}his)_2$	$0{,}31 \pm 0{,}02 \times 10^9$
$Cu(diisopropylosalicylan)_2$	$2{,}40 \pm 0{,}12 \times 10^9$
$Cu(salicylan)_2$	$1{,}64 \pm 0{,}15 \times 10^9$
$Cu(acetylosalicylan)_2$	$0{,}96 \pm 0{,}20 \times 10^9$
Cu - penicyloamina	$0{,}45 \pm 0{,}06 \times 10^9$

Poza wymienionymi w tab. 1 kompleksami miedzi aktywność dysmutazową posiadają: kompleksy Cu(II)(1,10-fenantroliny)$_2$(ClO_4)$_2$, $CuSO_4$, Cu(II)Gly$_2$, $Cu(H_2O)_6^{2+}$, metaloproteiny, pochodne Co(III) i Fe(III)porfiryn, Cu(II)(3,5-diizopropylosalicylan)$_2$ [145, 190, 207, 214] oraz niektóre białka, m. in. oksydaza galaktozowa (E.C. 1.1.3.9) i cytochromowa (E.C. 1.9.3.1)[164].

W przypadku Cu-D-penicyloaminy okazało się, że stosowany przez wielu autorów kompleks $[Cu(I)_8Cu(II)_6(D\text{-penicyloamina})_{12}Cl]^{-5}$ nie katalizuje dysmutacji anionorodników ponadtlenkowych. Kompleks ulega rozkładowi do aktywnych mniejszych kompleksów miedzi, posiadających właściwości katalityczne [207].

Aktywność kompleksów miedzi, takich jak Cu(II)(lys)$_2$, Cu(salicylan)$_2$ i Cu-penicyloamina ograniczona, jest wpływami EDTA i związkami posiadającymi zdolność wypierania miedzi z kompleksów. Ślady metali w stężeniu tak niskim jak 1 nmol zwiększają spontaniczną dysmutację. Z kolei EDTA kompleksuje metale i przedłuża czas życia rodników ponadtlenkowych [24, 143].

Białka hemowe, hemoglobina i mioglobina reagują również z rodnikiem ponadtlenkowym, lecz przedstawione stałe szybkości reakcji nie sugerują charakteru katalitycznego tych białek (dla HbO_2 - 5×10^2 $M^{-1} \cdot s^{-1}$, MetHb - $1{,}37 \times 10^3$ $M^{-1} \cdot s^{-1}$)[61].

Oprócz zmiataczy rodników ponadtlenkowych charakteryzujących się aktywnością dysmutazową wyróżnia się grupę połączeń reaktywnych, które w reakcji z anionorodnikiem ulegają zanikowi z wytworzeniem produktu o zredukowanej aktywności, np. chinony, cytochrom c [144].

W obecności niskocząsteczkowych kompleksów miedzi obserwowano wiele efektów ochronnych: hamowanie działania herbicydów [257], opóźnienie wzrostu komórek raka Ehrlicha [145] i utleniania benzyloaminy przez oksydazę aminową [50], inhibicję redukcji cytochromu c [214], degradacji kwasu hialuronowego [81], fotoutleniania kwasu linolenowego [254].

Aktywność dysmutazową przypisywano także ceruloplazminie [77, 141]. W jej obecności wykazano hamowanie peroksydacji lipidów katalizowanej jonami Fe^{2+} [85], hemolizy erytrocytów [157] oraz redukcje cytochromu c i błękitu nitrotetrazolowego w układach enzymatycznego generowania rodników [77]. Ponieważ pozakomórkowe płyny zawierają stosunkowo mało dysmutazy ponadtlenkowej, katalazy i peroksydazy, ale posiadają dużo ceruloplazminy [77], sądzono

więc, że przynajmniej w tych przypadkach ceruloplazmina może pełnić funkcje zmiatacza anionorodników ponadtlenkowych. Przedstawione dane [9] stałych szybkości reakcji anionorodników ponadtlenkowych z ceruloplazminą ($3,04 \times 10^5$ $M^{-1} \cdot s^{-1}$) i dysmutazą ponadtlenkową ($1,8 \times 10^9$ $M^{-1} \cdot s^{-1}$) nie potwierdziły roli ceruloplazminy jako katalizatora dysmutacji enzymatycznej anionorodników ponadtlenkowych.

Przyjmując generowanie rodników hydroksylowych w reakcji Habera-Weissa za jedno z głównych źródeł tych rodników w materiale biologicznym, komórki przed ich szkodliwym działaniem chronić powinny zarówno związki kompleksujące żelazo, jak i zmiatacze samych rodników. Chelaty: kwas dietylenotriaminopentaoctowy, siarczan batofenantroliny i desferrioksamina zapobiegają powstawaniu rodników poprzez wytworzenie kompleksu, w którym żelazo nie może zmieniać wartościowości w cyklu reakcji utleniająco-redukujących [84, 93].

W komórkach rolę naturalnego protektora w stosunku do rodników hydroksylowych pełni ceruloplazmina. Katalizując reakcje utleniania Fe^{2+} do Fe^{3+} zapobiega wytwarzaniu rodnika hydroksylowego [85]. Obok katalazy i peroksydazy glutationowej zmniejsza udział wolnych rodników w procesach destrukcyjnych komórki.

W badaniach nad ustaleniem udziału rodników hydroksylowych w przebiegu określonego procesu stosowanych jest wiele związków, m. in.: dimetylosulfotlenek, alkohol metylowy, etylowy i t-butylowy, glicerol, glikol etylenowy, merkaptoetanol, cysteina, cysteamina, mannitol, tiomocznik [14, 82, 169]. Zmiatacze rodników hydroksylowych są często również skutecznymi zmiataczami rodników wodorowych, choć zmiatają je z stałymi szybkości niższymi o 2 rzędy wielkości do 3 rzędów wielkości [169].

Wykrywanie tlenu singletowego w układach biologicznych utrudnione jest obecnością innych rodników tlenowych. Tryptofan, często stosowany jako zmiatacz, reagując z tlenem singletowym wytwarza 4 produkty, w reakcji z rodnikami hydroksylowymi 6 produktów. Produkty wspólne w obu typach reakcji powstają w różnych ilościach, co pozwala na rozróżnienie rodników. Tryptofan nie reaguje z anionorodnikami [223]. W metodach identyfikacji tlenu singletowego wykorzystuje się ponadto: difenylofuran, histydynę, kwas rubreno-2,3,8,9-tetrakarboksylowy [6, 119, 223, 229].

2.2. Rodniki anionowe powstające w reakcji z produktami radiolizy wody

2.2.1. Powstawanie rodników anionowych

Rodniki anionowe powstają w reakcji rodników hydroksylowych z jonami podczas napromieniania roztworów w obecności N_2O:

$$H_2O \text{ W} \longrightarrow {}^{\cdot}OH,\ H,\ e^-_{aq},\ H_2,\ H_2O_2,\ H_3O^+$$

$$e^-_{aq} + N_2O \longrightarrow N_2 + {}^{\cdot}OH + OH^- \quad k = 8{,}7 \times 10^9\ M^{-1} \cdot s^{-1}$$

$$X^- + {}^{\cdot}OH \longrightarrow X^{\cdot} + OH^- \quad k = 10^9 - 10^{10}\ M^{-1} \cdot s^{-1}$$

$$X^- + H^{\cdot} \rightleftharpoons X_2^{\cdot -} \quad [221]$$

Z wyjątkiem azydku, który tworzy rodniki $N_3^{\cdot}$, pozostałe aniony tworzą dimeryczne formy rodników.

Rodniki anionowe są równie silnymi czynnikami utleniającymi jak rodniki hydroksylowe. Cechuje je duża selektywność w reakcji z połączeniami organicznymi, w tym szczególnie z aminokwasami [27, 96, 100]. Wykorzystując tę właściwość rodników anionowych, stosuje się je głównie w badaniach struktury i funkcji białek [100, 221]. Ponieważ reagują tylko z wybranymi aminokwasami: tyrozyną, tryptofanem, cysteiną i histydyną są niezwykle pomocne w badaniach roli tych aminokwasów w białkach enzymatycznych [27, 96].

Rodniki azydkowe przewyższają reaktywnością i efektywnością działania zarówno rodniki hydroksylowe jak i rodniki bromkowe rodankowe i jodkowe. Podobnie jak rodniki nieorganiczne reagują selektywnie z aminokwasami, utleniając je z stałymi szybkości reakcji $k = 5 \times 10^7 - 10^9\ M^{-1} \cdot s^{-1}$ [206].

Nieorganiczne rodniki anionowe oraz azydkowe zwiększają efekty popromienne. W ich obecności obserwowano powstawanie dimeru lizozymu [96], inaktywację hydrolazy acetylocholiny (E.C. 3.1.1.7) [78], wzrost hemolizy i przepuszczalności błon dla potasu [206], zwiększoną promienioczułość mikroorganizmów [219], utlenianie cytochromu c [221].

2.2.2. Rodniki NAD• i askorbinianowe

Rodniki NAD• otrzymuje się z utlenionej i zredukowanej formy dinukleotydu nikotynamidoadeninowego w reakcjach z produktami radiolizy wody. Redukcja NAD^+ do rodnika NAD• przebiega według schematu [137]:

$$^{\bullet}OH + HCOO^- \longrightarrow H_2O + CO_2^-$$

$$H^{\bullet} + HCOO^- \longrightarrow H_2 + CO_2^-$$

$$CO_2^- + NAD^+ \longrightarrow CO_2 + NAD^{\bullet}$$

$$e^-_{aq} + NAD^+ \longrightarrow NAD^{\bullet}$$

Utlenianie NADH do NAD• przeprowadza się w roztworach nasyconych N_2O. Rodnik hydroksylowy jest usuwany za pomocą zmiataczy nieorganicznych [138]:

$$e^-_{aq} + N_2O + H^+ \longrightarrow N_2 + {}^{\bullet}OH$$

$$^{\bullet}OH + Br^- \longrightarrow Br^{\bullet} + OH^-$$

$$Br^{\bullet} + Br^- \longrightarrow Br_2^{\dot{-}}$$

Rodnik NAD• powstaje również w bezpośredniej reakcji kompleksu NADH-enzym z anionorodnikiem ponadtlenkowym [22]:

$$\text{enzym-NADH} + O_2^{\dot{-}} \longrightarrow \text{enzym-NAD}^{\bullet} + HO_2^-$$

Zarówno wolny rodnik NAD•, jak i związany z enzymem w obecności tlenu wytwarzają anionorodniki ponadtlenkowe:

$$NAD^{\bullet} + O_2 \longrightarrow NAD^+ + O_2^{\dot{-}}$$

W nieobecności tlenu i innych akceptorów elektronu rodniki NAD• bardzo szybko dimeryzują do nieaktywnego enzymatycznie dimeru [138]:

$$NAD^{\bullet} + NAD^{\bullet} \longrightarrow (NAD)_2 \quad k = 7{,}7 \times 10^7 \ M^{-1} \cdot s^{-1}$$

Stabilne rodniki osiąga się poprzez związanie wolnego rodnika

B.U.J.

z miejscem aktywnym dehydrogenaz: alkoholowej (E.C. 1.1.1.1), jabłczanowej (E.C. 1.1.1.37), mleczanowej (E.C. 1.1.2.3), i glicero-3-fosforanowej (E.C. 1.1.1.8) [25].

Rodniki askorbinowe wytwarzane są w reakcji z β-monooksygenazą dopaminy i podczas napromieniania wolnych roztworów askorbinianu [23, 226]. W reakcji rodników hydroksylowych z askorbinianem powstaje kilka różnych form rodników askorbinowych. W celu wyeliminowania występowania różnorakich form rodników praktyczniej jest wytwarzać rodniki w roztworach zawierających chlorowce. Rodniki askorbinowe powstają wtedy w reakcjach przedstawionych poniżej:

$$^{\bullet}OH + Br^{-} \longrightarrow BrOH^{\bullet-} \xrightarrow{Br^{-}} OH^{-} + Br_2^{\bullet-}$$

$$Br_2^{\bullet-} + \text{askorbinian} \longrightarrow \text{rodnik askorbinowy}$$

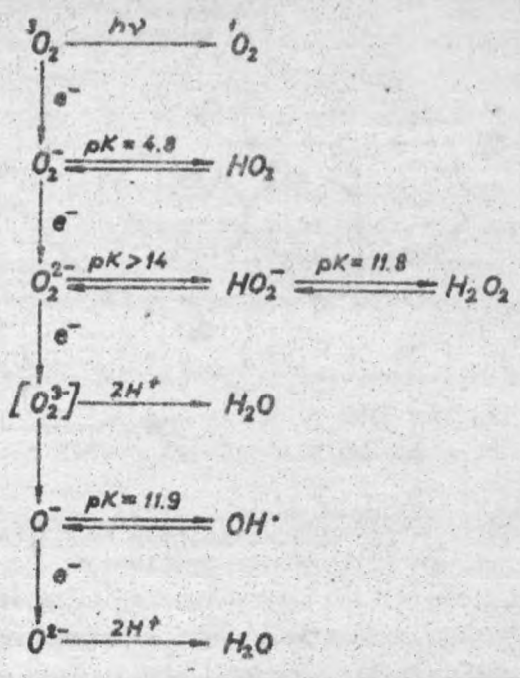
2.3. Toksyczność produktów radiolizy wody

Wrażliwość układów biologicznych na promieniowanie jonizujące jest na ogół wyższa w obecności tlenu niż w warunkach beztlenowych. Efekty wpływu tlenu badano na wielu różnych organizmach i sprawdzano wieloma technikami [149]. Jednak w dalszym ciągu nie wiemy czy wzrost wrażliwości napromienianych komórek przebiega na drodze identycznych, czy też zupełnie różnych mechanizmów [59].

B a n n i s t e r i wsp. [10] uważają, że spośród produktów redukcji tlenu, przedstawionych na rys. 5, prekursorami efektów toksycznych są jony ponadtlenkowe i nadtlenkowe.

Zgromadzono wiele dowodów na poparcie tezy, że wolne rodniki tlenowe reagując ze składnikami komórki powodują różnego rodzaju szkodliwe efekty. Poddając działaniu rodników ponadtlenkowych i hydroksylowych określone związki lub komórki obserwowano: wzrost śmiertelności komórek bakteryjnych [56, 58], samoutlenianie leghemoglobiny [199], hydroksylację cholesterolu [147], degradację hemoglobiny i hemolizę [76, 175], peroksydację fosfolipidów liposomów [119], pojedyncze i podwójne pęknięcia łańcuchów DNA [18,241], aberacje chromosomowe [216], obniżenie zawartości fosfatydyloetanoloaminy podczas hemolizy erytrocytów [232].

Ponadto w obecności rodników tlenowych występowała: degradacja kwasu hialuronowego [92, 251], degradacja węglowodanów do produktu dającego barwną reakcję z kwasem tiobarbiturowym [95], inaktywa-

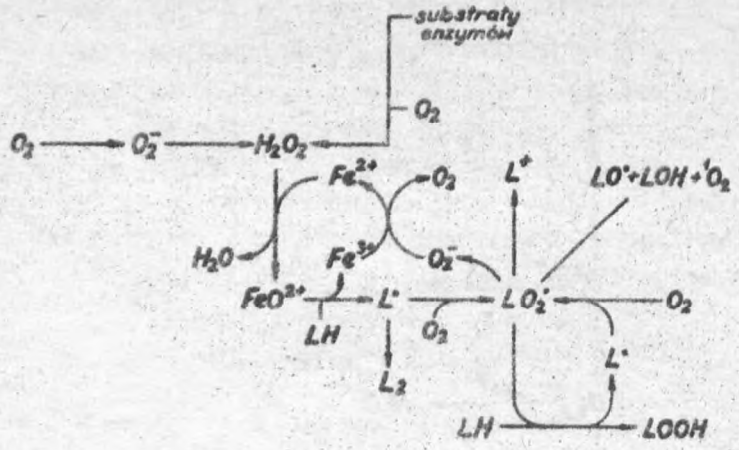


Rys. 5. Produkty redukcji tlenu wg Bannistera i Hilla [10]

cja papainy [148]; powstawanie nadtlenków lipidów i obniżenie zawartości białek zawierających grupy SH [200].

Badając wpływ dysmutazy i zmiataczy rodników hydroksylowych na wybrane procesy stwierdzono w ich obecności: inhibicję peroksydacji lipidów błon komórkowych [83, 104] i hemolizy wywołanej działaniem kwasu dihydroksyfumarowego [76], natomiast stymulację procesu aktywacji rozpuszczalnej cyklazy guanylowej mózgu szczura [256]. Zaobserwowano również wzrost żywotności napromieniowanych komórek w przypadku limfocytów oraz przeżywalności organizmów w przypadku myszy, którym podano preparaty dysmutazy [192, 193]. Dysmutaza ponadtlenkowa pośrednio zapobiega powstawaniu reaktywnych jonów FeO^{2+} i rodników organicznych. Powstawanie wymienionych rodników i ich ewentualny udział we współodpowiedzialności za toksyczność tlenu obrazuje hipotetyczny schemat opracowany przez K o p p e n o l a [129] (rys. 6).

Rola ochronna dysmutazy sprowadza się do zapobiegania cyklicznym reakcjom utleniania i redukcji żelaza przy wspierającym



Rys. 6. Współodpowiedzialność anionorodnika ponadtlenkowego za toksyczność tlenu [129]. LH oznacza związek organiczny, LOOH - organiczny wodoronadtlenek

udziale anionorodników ponadtlenkowych i powstawaniu rodników organicznych w 1-elektronowej reakcji redukcji wodoronadtlenków (LOOH). Jeżeli podczas utleniania rodników organicznych L$^\cdot$ przez tlen powstają rodniki ponadtlenkowe, to redukują jony żelazowe, które mogą znów reagować z inną cząsteczką wodoronadtlenku w cyklu reakcji łańcuchowych. Innymi słowy tlen spełnia rolę zmiatacza rodników organicznych, pozostawiając produkt reakcji, tj. anionorodnik ponadtlenkowy do dyspozycji dysmutazy ponadtlenkowej.

3. CEL BADAŃ WŁASNYCH

Podjęte badania koncentrują się wokół zagadnienia enzymatycznej ochrony komórki przed wolnymi rodnikami. Do generowania wolnych rodników postanowiono zastosować promieniowanie gamma w zakresie dawek, które pozwalają określić zmiany badanych parametrów dostępnymi metodami.

Materiałem użytym do badań były erytrocyty świni. Przy wyborze tego materiału kierowano się następującymi względami:

- odrębnością metabolizmu erytrocytów świni w stosunku do erytrocytów innych ssaków stwierdzoną w latach 1979, 1980, a związaną głównie z faktem, że komórki te nie metabolizują glukozy. Zdolność tę zwierzęta zatracają w miesiąc po urodzeniu na skutek uruchomienia mechanizmu hamującego przenikanie tego węglowodanu do wnętrza komórki [107, 121, 244];

- wynikami wcześniejszych badań dotyczących popromiennych zaburzeń metabolizmu energetycznego erytrocytów świni [99, 108, 116, 117], które wskazują m. in. na mniejsze zmiany badanych parametrów, niż ma to miejsce w przypadku erytrocytów człowieka i krowy.

Przedmiotem przedstawionych w tej pracy badań są przede wszystkim błony erytrocytarne, które w tych pozbawionych jądra komórkach stanowią główną "tarczę" narażoną na działanie promieniowania jonizującego.

Bezpośrednim celem pracy było określenie popromiennych zmian aktywności enzymów chroniących błony przed procesami peroksydacji lipidów oraz ewentualne powiązanie ich ze zmianami wybranych właściwości strukturalnych i funkcjonalnych błon erytrocytarnych.

Zastosowano trzy wskaźniki uszkodzeń strukturalnych błon, a mianowicie badano aktywność hydrolazy acetylocholiny, białka błony zlokalizowanego na jej zewnętrznej powierzchni, oporność osmotyczną erytrocytów oraz stopień peroksydacji lipidów.

Natomiast zaburzenia procesów transportu przez błony przyjęto jako wskaźnik zmian właściwości funkcjonalnych błon. W badaniach postanowiono posłużyć się metodą znaczników spinowych. Ponadto w doświadczeniach przeprowadzonych za pomocą metody elektronowego rezonansu paramagnetycznego zastosowano promieniowanie jonizujące dla rozróżnienia dróg przenoszenia związków przez błony erytrocytarne.

Pośrednim celem badań była próba określenia jak dalece ochrona enzymatyczna komórki może przeciwdziałać zmianom strukturalnym i funkcjonalnym błony komórkowej, wywołanym działaniem wolnych rodników.

4. MATERIAŁ I METODY

4.1. Izolowanie erytrocytów

Materiałem badań były erytrocyty krwi świni, otrzymywanej z Zakładów Mięsnych w Łodzi. Krew każdorazowo od jednego osobnika pobierano na ACD i wirowano kilka razy z 0,9% NaCl w celu odmycia krwinek. Do przemytych krwinek dodawano równą objętość soli fizjologicznej lub buforu fosforanowego w zależności od rodzaju przeprowadzanych oznaczeń i mieszano, uzyskując odpowiednią zawiesinę.

4.2. Izolowanie błon erytrocytarnych

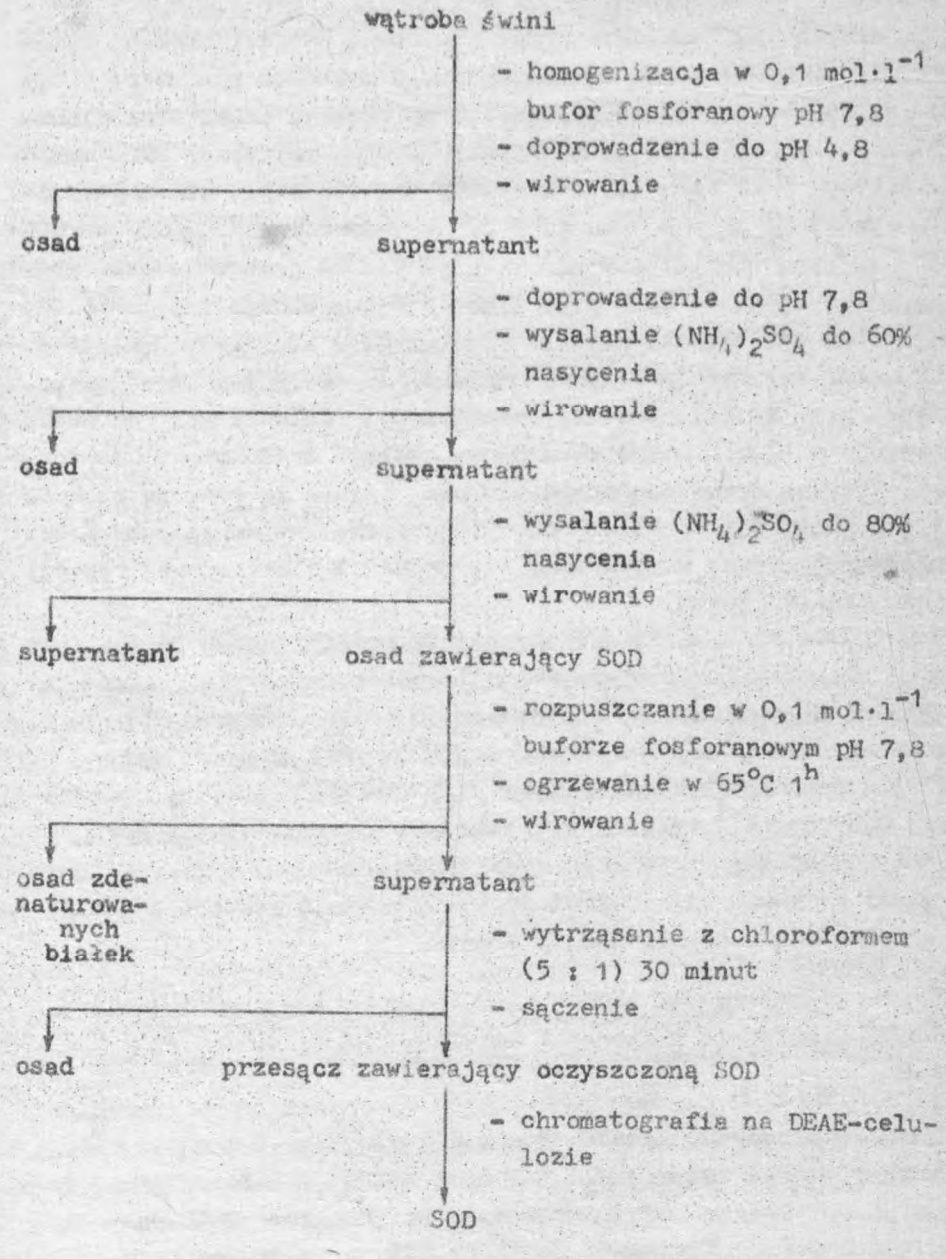
Błony erytrocytów świni izolowano metodą D o d g e'a [49]. Erytrocyty przemyte 0,9% roztworem NaCl hemolizowano w czasie 0,5 godziny w 5-krotnej objętości hipotonicznego buforu Tris-HCl, 30 mmol $\cdot l^{-1}$ o pH 7,4. Hemolizat odwirowywano przy 15 tys. obrotów na minutę przez 30 minut, błony przemywano 3-krotnie buforem Tris-HCl 30 mmol $\cdot l^{-1}$ o pH 7,4, a następnie tym samym buforem, ale rozcieńczonym w stosunku 1 : 1, aż do uzyskania kremowej barwy preparatu. Preparatykę wykonywano w temperaturze 0-4°C.

4.3. Preparatyka dysmutazy ponadtlenkowej (E.C. 1.15.1.1)

Dysmutazę ponadtlenkową otrzymywano z wątroby świni metodą F r i e d a i wsp. [72]. Otrzymane preparaty poddawano dalszemu oczyszczaniu, polegającemu na dializie wobec 2,5 mmol $\cdot l^{-1}$ buforu potasowofosforanowego, pH 7,4, chromatografii na DEAE celulozie w gradiencie stężeń fosforanów 2,5 mmol $\cdot l^{-1}$ - 5 mmol $\cdot l^{-1}$ i dializie wobec 0,1 mmol $\cdot l^{-1}$ buforu sodowofosforanowego o pH 7,8. Metodę preparatyki dysmutazy przedstawiono na schemacie 1. Inaktywację enzymu przeprowadzano metodą denaturacji cieplnej (100°C, 10 minut).

Schemat 1

Preparatyka dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) [108]



4.4. Oznaczanie aktywności dysmutazy ponadtlenkowej

Aktywność enzymu oznaczano na podstawie inhibicji redukcji błękitu nitrotetrazolowego (NBT) w układzie zawierającym oksydazę ksantynową [73] oraz metodą M i s r y i F r i d o v i c h a [171], opartą na hamowaniu przez dysmutazę ponadtlenkową samoutleniania adrenaliny do adrenochromu. W metodzie pierwszej 1,5 ml zawiesiny reakcyjnej zawierało: 1 mg błękitu nitrotetrazolowego, 2,5 µmola EDTA, 50 µg fenazyny, 250 µg żelatyny, 250 µmola hipoksantyny oraz taką ilość oksydazy ksantynowej, która powodowała przyrost A_{540} o 0,1 na minutę, w temperaturze 22°C, w 0,1 $mol \cdot l^{-1}$ buforze sodowofosforanowym o pH 7,8. Za jednostkę aktywności enzymu przyjmowano taką jego ilość, która powoduje 50% inhibicję reakcji redukcji błękitu nitrotetrazolowego w stosowanym układzie.

Podstawą tej metody jest reakcja, w wyniku której hipoksantyna przy udziale oksydazy ksantynowej utlenia się do kwasu moczowego, a błękit nitrotetrazolowy zostaje zredukowany do formazanu. Aktywna dysmutaza ponadtlenkowa hamuje tę reakcję poprzez katalizę dysmutacji rodników ponadtlenkowych, wytwarzanych przez zredukowaną oksydazę ksantynową, na drodze 1-elektronowej reakcji z tlenem cząsteczkowym.

W metodzie Misry i Fridovicha rodnik ponadtlenkowy jest inicjatorem i propagatorem ciągu reakcji wolnorodnikowych składających się na samoutlenianie adrenaliny do adrenochromu w pH 10,2. Pomiar przeprowadzono w temperaturze 25°C przy długości fali 480 nm [171]. Szybkość samoutleniania 0,3 $mmol \cdot l^{-1}$ adrenaliny oznaczano w 0,05 $mol \cdot l^{-1}$ buforze węglanowym w obecności 0,001 $mol \cdot l^{-1}$ EDTA. Za jednostkę aktywności dysmutazy ponadtlenkowej przyjęto taką ilość enzymu, która powoduje 50% hamowanie reakcji adrenalina - adrenochrom w czasie jednej minuty.

4.5. Oznaczanie aktywności katalazy (E.C. 1.11.1.6)

Katalazę oznaczano metodą B e e r s a i S i z e r a [16], opartą na pomiarze zużycia H_2O_2 w 0,05 $mol \cdot l^{-1}$ buforze fosforanowym o pH 7. Pomiar przeprowadzano w temperaturze 25°C przy długości fali 240 nm. Aktywność katalazy podano w jednostkach Berg-

meyera (BU/g Hb). Jednostka aktywności katalazy odpowiada takiej ilości enzymu, która powoduje rozkład 1 g H_2O_2 w czasie jednej minuty.

4.6. Oznaczanie aktywności peroksydazy (E.C. 1.11.1.9)

Aktywność enzymu oznaczano metodą opartą na bezpośrednich pomiarach wzrostu absorpcji wywołanego utlenianiem guajakolu przez peroksydazę w obecności nadtlenku wodoru w 0,01 $mol \cdot l^{-1}$ buforze fosforanowym, pH 7. Pomiar przeprowadza się w temperaturze 25°C, przy długości fali 470 nm [43]. W erytrocytach oznaczenie aktywności dotyczy w głównej mierze peroksydazy glutationowej (E.C. 1. 11.1.9). Za jednostkę aktywności przyjęto taką ilość enzymu, która w ciągu 10 minut katalizuje utworzenie 1 µmola utlenionej formy guajakolu.

4.7. Oznaczanie aktywności hydrolazy acetylocholinowej (E.C. 3.1.1.7)

Aktywność enzymu określano metodą E l l m a n a i wsp. [54]. Do 3 ml 0,1 $mol \cdot l^{-1}$ buforu sodowofosforanowego, pH 8, dodawano: 20 µl 0,075 $mol \cdot l^{-1}$ jodanu acetylotiocholiny, 100 µl 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoesanu (0,01 $mol \cdot l^{-1}$ w 0,1 $mol \cdot l^{-1}$ buforze fosforanowym, pH 7 i 0,02 $mol \cdot l^{-1}$ kwaśnym węglanie sodowym) i 50 µl hemolizatu. Oznaczenia wykonywano przy 500 nm. Za jednostkę aktywności przyjęto ilość µmoli rozłożonego substratu w czasie 1 minuty.

4.8. Badanie oporności osmotycznej erytrocytów

Oporność osmotyczną erytrocytów oznaczano po 24 i 48 godzinach po napromieniowaniu zawiesin erytrocytarnych. 50 µl zawiesiny erytrocytarnej wprowadzano do 5 ml NaCl, stosując serię roztworów o stężeniach wzrastających aż do izotonicznego. Po 1-godzinnej inkubacji w temperaturze 37°C próbki wirowano i oznaczano ab-

sorbancje supernatantów przy 540 nm. Stopień hemolizy obliczano porównując absorbancje próbek otrzymanych przez wprowadzenie erytrocytów do odpowiedniego roztworu NaCl i absorbancje próbek otrzymanych przez wprowadzenie erytrocytów do wody destylowanej (100% hemoliza). Po napromieniowaniu erytrocyty do czasu oznaczeń przechowywano w temperaturze 0-4°C.

4.9. Oznaczanie zawartości białka w preparatach błon

Stężenie białka w preparatch błon erytrocytów świni oznaczano metodą L o w r y ' e g o oraz w obec ści SDS metodą L e e s a i P a x m a n a [140, 158].

4.10. Oznaczanie hemoglobiny

Zawartość hemoglobiny w preparatach błon erytrocytarnych oznaczano po rozpuszczeniu błon w SDS na podstawie absorbancji kompleksu SDS-hemoglobina przy długości fali 407 nm. Przed oznaczeniem błony rozpuszczone w 1% roztworze SDS inkubowano w temperaturze 37°C przez 24 godziny.

Przy oznaczeniach transportu znaczników spinowych poprzez błony erytrocytarne zawartość hemoglobiny w supernatancie oznaczano przy 540 nm metodą Z i j l s t r a i V a n K a m p e n a [261].

4.11. Oznaczanie stopnia peroksydacji lipidów

Zawartość końcowych produktów peroksydacji lipidów błonowych, tj. dialdehydu malonowego, oznaczano poprzez reakcję z kwasem tiobarbiturowym według metody F o n g a i wsp. [68]. Oznaczenia wykonywano na błonach erytrocytarnych o stężeniu 3 mg białka/ml przy długości fali 535 nm. Do 1 ml błon dodawano 1 ml 0,5% TCA i 2 ml 0,5% kwasu tiobarbiturowego. Po 90-minutowej inkubacji w temperaturze 60°C dodawano 2 ml 70% TCA i 3 ml chloroformu, wytrząsano i następnie wirowano. Oznaczenia absorbancji wykonywano dla roztworów pobranych z górnej warstwy mieszaniny.

4.12. Oznaczenia szybkości transportu znaczników spinowych poprzez błony erytrocytarne

Erytrocyty zawieszano w buforze fosforanowym o składzie: 145 mmol · l^{-1} NaCl, 5 mmol · l^{-1} KCl, 1 mmol · l^{-1} $CaCl_2$, 1 mmol · l^{-1} $MgSO_4$, 3,5 mmol · l^{-1} Na_2HPO_4 i 1,5 mmol · l^{-1} NaH_2PO_4, pH 7. Zawiesinę erytrocytów o hematokrycie 50% inkubowano 30 minut w temperaturze 37°C, a następnie dodawano znakowane spinowo związki. Do badań transportu stosowano: nieelektrolity (2,2,6,6-tetrametylopiperydyno-1-oksyl, TEMPO), (4-hydroksy-2,2,6,6-tetrametylopiperydyno-1-oksyl, TEMPOL), kation - TEMPO-cholinę i anion (3-karboksy-2,2,5,5-tetrametylopirolidyno-1-oksyl). Końcowe stężenie znaczników spinowych w zawiesinie erytrocytów wynosiło 100 μmol · l^{-1}, tylko dla TEMPO-choliny 1000 μmol · l^{-1}. Szybkość przenikania znakowanych spinowo związków poprzez błonę oznaczano badając zmiany ich stężenia w supernatancie otrzymanym po odwirowaniu erytrocytów po odpowiednim czasie inkubacji w temperaturze 37° C [209].

4.13. Pomiary stężenia znaczników

Pomiary wykonywano na spektrometrze SE/X-28 produkcji Politechniki Wrocławskiej, stosując stałą czasową τ = 45 s, czas przemiatania 500 s, wzmocnienia rzędu 10^4 - 10^5, tłumienie 10 dB i zakresy przemiatania 5 mT lub 10 mT.

4.14. Napromienianie erytrocytów i błon erytrocytarnych

Zawiesiny erytrocytów i błon erytrocytarnych poddawano działaniu promieniowania gamma ze źródeł ^{60}Co Gamma-Cell 200 (moc dawki około 600 Gy/h i 800 Gy/h) i w komorze radiacyjnej Politechniki Łódzkiej (moc dawki: 5 kGy/h i 10 kGy/h). Preparaty napromieniano w temperaturze pokojowej, w atmosferze powietrza i podtlenku azotu.

4.15. Obliczenia statystyczne

Przy opracowywaniu wyników posługiwano się sparowanym i niesparowanym testem t-Studenta [260].

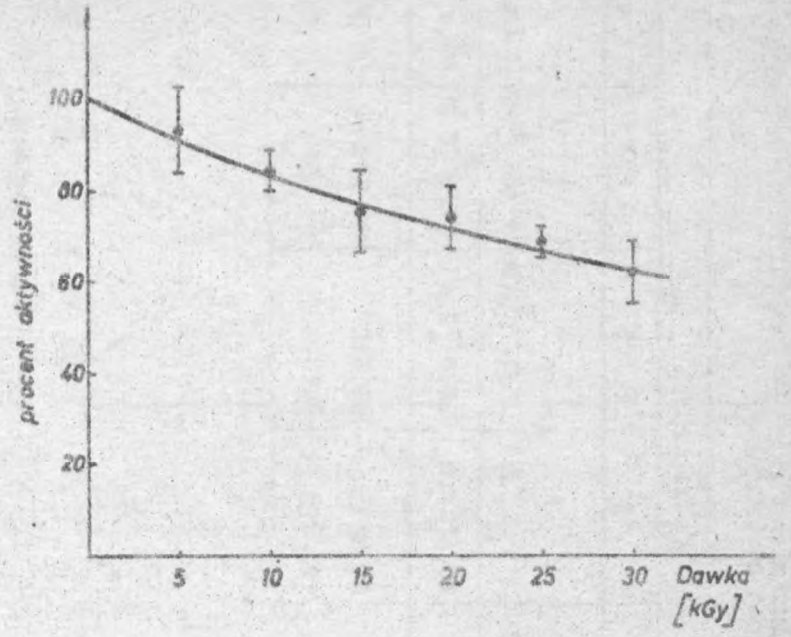
5. WYNIKI

5.1. Ochrona błon erytrocytarnych przed wolnymi rodnikami

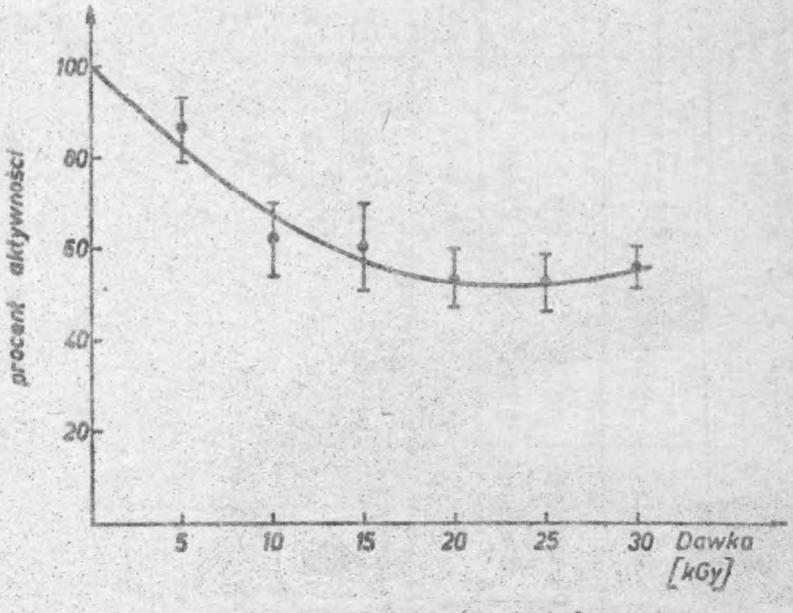
5.1.1. Enzymy metabolizmu nadtlenków

Przeprowadzone uprzednio badania nad wpływem produktów radiolizy wody na zaburzenia metabolizmu energetycznego nasuwały przypuszczenie, że enzymy odpowiedzialne za usuwanie toksycznych form tlenu powinny zachowywać wysoką aktywność również w komórkach eksponowanych na wysokie dawki promieniowania. Napromienianie erytrocytów małymi dawkami promieniowania nie powodowało zmian aktywności enzymów. Inaktywację dysmutazy ponadtlenkowej i katalazy oraz wzrost aktywności peroksydazy powodowało promieniowanie o dawkach 5-30 kGy.

Aktywność dysmutazy maleje powoli ze wzrostem dawek, zachowując przy 30 kGy 60% aktywności komórek nienapromieniowanych (rys. 7). W procesie inaktywacji katalazy notowano liniowy spadek aktywności enzymu do 15 kGy i utrzymanie aktywności na poziomie 50-55% wartości kontrolnych dla dawek 20-30 kGy (rys. 8). Dla peroksydazy w zakresie stosowanych dawek obserwowano postępujący wzrost aktywności, osiągający 2-krotnie wyższe wartości przy dawkach 30 kGy w porównaniu z kontrolą (rys. 9). Załączona tab. 2 obrazuje aktywności enzymów erytrocytów świni wyrażone w jednostkach na 1 g hemoglobiny.



Rys. 7. Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej w napromieniowanych erytrocytach świni [115]

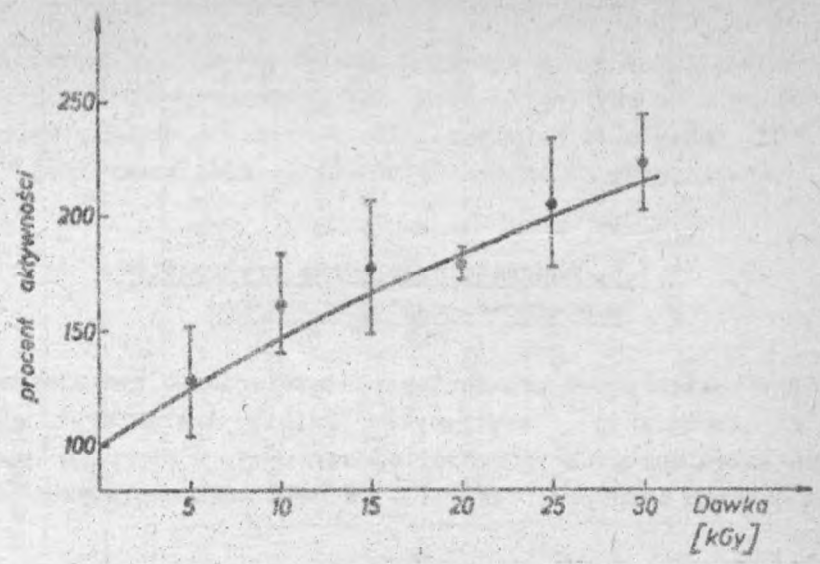


Rys. 8. Spadek aktywności katalazy po napromieniowaniu erytrocytów świni dawkami 5-30 kGy [115]

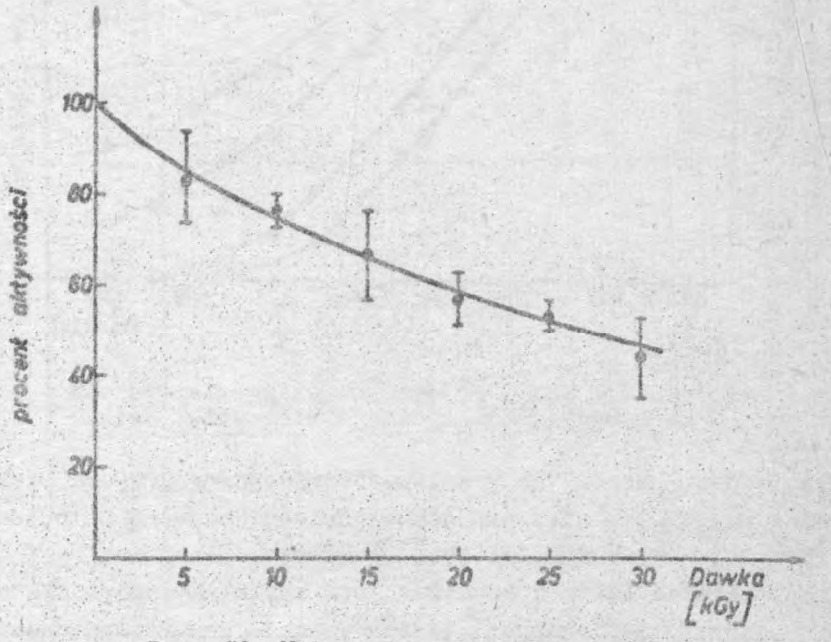
Tabela 2

Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej, katalazy i peroksydazy erytrocytów świni poddanych działaniu promieniowania gamma [115]
(w jednostkach na gram hemoglobiny)

Enzym	Kontrola	Dawki (kGy)					
		5	10	15	20	25	30
Dysmutaza ponadtlenkowa	2 814 ±436	2 626 ±307	2 389 ±128	2 118 ±261	2 088 ±207	1 945 ±76	1 732 ±195
Katalaza	33,8 ±6,7	29,2 ±2,4	21,0 ±3,1	20,6 ±3,8	18,0 ±2,4	17,6 ±2,2	19,2 ±1,8
Peroksydaza	28 168 ±6 791	36 015 ±6 400	45 297 ±4 800	49 857 ±11 173	50 510 ±530	57 730 ±5 855	62 250 ±9 858



Rys. 9. Zmiany aktywności peroksydazy napromieniowanych erytrocytów świni [115]



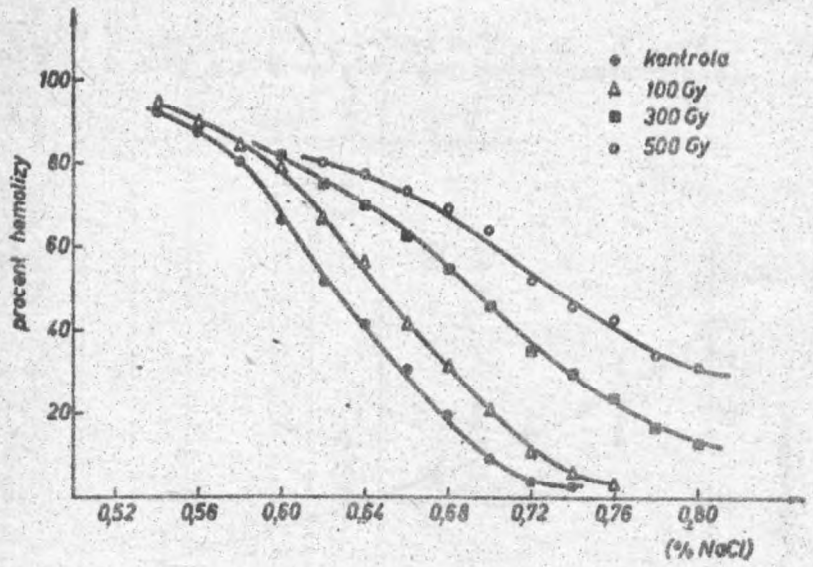
Rys. 10. Wpływ promieniowania na aktywność erytrocytarnej hydrolazy acetylocholiny [115]

5.1.2. Hydrolaza acetylocholiny

Promieniowanie gamma wywołuje spadek aktywności hydrolazy acetylocholiny błon erytrocytarnych dla stosowanych dawek 5-30 kGy (rys. 10). Aktywność enzymu malała ze wzrostem dawek promieniowania, osiągając przy 30 kGy około 50% aktywności kontrolnej.

5.1.3. Oporność osmotyczna erytrocytów w obecności radioprotektorów

Dla wysokich dawek promieniowania stwierdzono zmniejszanie oporności osmotycznej erytrocytów świni, charakteryzujące się przesunięciem krzywych oporności osmotycznej w kierunku wyższych stężeń chlorku sodowego (rys. 11). W celu porównania skuteczności



Rys. 11. Wpływ różnych dawek promieniowania na oporność osmotyczną erytrocytów świni

działania protektorów na wrażliwość osmotyczną krwinek wyliczono wartości $C_{50\%}$, tj. stężenie odpowiedniego roztworu hipotonicznego, powodującego 50% hemolizę. Zarówno enzymatyczne jak i chemiczne zmiatacze wolnych rodników nie zmieniały oporności osmotycznej nienapromieniowanych erytrocytów. Ze wzrostem dawek mala-

Tabela 3

Oporność osmotyczna kontrolnych i napromieniowanych erytrocytów świni w obecności zmiataczy wolnych rodników tlenowych*

Dodane zmiatacze	Stężenie	$C_{50\%} \pm s$			
		kontrola	100 Gy	300 Gy	500 Gy
-	-	0,62 ±0,01	0,64 ±0,01	0,69 ±0,02	0,73 ±0,01
Dysmutaza ponadtlenkowa	200 µg/ml	0,62 ±0,02	0,62 ±0,01	0,66 ±0,02**	0,70 ±0,01*
Katalaza	200 µg/ml	0,62 ±0,01	0,62 ±0,02	0,66 ±0,02**	0,69 ±0,02**
Cysteina	200 µg/ml	0,62 ±0,02	0,64 ±0,01	0,67 ±0,01**	0,70 ±0,02**
Glutation	200 µg/ml	0,62 ±0,01	0,63 ±0,01	0,67 ±0,01**	0,71 ±0,01**
DMSO	$3,5 \times 10^{-2}$ mmol · l^{-1}	0,62 ±0,02	0,64 ±0,02	0,67 ±0,01	0,70 ±0,02**
Histydyna	200 µg/ml	0,62 ±0,01	0,63 ±0,02	0,66 ±0,01**	0,70 ±0,02**
Glukoza	6 mmol · l^{-1}	0,62 ±0,01	0,64 ±0,03	0,68 ±0,01	0,71 ±0,02**
Trinitrofenol	0,2 mmol · l^{-1}	0,62 ±0,02	0,64 ±0,01	0,67 ±0,02**	0,71 ±0,01**

*Erytrocyty napromieniano w atmosferze powietrza (n = 5).

**$p < 0,05$ oznaczony za pomocą testu t-Studenta.

ła oporność osmotyczna komórek, ale wzrastały efekty ochronne protektorów (tab. 3). Przy dawkach 300 Gy, dysmutaza ponadtlenkowa, rozkładająca rodniki ponadtlenkowe, jest równie efektywna jak katalaza i histydyna, zastosowana jako zmiatacz tlenu singletowego (tab. 3). Dla dawki 500 Gy statystycznie znamienny wzrost oporności otrzymano w przypadku wszystkich stosowanych związków.

5.1.4. Zmiany oporności osmotycznej erytrocytów w obecności soli o różnych anionach badane w atmosferze powietrza

W stosowanych warunkach do 48 godzin nie obserwowano zmian oporności osmotycznej nienapromieniowanych komórek. W próbach kontrolnych, badanych w obecności soli o różnych anionach, nie wykazano również większych różnic we wrażliwości erytrocytów. Wyjątek stanowi anion bromkowy, w obecności którego występuje przesunięcie krzywych oporności w stronę wyższych stężeń chlorku sodowego.

Zmiany wrażliwości erytrocytów napromieniowanych zależą od rodzaju anionu, jego stężenia i czasu inkubacji. Największy udział w popromiennym uszkodzeniu erytrocytów świni mają azydki, dla których 50% hemolizę notowano po 24 godzinach dla 0,83% NaCl i po 48 godzinach dla stężeń chlorków powyżej 0,85%. Porównując wpływ pozostałych anionów o stężeniu 5 mmol·l^{-1}, bromek i rodanek zwiększają wrażliwość osmotyczną do 24 godzin w równym stopniu, natomiast po 48 godzinach zaznacza się zwiększony efekt działania bromku. Jodek i mrówczan wywierają wyraźnie mniejszy wpływ na badany parametr. Biorąc pod uwagę wpływ anionów na popromienne uszkodzenia erytrocytów świni w atmosferze powietrza, można je uszeregować w następującej kolejności:

$$J^- < COO^- < SCN^- < Br^- < N_3^-$$

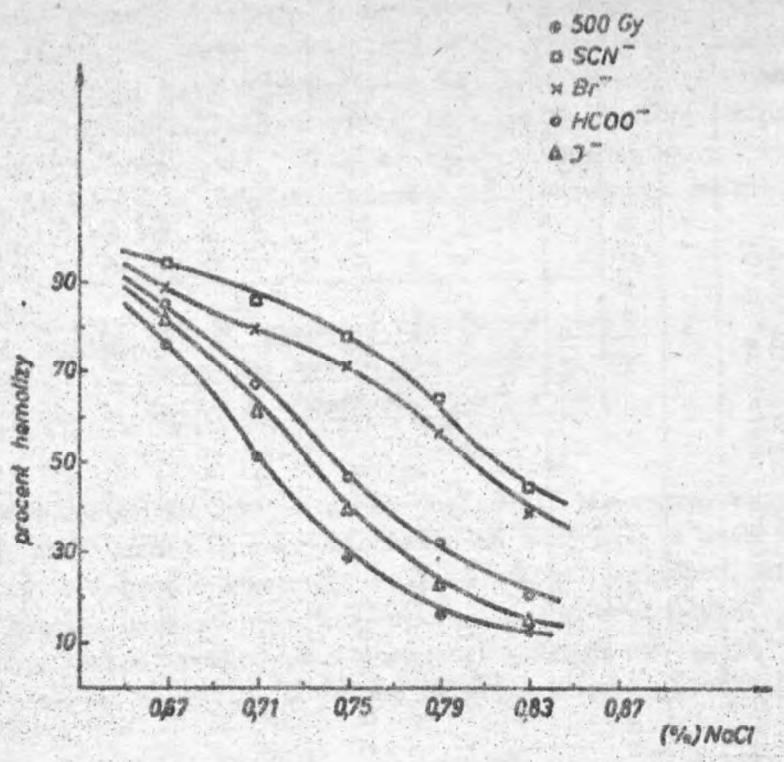
Wyniki oznaczeń oporności osmotycznej erytrocytów zostały przedstawione na rys. 12 i w tab. 4.

Tabela 4

Wpływ dodanych związków na oporność osmotyczną erytrocytów świni, kontrolnych i napromieniowanych w atmosferze powietrza* [110]

Dodane związki	Stężenie ($mmol \cdot l^{-1}$)	$C_{50\%} \pm s$			
		24 godziny		48 godzin	
		kontrola	500 Gy	kontrola	500 Gy
-	-	0,68 ±0,011	0,71 ±0,008**	0,67 ±0,005	0,77 ±0,08**
KBr	1,0	0,70 ±0,010*	0,75 ±0,011**	0,70 ±0,008**	0,83 ±0,013**
	5,0	0,72 ±0,013*	0,80 ±0,013**	0,72 ±0,008**	>0,86
	1,0	0,67 ±0,008	0,71 ±0,010	0,67 ±0,005	0,76 ±0,009
NaJ	5,0	0,68 ±0,011	0,73 ±0,008**	0,69 ±0,013	0,79 ±0,010**
	1,0	0,68 ±0,011	0,72 ±0,010	0,68 ±0,011	0,82 ±0,005**
HCOONa	5,0	0,68 ±0,005	0,74 ±0,013**	0,69 ±0,005**	0,80 ±0,012**
	1,0	0,67 ±0,011	0,74 ±0,008**	0,68 ±0,007	0,83 ±0,009**
NH_4SCN	5,0	0,68 ±0,006	0,81 ±0,010**	0,69 ±0,012**	0,86 ±0,008**
NaN_3	1,0	0,67 ±0,011	0,72 ±0,006	0,67 ±0,011	0,79 ±0,008
	1,5	0,67 ±0,008	0,75 ±0,007**	0,67 ±0,009	0,85 ±0,012**
	2,0	0,68 ±0,008	0,83 ±0,011**	0,69 ±0,013**	>0,85

*Każdej wartości odpowiada średnia 5 oznaczeń wykonanych na krwi różnych osobników. $C_{50\%}$ - stężenie NaCl, przy którym obserwowano 50% hemolizę.
**$p < 0,05$ oznaczony za pomocą testu t-Studenta.



Rys. 12. Wpływ rodzaju anionu na oporność osmotyczną erytrocytów świni napromieniowanych w atmosferze powietrza. Wyniki dotyczą oznaczeń wykonanych w 24 godziny po napromieniowaniu [110]

5.1.5. Zmiany oporności osmotycznej erytrocytów w obecności anionów, badane w atmosferze podtlenku azotu

W analogicznych badaniach wykonanych w atmosferze N_2O, 50% hemolizę dla erytrocytów kontrolnych oraz napromieniowanych bez dodatku rozmaitych soli, obserwowano na ogół dla stężeń NaCl wyższych o około 0,01, aniżeli w atmosferze powietrza. W preparatach kontrolnych zmniejszenie oporności osmotycznej stwierdzano w przypadku obecności rodanku i azydku (tab. 5). W atmosferze N_2O dodatek bromku nie zmieniał właściwości błon erytrocytów nienapromieniowanych, podobnie jak dodatek jodku i mrówczanu.

Zmiatacze rodników hydroksylowych, do których należą mrówczan i jodek, nie wywierają spodziewanych efektów radioochronnych. In-

Tabela 5

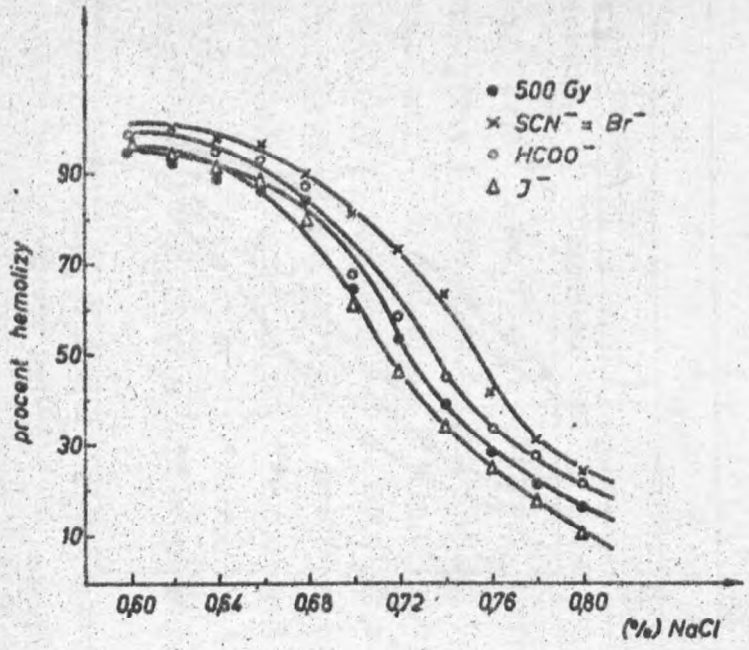
Wpływ dodanych związków na oporność osmotyczną erytrocytów świni, kontrolnych i napromieniowanych w obecności N_2O[110]*

Dodane związki	Stężenie ($mmol \cdot l^{-1}$)	$C_{50\%} \pm s$			
		24 godziny		48 godzin	
		kontrola	500 Gy	kontrola	500 Gy
-	-	0,68 ±0,013	0,72 ±0,010**	0,69 ±0,008	0,78 ±0,008**
KBr	1,0	0,68 ±0,007	0,73 ±0,011	0,69 ±0,015	0,80 ±0,005**
	5,0	0,69 ±0,013	0,76 ±0,013**	0,70 ±0,010	0,80 ±0,013**
NaJ	5,0	0,68 ±0,008	0,71 ±0,012	0,69 ±0,008	0,78 ±0,011
	7,0	0,68 ±0,009	0,72 ±0,007	0,69 ±0,013	0,79 ±0,011
HCOONa	5,0	0,69 ±0,010	0,74 ±0,009**	0,70 ±0,010	0,80 ±0,008
NH_4SCN	5,0	0,70 ±0,005**	0,76 ±0,011**	0,72 ±0,006**	0,80 ±0,011**
NaN_3	1,5	0,71 ±0,010**	0,75 ±0,011**	0,72 ±0,012**	0,82 ±0,008**

*Każdej wartości odpowiada średnia 6 oznaczeń wykonanych na krwi pobranej od różnych zwierząt [110].

**$p < 0,05$ oznaczony za pomocą testu t-Studenta.

ne aniony, tj. bromek, rodanek i azydek wywierają wyraźnie mniejszy wpływ na popromienne uszkodzenie błony erytrocytów w atmosferze N_2O niż w atmosferze powietrza (rys. 13).



Rys. 13. Udział anionów w zmianach oporności osmotycznej erytrocytów świni napromieniowanych w obecności N_2O. Dane przedstawiają wyniki badań po 24 godzinach po napromieniowaniu [110]

5.1.6. Peroksydacja lipidów w błonach erytrocytarnych

Reakcja kwasu tiobarbiturowego z końcowymi produktami peroksydacji lipidów ma charakter niespecyficzny, tzn. obok dialdehydu malonowego biorą w niej udział również inne związki. Z tego względu, podobnie jak to robią inni autorzy, nie przeliczano absorbancji przy 535 nm na stężenie dialdehydu malonowego. Zawartość produktów peroksydacji lipidów w preparatach błon wzrastała wraz ze wzrostem dawki promieniowania osiągając plateau dla dawek powyżej 20 kGy.

Proces peroksydacji nienasyonych kwasów tłuszczowych hamowała cysteina, glutation, DMSO i katalaza (tab. 6). Po dodaniu radioprotektorów obserwowano zmniejszenie ilości tworzonego dialde-

Tabela 6

Zawartość dialdehydu malonowego wyrażona jako wartości absorbancji przy 535 nm w kontrolnych i napromieniowanych błonach erytrocytarnych*

Dawka (kGy)	Dialdehyd malonowy (A_{535})					
	kontrola	dysmutaza ponadtlenkowa	katalaza	glutation	cysteina	DMSO
2,5	0,121 ±0,006	0,119 ±0,006	0,072 ±0,005	0,060 ±0,009	0,105 ±0,020	0,073 ±0,014
5,0	0,179 ±0,012	0,167 ±0,011	0,108 ±0,006	0,085 ±0,011	0,151 ±0,022	0,105 ±0,017
10,0	0,222 ±0,017	0,221 ±0,023	0,159 ±0,005	0,128 ±0,014	0,185 ±0,039	0,143 ±0,021
20,0	0,252 ±0,009	0,255 ±0,008	0,211 ±0,008	0,147 ±0,012	0,199 ±0,055	0,162 ±0,025

*Wartości średnie z 7 oznaczeń ± odchylenie standardowe.

hydu malonowego (wartości absorbancji przy 535 nm) w przypadku cysteiny średnio o 25%, glutationu o 45%, katalazy o 20% i DMSO o około 40%. Obecność dysmutazy ponadtlenkowej w preparatach błon erytrocytarnych świni nie zmieniała szybkości peroksydacji lipidów.

5.2. Transport przez błony erytrocytarne związków znakowanych spinowo

Zmiany szybkości transportu znaczników w niepromieniowanych zawiesinach erytrocytarnych i zawiesinach poddanych działaniu promieniowania gamma określano stosując znakowane połączenia, oddziałujące w sposób niekowalencyjny z błoną erytrocytarną. W celu wyeliminowania wysokiej promieniowrażliwości nitroksylowych znaczników spinowych i ograniczenia możliwości wpływu wprowadzonego znacznika na promieniowrażliwość błon, znakowane związki przyłączano już do napromieniowanych preparatów. Erytrocyty inkubowane ze związkami nitroksylowymi, posiadającymi zdolność przenikania przez błony, redukują je do pochodnych nieparamagnetycznych. Stąd w czasie inkubacji zawiesin erytrocytarnych ze znacznikiem występuje stopniowy zanik sygnału EPR. Szybkość zaniku sygnału znacznika w badanym układzie określa jego szybkość transportu poprzez błony.

Spinowo znakowane połączenia transportowane są z różną szybkością poprzez błony erytrocytarne. Najszybciej do komórek przenikają cząsteczki nieelektrolitów, tj. związek hydrofobowy TEMPO i hydrofilowy TEMPOL, w dalszej kolejności anion (3-karboksy-2,2,5,5-tetrametylopirolidyno-1-oksyl) i najwolniej kation TEMPO-cholina. W procesie transportu TEMPO przez błony erytrocytów świni obserwujemy szybką jego redukcję w czasie pierwszych 40-50 minut, potem następuje powolniejsze przenikanie cząsteczek przy dłuższych czasach inkubacji. Przebieg redukcji cząsteczki hydrofilowej jest również zależny od czasu inkubacji. Porównując połówkowe czasy redukcji znaczników, TEMPO jest redukowany dwukrotnie szybciej w niepromieniowanych erytrocytach świni niż cząsteczki TEMPOL-u (tab. 7, 8). Redukcja zastosowanego kationu i anionu występuje w czasie kilkunastu godzin.

Tabela 7

Szybkość redukcji TEMPO w zawiesinie kontrolnych i napromieniowanych erytrocytów świni [111]*

Czas inkubacji (minuty)	Kontrola	Dawki (kGy)			
		0,5	1	2	2,5
7	87,9 ±4,9	82,9 ±4,3	71,3 ±5,6	62,7 ±3,3	38,8 ±0,9
15	70,5 ±4,3	64,4 ±3,1	60,2 ±4,5	52,7 ±2,4	28,8 ±3,3
25	52,1 ±5,0	49,4 ±1,5	44,9 ±6,4	36,1 ±4,3	19,8 ±1,7
40	34,5 ±4,6	31,9 ±2,4	29,3 ±5,2	17,8 ±1,7	12,9 ±0,8
60	23,5 ±4,0	23,0 ±2,4	18,6 ±4,0	12,4 ±1,0	11,9 ±0,7
80	20,2 ±2,2	19,6 ±2,5	18,5 ±2,4	10,1 ±0,8	8,8 ±0,7
100	19,1 ±1,4	19,0 ±1,7	17,1 ±1,3	9,8 ±0,7	8,1 ±0,6
120	18.5 ±1,5	18,7 ±0,9	17,0 ±1,1	8,6 ±0,8	7,9 ±0,5
$T_{1/2}$	26,8 ±2,9	24,4 ±0,6	21,8 ±3,3	15,4 ±1,7	5,1 ±0,3

*Wyniki przedstawiają procentową zawartość niezredukowanego znacznika w supernatancie po określonym czasie inkubacji krwinek z TEMPO (n = 5). $T_{1/2}$ - czas, w którym została zredukowana połowa dodanego znacznika.

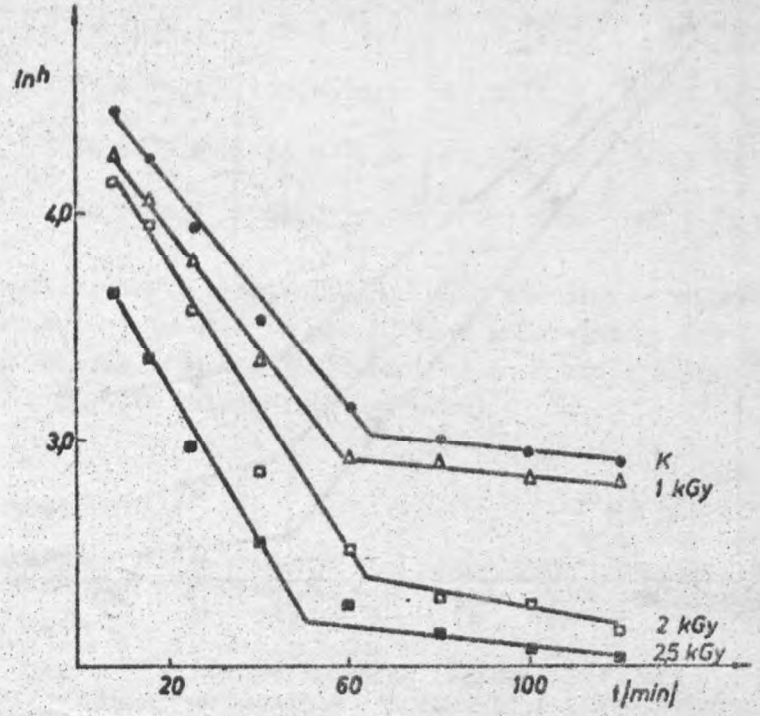
Tabela 8

Szybkość redukcji TEMPOL-u w zawiesinie kontrolnych i napromieniowanych erytrocytów świni [111]*

Czas inkubacji (minuty)	Kontrola	Dawki (kGy)			
		0,5	1	2	2,5
10	91,6 ±4,5	90,4 ±4,9	88,6 ±2,9	89,9 ±5,5	70,3 ±5,9
20	79,7 ±5,9	81,3 ±5,7	79,2 ±2,4	72,9 ±4,4	62,1 ±4,8
40	62,6 ±3,6	63,4 ±4,6	61,9 ±5,3	50,1 ±2,0	39,9 ±1,4
60	40,4 ±4,8	38,5 ±6,7	43,9 ±5,7	31,7 ±2,5	23,0 ±2,6
80	27,4 ±3,4	27,0 ±2,7	28,4 ±4,4	20,6 ±1,2	14,9 ±1,9
100	20,0 ±1,4	19,2 ±1,9	20,2 ±3,6	13,1 ±1,2	9,1 ±0,4
120	17,3 ±1,2	18,3 ±1,4	17,9 ±1,7	10,9 ±0,8	8,4 ±0,4
140	16,9 ±0,9	17,7 ±1,1	16,9 ±1,2	10,0 ±0,9	8,2 ±0,5
$T_{1/2}$	51,1 ±3,3	47,4 ±8,6	51,6 ±6,6	38,7 ±1,0	29,2 ±2,5

*Wyniki obrazują procent zawartości niezredukowanego znacznika spinowego w supernatancie po wyznaczonym czasie inkubacji krwinek z TEMPOL-em (n = 6).

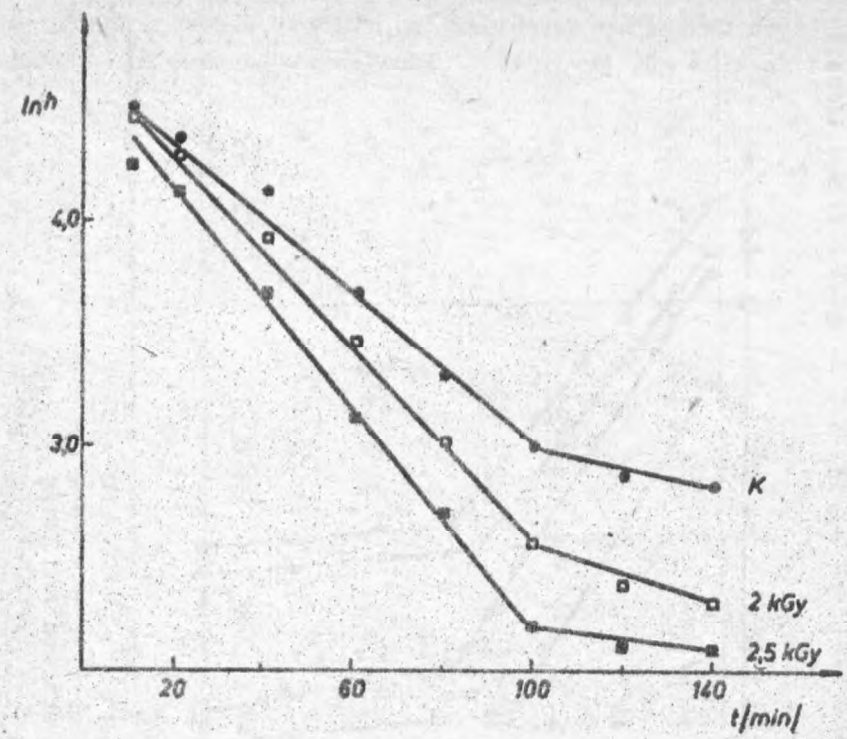
Promieniowanie gamma przyspiesza redukcję znaczników. Zmiany transportu znakowanych połączeń dla erytrocytów świni obserwowano przy różnych dawkach promieniowania. Wzrost redukcji TEMPO notowano od dawki 1 kGy (rys. 14). Różnice w szybkości redukcji



Rys. 14. Wpływ napromieniowania na szybkość redukcji TEMPO w zawiesinie erytrocytów świni [111]. ln h - logarytm wysokości "piku" sygnału EPR pochodzącego od znacznika w supernatancie

TEMPOL-u obserwowano dopiero dla dawki 2 kGy (rys. 15). Przyspieszenie redukcji TEMPO-choliny powodowały dawki 0,5 kGy (rys. 16), a redukcja anionu (3-karboksy-2,2,5,5-tetrametylopirolidyno-1-oksyl) występowała przy dawkach 1 kGy (rys. 17). Wartości procentowych zmian szybkości redukcji i połówkowych czasów redukcji ($T_{1/2}$) znaczników spinowych w kontrolnych i napromieniowanych erytrocytach świni przedstawiają tab. 7-10.

TEMPO, który jest najszybciej transportowany do nienapromieniowanych erytrocytów świni jest także najszybciej redukowany w napromieniowanych komórkach. Przy dawce 2,5 kGy połówkowy czas redukcji cząsteczek hydrofilowych TEMPOL-u jest o połowę niższy od wartości kontrolnej. W przypadku cząsteczek hydrofobowych $T_{1/2}$



Rys. 15. Szybkość redukcji TEMPOL-u
w napromieniowanych zawiesinach erytrocytarnych [111]

T a b e l a 9

Procentowe zmiany szybkości redukcji anionu
(3-karboksy-2,2,5,5,-tetrametylopirolidyno-1-oksyl)
przez nienapromieniowane i napromieniowane
zawiesiny erytrocytów świni (n = 7) [111]

Czas inkubacji (godziny)	Kontrola	Dawki (kGy)		
		0,5	1	2
1	2	3	4	5
1	83,1 ±5,1	75,8 ±7,9	71,9 ±2,0	69,7 ±6,3
2	76,8 ±4,6	73,9 ±7,7	67,7 ±3,6	67,7 ±5,5
3	71,3 ±4,1	69,3 ±6,9	64,9 ±1,9	59,0 ±5,2

Tabela 9 (cd.)

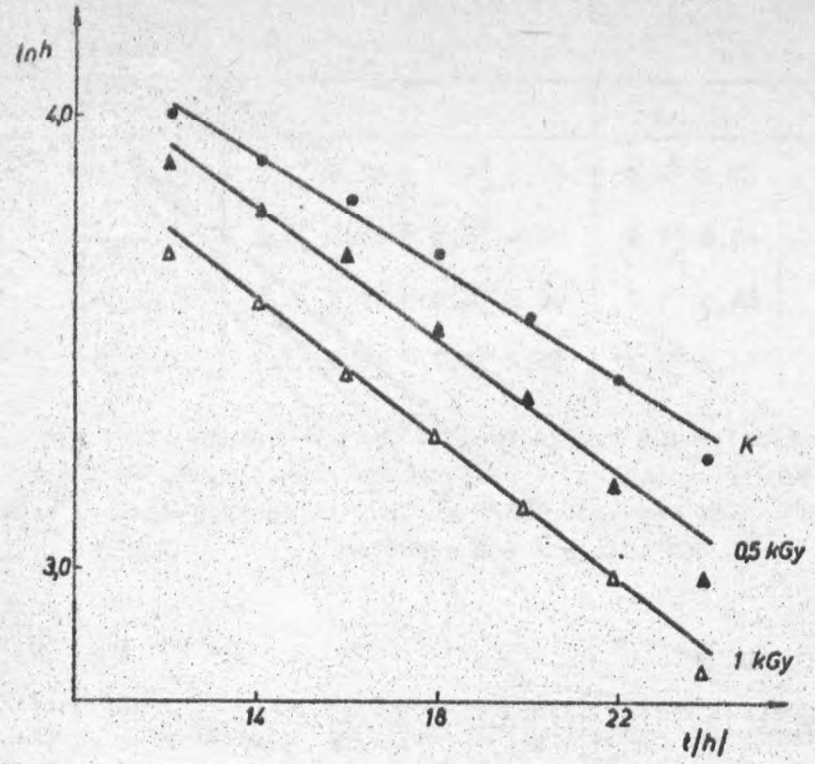
1	2	3	4	5
4	68,0 ±4,9	67,3 ±5,7	64,5 ±2,7	59,9 ±5,4
5	66,6 ±5,2	67,4 ±6,5	63,2 ±3,3	55,6 ±6,8
6	64,5 ±5,2	66,8 ±6,0	61,8 ±4,6	51,3 ±4,2
7	64,2 ±4,3	65,0 ±5,7	60,1 ±3,8	50,9 ±3,9

dla najwyższej dawki promieniowania jest 5-krotnie mniejszy od czasu redukcji znacznika w preparatach kontrolnych. Wartości połówkowych czasów redukcji TEMPO-choliny są funkcją dawki promieniowania i również maleją z ich wzrostem.

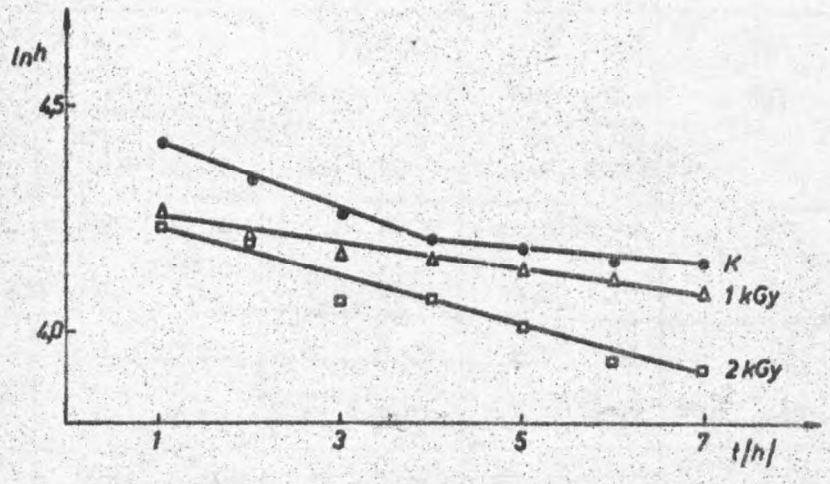
Tabela 10

Procentowe zmiany szybkości redukcji TEMPO-choliny [111] w zawiesinie nienapromieniowanych i napromieniowanych erytrocytów świni (n = 6)

Czas inkubacji (godziny)	Kontrola	Dawki (kGy)	
		0,5	1
12	55,1 ±2,2	49,0 ±2,8	40,2 ±2,1
14	49,8 ±1,9	44,0 ±2,1	36,0 ±3,7
16	45,6 ±2,8	39,7 ±2,2	30,4 ±2,4
18	40,8 ±2,6	33,6 ±3,7	27,1 ±3,6
20	35,1 ±0,8	29,7 ±4,7	23,1 ±1,8
22	30,6 ±2,8	23,8 ±3,0	20,0 ±0,4
24	25,3 ±1,6	19,8 ±1,3	15,9 ±1,5
$T_{1/2}$ (minuty)	852,0 ±44,0	756,0 ±50,0	614,0 ±48,0



Rys. 16. Zmiany szybkości redukcji TEMPO-choliny w erytrocytach poddanych działaniu promieniowania. ln h - logarytm wysokości "piku" sygnału EPR pochodzącego od znacznika w supernatancie [111]



Rys. 17. Redukcja anionu (3-karboksy-2,2,5,5-tetrametylopirolidyno-1-oksyl) w napromieniowanych zawiesinach erytrocytarnych [111]

DYSKUSJA

Przeprowadzone uprzednio badania nad wpływem produktów radiolizy wody na zaburzenia metabolizmu energetycznego erytrocytów świni [108, 116, 117] wskazują na dużą oporność tych komórek na działanie promieniowania jonizującego.

W powyższych pracach z erytrocytów izolowano związki rozpuszczalne w kwasie trichlorooctowym metodą B a r t l e t t a [12], a następnie rozdzielano nukleotydy za pomocą chromatografii ciągłej w układzie kwasu mrówkowego i mrówczanu amonu [170]. Zawartość nukleotydów w poszczególnych frakcjach wyliczono na podstawie pomiaru absorbancji przy 260 nm oraz oznaczenia zawartości fosforu [1]. Stwierdzono, że promieniowanie gamma powoduje statystycznie znamienny wzrost zawartości AMP o około 30% w zakresie dawek 10 Gy - 60 Gy. Stężenie ADP i ATP utrzymywało się na poziomie kontroli, przy czym powyżej dawki 50 Gy zaobserwowano niewielkie zmniejszenie zawartości ATP. Określano również aktywności ATP-azowe błon erytrocytarnych metodą E l l o r y ' e g o [55]. W przypadku $(Na^+ - K^+)$-ATP-azy stwierdzono dla dawki 100 Gy około 20%, a dla dawki 500 Gy około 50% spadek aktywności, zaś w przypadku Mg^{2+} ATP-azy dla dawki 100 Gy około 5% zaś dla dawki 8 kGy około 50% inhibicję enzymu [114].

Wyniki omawianych prac zostały opracowane matematycznie w celu bliższego określenia charakteru zmian zawartości nukleotydów pod wpływem stosowanych dawek promieniowania. Zawartości nukleotydów obliczone metodą najmniejszych kwadratów w oparciu o metodę aproksymacji [203] wskazują na dużą zgodność graficznej interpretacji danych eksperymentalnych z danymi wyliczonymi za pomocą funkcji matematycznych.

Przeprowadzone badania pozwoliły określić stan energetyczny komórek za pomocą tzw. "adenylates energy charge" (A.E.C.). Ładunek energetyczny adenilanów oblicza się ze wzoru [5]:

$$A.E.C. = \frac{1(ADP) + 2(ATP)}{2(AMP) + (ADP) + (ATP)}$$

Należy dodać, że ostatnio wysuwane są wątpliwości odnośnie do znaczenia informacji uzyskiwanych przez wyznaczenie A.E.C. Wartości A.E.C. erytrocytów napromienionych dawkami w zakresie 10 Gy -

0,5 kGy pozostawały w zasadzie na poziomie erytrocytów kontrolnych (0,82 $\pm$0,022). Najniższą wartość A.E.C. obserwowano dla dawki 0,3 kGy (0,79 $\pm$0,022).

Badania [108, 116, 117] wykazały więc stosunkowo małą wrażliwość puli adenilanów w erytrocytach świni na działanie promieniowania gamma w zakresie dawek od kilku Gy do kilku kGy. Dalsze badania wykazały również, że popromienne zmiany wrażliwości osmotycznej erytrocytów są mniejsze w przypadku erytrocytów świni niż erytrocytów człowieka i krowy. Ta stosunkowo duża oporność erytrocytów świni może być spowodowana odmiennymi właściwościami błony erytrocytarnej, uniemożliwiającej przenikanie glukozy do wnętrza komórki, a także bardziej skuteczną enzymatyczną ochroną przed wolnymi rodnikami względnie działaniem innych czynników.

W dalszym ciągu dyskusji w oparciu o uzyskane wyniki przedstawione zostaną cztery zagadnienia, a mianowicie:

- charakterystyka uszkodzenia erytrocytów przez promieniowanie i rola radioprotektorów enzymatycznych i chemicznych;
- wykorzystanie związków tiolowych w badaniach uszkodzeń popromiennych;
- rola rodników anionowych w popromiennym uszkodzeniu błon erytrocytarnych;
- zastosowanie metody EPR i promieniowania do rozróżnienia układów transportujących związki przez błony erytrocytarne.

6.1. Charakterystyka uszkodzenia erytrocytów przez promieniowanie i rola radioprotektorów enzymatycznych i chemicznych

Doświadczenia przeprowadzone na całych komórkach i wyizolowanych błonach świadczą o większej wrażliwości na promieniowanie enzymów w wyizolowanych błonach. Rodniki hydroksylowe, anionorodniki ponadtlenkowe i H_2O_2 są prawie równie efektywne w zaburzeniu właściwości osmotycznych jak i inaktywacji dehydrogenazy glicero-3-fosforanowej [125, 126]. Obecność tlenu przyspiesza degradację błon erytrocytów świni i człowieka [124].

Na podstawie uzyskanych w niniejszej pracy wyników stwierdzono, że zaburzenia transportu nieelektrolitów, anionu i kationu,

peroksydacja lipidów oraz inaktywacja enzymów metabolizmu nadtlenków, a także hydrolazy acetylocholiny występowały w zakresie tych samych dawek 2-20 kGy. Zlokalizowane w cytoplazmie enzymy metabolizmu nadtlenków, tj. dysmutaza ponadtlenkowa i katalaza inaktywowane, są powyżej 5 kGy (rys. 7-8), zmieniają się również właściwości peroksydacyjne erytrocytów (rys. 9). Hydrolaza acetylocholiny, uznana za jeden z bardziej wrażliwych wskaźników uszkodzenia błon erytrocytarnych [78], tutaj wykazuje wysoką oporność. Inaktywację enzymu notowano w zakresie tych samych dawek co enzymów metabolizmu nadtlenków (rys. 10).

Za jedną z przyczyn wysokiej oporności erytrocytów świni można uznać stosunkowo wysoką zawartość dysmutazy ponadtlenkowej w komórkach. Rola fizjologiczna enzymu usuwającego anionorodniki ponadtlenkowe polega na zapobieganiu łańcuchowym reakcjom wolnorodnikowym z udziałem bardziej toksycznych rodników hydroksylowych. Te z kolei są w komórce prekursorami rodników organicznych i nieorganicznych.

Katalaza i peroksydaza rozkładają H_2O_2, produkt procesów metabolicznych, dysmutacji rodników ponadtlenkowych i radiolizy wody. W komórkach erytrocytarnych enzymy te występują w niższych stężeniach od dysmutazy, ale i substrat enzymów jest mniej toksyczny. Wszystkie trzy enzymy zachowują wysoką aktywność w napromieniowanych erytrocytach, zdolne są zatem do pełnienia swych funkcji również w komórkach uprzednio eksponowanych na promieniowanie. Enzymy uczestniczą w rozkładzie endogennych rodników tlenowych oraz egzogennych generowanych podczas napromieniania preparatów erytrocytarnych.

Dysmutaza zachowuje wysoką aktywność także w napromieniowanych erytrocytach krowy, w erytrocytach i homogenatach różnych tkanek psów i szczurów, izolowanych ze zwierząt poddanych działaniu promieniowania [11, 131, 133]. Erytrocyty napromieniowanych zwierząt wykazywały wyraźny wzrost aktywności dysmutazy w kilka dni po ekspozycji. Jest to prawdopodobnie efektem wzmożonej syntezy enzymu w komórkach w odpowiedzi na podwyższony poziom rodników tlenowych.

Popromienna inaktywacja wyizolowanej dysmutazy erytrocytów wzrasta wykładniczo ze wzrostem stężenia enzymu. Proces inaktywacji jest reakcją drugiego rzędu i jest częściowo odwracalny. W obecności katalazy następuje wzrost aktywności enzymu. W spadku

aktywności dysmutazy ponadtlenkowej biorą udział cząsteczki H_2O_2 i rodniki ponadtlenkowe [38, 41, 222].

Drugą z przyczyn stosunkowo dużej oporności erytrocytów świni na promieniowanie wydaje się mała wrażliwość puli adenilanów w tych komórkach na działanie promieniowania.

Wzrost zawartości nukleotydów notowano dla cAMP w badaniach nad radioochronnym wpływem cysteaminy podanej napromieniowanym zwierzętom [182], w śledzionie i wątrobie w czasie 3-6 godzin po napromieniowaniu szczurów [236]. W napromienionym mózgu mimo spadku stężenia nukleotydu tuż po napromieniowaniu, po 4 godzinach obserwowano powrót jego zawartości do poziomu kontroli [102]. Zmiany w stężeniu cAMP skłaniają do sugestii, że wzrost zawartości nukleotydu jest naturalną odpowiedzią komórek na czynniki zewnętrzne, prowadzące do zaburzenia przemian metabolicznych i funkcji komórek.

Związki adeninowe znane są jako radioprotektory napromienianych komórek i zwierząt. Dodanie adeniny do napromieniowanych tymocytów powoduje wzrost żywotności komórek z jednoczesną odnową zawartości ATP [253]. Znane są też efekty ochronne ATP w kombinacji ze związkami tiolowymi i serotoniną [17]. Wzrost stężenia cAMP podczas napromieniowania tkanek pełni również rolę ochronną [142].

Erytrocyty charakteryzują się wysokim poziomem nukleotydów adeninowych. Stanowią one 70-80% wszystkich wolnych nukleotydów komórek. Można sugerować, że w erytrocytach świni wobec niezmienionej wartości A.E.C. przy dawkach do około 5 kGy udział ATP w procesach naprawczych zapewnia erytrocytom zachowanie właściwej struktury i funkcji. Działanie ATP w ochronie erytrocytów wspierane jest przez dysmutazę, katalazę, peroksydazę glutationową i w pewnym stopniu także przez glutation.

W inaktywacji ATP-azy udział biorą zarówno anionorodniki ponadtlenkowe jak i rodniki hydroksylowe [114]. Spośród protektorów chemicznych związki tiolowe charakteryzowały się wyraźnie wyższą efektywnością w usuwaniu skutków promieniowania aniżeli tiomocznik i DMSO. W obecności DMSO praktycznie nie wykazano wzrostu aktywności enzymu. Być może, że w tym przypadku związek ten zachował się podobnie jak po dodaniu do kultur bakteryjnych, powodując wzrost czasu życia wrażliwych rodników tlenowych [57]. Wyższa skuteczność dysmutazy ponadtlenkowej w usuwaniu rodników tle-

nowych nad związkami tiolowymi spowodowana jest częściową inaktywacją grup SH radioprotektorów chemicznych przez reaktywne rodniki obecne w napromienianych układach [3, 4].

W badaniach właściwości osmotycznych erytrocytów zastosowano obok związków rozkładających H_2O_2, rodników ponadtlenkowych i hydroksylowych histydynę, zmiatacz tlenu singletowego. Na podstawie wyliczonych wartości odpowiadających 50% hemolizie efekty ochronne stwierdzono dla wszystkich stosowanych związków. Wyniki prowadzą do wniosku , że błony komórkowe są jednym z najwrażliwszych miejsc komórek na napromieniowanie i narażone są w najwyższym stopniu na działanie wszystkich produktów radiolizy wody.

Badania nad rolą rodników w procesie peroksydacji lipidów błon erytrocytarnych przeprowadzono przy wysokich dawkach 10-20 kGy, ale i uzyskano niższe efekty ochronne. Hamowanie peroksydacji lipidów występowało w obecności zmiataczy rodników hydroksylowych przy niewielkim udziale katalazy (tab. 6). Obecność dysmutazy w tym układzie nie wywierała efektów ochronnych.

6.2. Wykorzystanie związków tiolowych w badaniach uszkodzeń popromiennych

Spośród wielu protektorów chemicznych znaczącą rolę w ochronie komórek przypisuje się niebiałkowym związkom tiolowym. Związki z tej grupy połączeń: GSH, cysteina, cysteamina są naturalnymi składnikami komórek. Obok protektorów enzymatycznych uczestniczą zarówno w bezpośrednich reakcjach z produktami radiolizy wody, jak i wtórnymi rodnikami powstałymi w wyniku oddziaływania pierwotnych rodników z makrocząsteczkami [8]. Radioochronne oddziaływanie związków tiolowych na komórki uzależnione jest od wielu czynników: dawki promieniowania, typu komórek, stężenia radioprotektorów, temperatury, pH, zawartości tlenu i innych związków obecnych w układzie [26, 45, 225, 240]. W warunkach beztlenowych w reakcji rodników hydroksylowych z glutationem powstają rodniki $GS^{\cdot}$. Rodniki te tworzą się poprzez 1-elektronową redukcję glutationu lub przeniesienie wodoru z węgla γ lub grupy aminowej na γ-glutamylową część cząsteczki. Wybór miejsca ataku przez rodniki hydroksylowe uzależniony jest od stopnia protonacji grup aminowych [225].

Działanie związków tiolowych zależy od ich stężenia i dawki promieniowania [26, 45]. Niskie stężenia zazwyczaj są toksyczne dla komórek. Efekty ochronne osiąga się przy wyższych stężeniach cysteiny, cysteaminy i niższych dawkach promieniowania. Najczęściej stosowana w roli radioprotektora cysteamina uznana została za najbardziej skuteczny związek chroniący komórki przed promieniowaniem. Jest to wynikiem również łatwego przenikania cysteaminy poprzez błony komórkowe i zdolności redukcji tlenu w przeciwieństwie do innych związków tiolowych [53, 238].

Cysteina, cysteamina i 2-aminoetyloizotiomocznik okazały się skutecznymi radioprotektorami w pracach doświadczalnych na zwierzętach. Cysteamina chroniła komórki chomika przed promieniowaniem [26], cysteina - erytrocyty krowy przed molizą [14] oraz kultury komórkowe przed toksycznym działaniem poliamin [45].

W obecności cysteaminy obserwowano wzrost metabolizmu beztlenowego erytrocytów ludzkich i tlenowego metabolizmu glukozy [39, 40]. Glutation zmniejszał efekty popromienne w przypadku komórek Escherichia coli [177].

W pracach poprzednich [99, 108] i obecnych dotyczących wpływu promieniowania na erytrocyty świni, cysteina i glutation w pH fizjologicznym chroniły $(Na^+ - K^+)$ ATP-azę przed popromienną inaktywacją, zwiększały oporność osmotyczną komórek (tab. 3) i zmniejszały stopień peroksydacji lipidów błon erytrocytarnych (tab. 6). Optymalne efekty ochronne na wyizolowanych komórkach otrzymano dla cysteiny i glutationu dodanych w ilości powyżej 1 mM.

W procesie peroksydacji lipidów i zmianach oporności osmotycznej błon erytrocytów świni, wykazanych podczas eksponowania komórek na promieniowanie w obecności protektorów chemicznych, uczestniczą również rodniki hydroksylowe. Efekty ochronne związków tiolowych w tych przypadkach polegają na zmiataniu rodników organicznych i rodników hydroksylowych.

Połączeniom tiolowym przypisuje się ponadto funkcję zmiataczy rodników wytwarzanych w komórkach po podaniu leków heterocyklicznych. Nitroheterocykliczne połączenia, takie jak nitrofuran, nitrobenzen, nitroimidazol, stosowane są w terapii nowotworowej jako czynniki radiouczulające i cytotoksyczne [20]. W wyniku 1-elektronowej redukcji nitroaromatycznych leków przez komórki zwierzęce wytwarzane są reaktywne intermediaty typu rodników nitrowych. Zredukowane formy nitroaromatycznych leków wiążą się z

makrocząsteczkami i powodują w komórkach hamowanie syntezy kwasów nukleinowych [187], degradację DNA, redukację cytochromu c [20].

Niebiałkowe połączenia tiolowe zdolne są oddziaływać na metabolizm leków, reagując zarówno z rodnikami heterocyklicznych związków jak i H_2O_2 [238]. Skutkiem tej interakcji jest zmniejszenie toksyczności nitrocyklicznych połączeń wykazane po dodaniu do komórek cysteaminy, merkaptoetanolu, glutationu i penicyloaminy [90, 227, 238]. Związki tiolowe reagują z rodnikami nitroaromatycznych połączeń z szybkością 10^4 $M^{-1} \cdot s^{-1}$ [20]. Są za to bardziej skutecznymi zmiataczami rodników hydroksylowych. Ich stałe szybkości reakcji z rodnikami hydroksylowymi wynoszą 10^9 - 10^{10} $M^{-1} \cdot s^{-1}$ [169].

Przeważająca większość obserwowanych efektów ochronnych wywieranych przez związki tiolowe polega na usuwaniu rodników hydroksylowych, względnie jest wynikiem udziału tych połączeń w chemicznych procesach naprawczych komórek [8]. Zredukowany glutation przekazuje wodór rodnikom organicznym, wytwarzanych w reakcji połączeń organicznych z rodnikami hydroksylowymi. W ten sposób w miejsce pierwotnych rodników hydroksylowych i wtórnych rodników organicznych powstają rodniki glutationowe, które w dalszych reakcjach przekształcają się w formę jonu $GSSG^-$. Występowanie takiej reakcji zostało potwierdzone na alkoholach, cukrach, rybozo-5-fosforanie i AMP [8]. Sugeruje się, że na drodze zaproponowanego mechanizmu chemicznego procesu odnowy komórek przebiegają też procesy naprawcze niektórych uszkodzeń wywołanych w komórkach działaniem promieniowania.

Wnioskowanie o radiowrażliwości komórek oparte na zawartości GSH czy innych połączeń tiolowych nie może stanowić jednoznacznego kryterium w badaniach radiobiologicznych. Nie mniej związki tiolowe, endogenne oraz egzogenne stwarzają szerokie możliwości regulacji promienioczułości komórek, modyfikacji popromiennych uszkodzeń w obecności leków mających zastosowanie kliniczne. Większość znanych protektorów chemicznych należy do słabych elektrolitów. Dystrybucja tych elektrolitów pomiędzy komórką a środowiskiem zewnętrznym zależy od szeregu czynników, m. in. od gradientu pH i stałych dysocjacji reaktywnych grup tych połączeń [53]. Fakt ten pozwala na oznaczenie w komórce i medium stężenia stosowanego związku chemicznego i determinację jego skuteczności biologicznej.

W przypadku wielu leków wraz ze wzrostem ich stężenia wewnątrzkomórkowego występują zwiększone efekty ochronne [53]. Natomiast niewyjaśnione i mniej zrozumiałe są właściwości toksyczne stwierdzone w obecności niskich stężeń związków tiolowych.

Kontynuacja badań nad jednoczesnym podaniem związków charakteryzujących się właściwościami radioprotektorów obok związków o charakterze radiouczulaczy budzi nie mniejsze zainteresowanie [123]. Tutaj radiowrażliwość komórek określa wewnątrzkomórkowa równowaga efektów działania jednych i drugich czynników. Badania te mogą być szczególnie pomocne w określeniu mechanizmu wpływu tlenu na popromienne uszkodzenia komórek.

6.3. Rola rodników anionowych w popromiennym uszkodzeniu błon erytrocytarnych

Eksponowanie komórek na działanie wybranego rodnika, będącego produktem radiolizy wody lub wytwarzanego w wyniku rekombinacji tych produktów w określonym układzie, stwarza dogodne możliwości oceny ich efektywności biologicznej. Takich możliwości dostarczają wodne układy radiolityczne, stosowane do generowania rodników pierwotnych.

Produktami radiolizy wodnych roztworów w obecności tlenu są rodniki hydroksylowe (45%) i anionorodniki ponadtlenkowe (55%). W roztworach nasyconych N_2O wytwarzane są głównie rodniki hydroksylowe i 10% rodników wodorowych. Podobnie w atmosferze azotu, układy zawierające H_2O_2, w wyniku interakcji H_2O_2 z elektronem uwodnionym i rodnikiem wodorowym generują również rodniki hydroksylowe [29].

Podtlenek azotu stosowano w badaniach dotyczących oceny wrażliwości komórek bakteryjnych na promieniowanie jonizujące i ustalenia roli rodników hydroksylowych w popromiennym uszkodzeniu mikroorganizmów [60, 174, 219, 235]. Dodanie różnych soli do układów wysyconych N_2O stwarza ponadto sposobność badania skuteczności działania wtórnych rodników anionowych, które powstają w reakcji z rodnikami hydroksylowymi.

Podtlenek azotu okazał się niezwykle przydatny w badaniach toksyczności rodników hydroksylowych i selektywnych rodników anionowych dla błon erytrocytarnych. W niniejszej pracy sole dyso-

cjujące na różne aniony dodawano do preparatów erytrocytarnych napromieniowanych w atmosferze N_2O lub powietrza [110]. Rodnik hydroksylowy wytwarzany w obecności N_2O powoduje te same zmiany oporności osmotycznej erytrocytów świni napromieniowanych dawką 500 Gy co produkty radiolizy generowane w atmosferze powietrza. Oznacza to, że albo w obu układach obserwowane efekty spowodowane są głównie działaniem rodników hydroksylowych, albo sumaryczne skutki działania rodników tworzących się w atmosferze powietrza są takie same jak rodników odpowiedzialnych za zmiany obserwowane w atmosferze N_2O. Zastosowanie do badań mrówczanu skłania do przyjęcia drugiej ewentualności. Mrówczan, zmiatacz rodników hydroksylowych przekształcający je w rodniki ponadtlenkowe, nie powodował efektów ochronnych w badanych układach (tab. 4, 5).

W układach zawierających podtlenek azotu, we współzawodnictwie o rodniki hydroksylowe pomiędzy składnikami błon a anionami obecnymi w środowisku zwyciężają azydki, bromki i rodanki. Jest to całkowicie uzasadnione, bowiem produkcja rodników azydkowych przebiega z szybkością $1,2 \times 10^{10} M^{-1} \cdot s^{-1}$, z kolei mrówczan reaguje z rodnikiem hydroksylowym ze stałą szybkości reakcji $3,5 \times 10^{9} M^{-1} \cdot s^{-1}$, podobnie jak i pozostałe aniony [206]. Powstające wtórne wolne rodniki są bardziej skuteczne w uszkodzeniu błony erytrocytów świni aniżeli pierwotne rodniki hydroksylowe (rys. 13).

W przypadku doświadczeń przeprowadzonych w atmosferze powietrza stwierdzono większe zmiany oporności osmotycznej erytrocytów niż w atmosferze N_2O. Porównanie uzyskanych wyników wskazuje, że rola rodników anionowych w popromiennych uszkodzeniach błon erytrocytarnych jest większa, gdy napromieniowanie przeprowadza się w atmosferze powietrza niż N_2O.

Najbardziej skuteczne w uszkodzeniu erytrocytów świni okazały się rodniki azydkowe. Były one też bardziej efektywne od rodników hydroksylowych w uszkodzeniu erytrocytów człowieka i krowy [14, 206]. W atmosferze powietrza powodowały zwiększenie stopnia hemolizy i przyspieszenie wypływu K^+ z komórek. Inne rodniki: jodki, bromki i rodanki miały nieznaczny wpływ na stopień hemolizy, a tylko bromki i jodki zwiększały wypływ potasu z napromienionych komórek. W badaniach G o l d s t e i n a i wsp. [78] jony bromkowe i rodankowe wywoływały inaktywację hydrolazy acetylocholiny w atmosferze N_2O. Jodek zabezpieczał enzym przed po-

promienną inaktywacją, ale jednocześnie wywoływał największy wzrost wrażliwości osmotycznej erytrocytów człowieka.

Wyniki tej pracy oraz badań przeprowadzonych przez innych autorów [78, 174, 206, 243] wykazały, że udział selektywnych rodników anionowych w popromiennych zaburzeniach struktury i funkcji komórek zależy m. in. od rodzaju badanego parametru, od atmosfery, w której przeprowadza się napromienianie i od rodzaju komórek, zarówno w przypadku komórek zwierzęcych, jak i komórek bakteryjnych.

6.4. Zastosowanie metody EPR i promieniowania do rozróżniania układów transportujących związki przez błony erytrocytarne

Metoda elektronowego rezonansu paramagnetycznego w badaniach błon erytrocytarnych wykorzystana została w celach określenia ich funkcji i struktury [74, 75]. Metoda znaczników spinowych okazała się również wysoce przydatna w badaniach rodzaju uszkodzenia błon w stanach patologicznych [19]. Stosowano ją m. in. w badaniach przebiegu białaczki limfatycznej [150, 151] i dystrofii mięśniowej [139] oraz do oceny efektów terapii nowotworowej [151, 152]. Ponadto za pomocą znaczników spinowych przeprowadza się identyfikację wolnych rodników w układach biologicznych [65, 208] i uszkodzeń popromiennych nukleozydów i nukleotydów pirymidynowych w cząsteczce DNA [135].

Znakowane spinowo związki dostarczają również informacji w badaniach nad działaniem czynników chemicznych i fizycznych na strukturę błon.

W badaniach erytrocytów świni metoda EPR i promieniowanie zostały zastosowane dla rozróżnienia dróg transportu nieelektrolitu, kationu i anionu. Różnice w szybkości transportu znakowanych połączeń mogą wskazywać, że związki te przenoszone są poprzez błony erytrocytarne za pośrednictwem różnych kanałów transportu. Ponadto, te drogi transportu uszkadzane są w różnym stopniu przez promieniowanie jonizujące [111]. Najbardziej wrażliwe na działanie promieniowania są drogi transportu najwolniej przenoszonego kationu. Potem kolejno stwierdzono zaburzenia transportu cząste-

czek hydrofobowych, anionu i cząsteczek hydrofilowych (tab. 7-10, rys. 14-17). Uzyskane wyniki wskazują, że zastosowanie metody znaczników spinowych w obecnej pracy pozwoliło na stwierdzenie różnic w transporcie nawet tak podobnych strukturalnie połączeń, jak TEMPO i TEMPOL. Niskie wartości połówkowych czasów redukcji dla TEMPO sugerują, że cząsteczki hydrofobowych nieelektrolitów przenoszone są szybciej przez warstwę lipidową błony [87].

Kanały transportu nieelektrolitów, kationu i anionu w błonach erytrocytów świni okazały się podobnie mało wrażliwe na wpływ promieniowania jak enzymy metabolizmu nadtlenków [115], składniki lipidowe błon i połączenia nukleotydowe [99, 116, 146]. Ta wysoka oporność dróg przenoszenia badanych związków przez błony erytrocytów świni na promieniowanie różni je w istotny sposób od erytrocytów krowy i człowieka. Uszkodzenia transportu znakowanych spinowo związków dla erytrocytów krowy i człowieka występują przy znacznie niższych dawkach promieniowania (20-500 Gy) [87].

7. WNIOSKI

1. Popromienne zmiany właściwości błon erytrocytów wydają się zależeć w znacznej mierze od zmian aktywności enzymów metabolizujących nadtlenki w tych komórkach. Świadczy o tym duża zbieżność zakresu dawek, w którym występują zaburzenia badanych parametrów, a mianowicie:

- aktywność enzymów metabolizmu nadtlenków ulegała wyraźnym zmianom przy dawkach powyżej 5 kGy. Dysmutaza ponadtlenkowa i katalaza ulegały inaktywacji, przy czym przy dawce 30 kGy ich aktywność wynosiła około 60% wartości początkowej. Natomiast aktywność o charakterze peroksydazy wzrastała wraz z dawką, osiągając przy 30 kGy około 2-krotną wartość kontroli;
- hydrolaza acetylocholiny, wrażliwy wskaźnik uszkodzeń strukturalnych błony erytrocytarnej wykazywała spadek aktywności dla dawek powyżej 5 kGy, zaś przy 30 kGy zachowywała około 50% aktywności kontrolnej.

2. Drogi transportu poprzez błony erytrocytarne uszkadzane są w różnym stopniu przez promieniowanie jonizujące. Najbardziej wrażliwe są drogi transportu kationu (TEMPO-cholina), zaś naj-

mniej cząsteczki hydrofilowej (TEMPOL). Kanały transportu w erytrocytach świni w przypadku nieelektrolitów (TEMPO - przyspieszenie transportu obserwuje się poczynając od dawki około 1 kGy, TEMPOL - od około 2 kGy), kationu (TEMPO-cholina od około 0,5 kGy) i anionu (3-karboksy-2,2,5,5-tetrametylopirolidyno-1-oksyl - od około 1 kGy) są mniej wrażliwe na działanie promieniowania niż ma to miejsce w przypadku erytrocytów krowy i człowieka (przyspieszenie transportu dla tych samych znaczników obserwowano przy dawkach 0,02-0,5 kGy.

3. Napromienienie erytrocytów świni prowadzi do zwiększenia wrażliwości osmotycznej komórek w mniejszym stopniu niż w przypadku erytrocytów człowieka i krowy.

4. Na podstawie doświadczeń przeprowadzonych w obecności radioprotektorów i różnych soli można twierdzić, że:

- anionorodniki ponadtlenkowe przyczyniają się do zmniejszenia oporności osmotycznej komórek;
- rodniki hydroksylowe uczestniczą podobnie jak H_2O_2 w procesie peroksydacji lipidów błonowych i zmianach właściwości osmotycznych;
- selektywne rodniki anionowe są bardziej efektywne w uszkodzeniu erytrocytów od rodników hydroksylowych. Są one bardziej skuteczne w destrukcji komórek w atmosferze powietrza niż w obecności N_2O. Najbardziej skuteczne w uszkodzeniu erytrocytów świni są rodniki azydkowe.

5. Wydaje się, że większa oporność erytrocytów świni na działanie promieniowania niż erytrocytów człowieka i krowy związana jest z różnicami we właściwościach ich błon. Można sugerować, że enzymy metabolizmu nadtlenków przeciwdziałając peroksydacji lipidów, a tym samym zmianom interakcji lipid-białko, stanowią szczególnie ważny element ochrony błon komórkowych przed wolnymi rodnikami.

OBJAŚNIENIE STOSOWANYCH SKRÓTÓW I SYMBOLI

ACD	- roztwór: kwas cytrynowy, cytrynian, glukoza
ADP	- adenozynodifosforan
AMP	- adenozynomonofosforan
cAMP	- cykliczny adenozynomonofosforan
ATP	- adenozynotrifosforan
ATP-aza	- adenozynotrifosfataza
BHT	- 2,6 -di-t-butylo-4-metylofenol
Cys	- cysteina
DMPO	- 5,5-dimetylopirolino-N-tlenek
DMSO	- dimetylosulfotlenek
DPF	- 2,5-difenylofuran
DTPA	- kwas dietylenotriaminopentaoctowy
EDTA	- etylenodiaminotetraoctan
EPR	- elektronowy rezonans paramagnetyczny
Gly	- glicyna
GMP	- guanozynomonofosforan
GSH	- glutation
Hb	- hemoglobina
His	- histydyna
IMP	- inozynomonofosforan
NAD	- dinukleotyd nikotynamidoadeninowy
NADP	- fosforan dinukleotydu nikotyanamidoadeninowego
OXANO	- 2-etylo-2,5,5-trimetylo-3-oksazolidyno-1-oksyl
OXANOH	- 2-etylo-1-hydroksy-2,5,5-trimetylo-3-oksazolidyna
parakwat	- dichlorek 1,1'-dimetylo-4,4'-bipirydyny
PBN	- nitron N-fenylo-N-t-butylowy
4 POBN	- nitron N-(4-pirydyno-N-tlenek)-N-t-butylowy
SDS	- siarczan dodecylo-sodowy
SOD	- dysmutaza ponadtlenkowa

TCA	- kwas trichlorooctowy
TEMPO	- 2,2,6,6-tetrametylopiperydyno-1-oksyl
TEMPOL	- 4-hydroksy-2,2,6,6-tetrametylopiperydyno-1-oksyl
TMPO	- 2,5,5-trimetylopirolino-N-tlenek
UDPG	- urydynodifosfoglukoza
UMP	- urydynomonosfosforan

LITERATURA

[1] Ames B. N., Assay of inorganic phosphate, total phosphate and phosphates, [w:] Methods in Enzymology, S. P. Colowick, N. O. Kaplan, Vol. 8, New York-London, 115-118 (1966).

[2] Antholine W. E., Petering D. H., On the reaction of iron bleomycin with thiols and oxygen, Biochem. Biophys. Res. Commun. 90, 384-389 (1979).

[3] Armstrong D. A., Buchanan J. D., Reactions of O_2^-, H_2O_2 and other oxidants with sulfhydryl enzymes, Photochem. Photobiol. 28, 743-755 (1978).

[4] Asada K., Kanamatsu S., Reactivity of thiols with superoxide radicals, Agric. Biol Chem. 40, 1891-1897 (1976).

[5] Atkinson D. E., Walton G. M., Adenosine triphosphate conservation in metabolic regulation, J. Biol. Chem. 242, 3239-3241 (1967).

[6] Aubry J. M., Rigaudy J., Ferradini C., Pucheault J., A search for singlet oxygen in the disproportionation of superoxide anion, J. Am. Chem. Soc. 103, 4965-4966 (1981).

[7] Auclair C., Lecomte M., Singlet oxygen production associated with hydroperoxide induced lipid peroxidation in liver microsomes, Biochem. Biophys. Res. Commun. 85, 946-951 (1978).

[8] Baker M. Z., Badiello R., Tamba M., Quintilian M., Gorin G., Pulse radiolytic study of hydrogen transfer from glutathione to organic radicals, Int. J. Radiat. Biol. 6, 595-602 (1982).

[9] Bannister J. V., Bannister W. H., Hill H. A., Mahood J., Willson R.,

W o l f e n d e n B., Does ceruloplasmin dismute superoxide, No., FEBS Lett. 118, 127-129 (1980).

[10] B a n n i s t e r J. V., H i l l H.A., Chemical reactivity of oxygen-derived radicals with reference to biological systems, 59th Meeting, Biochemical Society Transactions, London, 68-69 (1982).

[11] B a r t k o w i a k A., S z a b o L., M a t k o v i c s B., L e y k o W., Effect of gamma-irradiation on the peroxide metabolism enzymes of bovine erythrocytes, Studia biophys. 73, 193-198 (1979).

[12] B a r t l e t t G. R., Methods for the isolation of glycolytic intermediates by column chromatography with ion exchange resins, J. Biol. Chem. 234, 459-465 (1959).

[13] B a r t o l i G. M., G a l e o t t i T., Growth-related lipid peroxidation in tumor microsomal membranes and mitochondria, Biochim. Biophys. Acta 574, 537-541 (1979).

[14] B a r t o s z G., L e y k o W., Radioprotection of bovine erythrocytes to hemolysis, Int. J. Radiat. Biol. 39,39--46 (1981).

[15] B a t e s D. A., W i n t e r b o u r n Ch., Reactions of adriamycin with hemoglobin, Biochem. J. 203, 155-160 (1982).

[16] B e e r s R. F., S i z e r L. W., Spectrophotometric for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase, J. Biol. Chem. 195, 133-140 (1952).

[17] B e n o v a D., B a e v I., Protection of the mouse from genetic radiation damage by an optimal-dose-ratio combination of ATP, AET, and serotonin, "Experientia" 34, 876--877 (1978).

[18] B e r l i n V., H a s e l t i n e W., Reduction of adriamycin to a semiquinone-free radical by NADPH cytochrome P--450 reductase produces DNA cleavage in a reaction mediated by molecular oxygen, J. Biol. Chem. 256, 4747-4756 (1981).

[19] B e r n e r B., B l a n ç o C. E., E l l i s o n G., M y e r s L. W., H i r s c h H. E., Partition coefficients of 2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oksyl (TEMPO) in erythrocyte lipids in multiple sclerosis, J. Neurosci. Res. 5, 225-231 (1980).

[20] B i a g l o w J. E., Cellular electron transfer and radi-

cal mechanisms for drug metabolism, Radiat. Res. 86, 212-242 (1981).

[21] Bielski B. H. J., Revaluation of the spectral and kinetic properties of HO_2 and O_2^- free radicals, Photochem. Photobiol. 28, 645-649 (1978).

[22] Bielski B. H. J., Allen A., Mechanism of the disproportionation of superoxide radicals, J. Phys. Chem. 81, 1048-1050 (1977).

[23] Bielski B. H. J., Allen A. O., Schwarz H. A., Mechanism of disproportionation of ascorbate radicals, J. Am. Chem. Soc. 103, 3516-3518 (1981).

[24] Bielski B. H. J., Chan P. C., Superoxide and superoxide dismutases, London-New York-San Francisco, 409--412 (1977).

[25] Bielski B. H. J., Chan P. C., Studies on free and enzyme-bound nicotinamide adenine dinucleotide free radicals, J. Am. Chem. Soc. 102, 1713-1716 (1980).

[26] Bird R. P., Cysteamine as a protective agent with high -LET radiations, Radiat. Res. 82, 290-296 (1980).

[27] Bisby R. H., Cundall R. B., Movassaghi S., Adams G. E., Posener M. L., Wardman P., Selective free radical reactions with proteins and enzymes: a reversible equilibrium in the reaction of $(SCN)_2^-$ with lysozyme, Int. J. Radiat. Biol. 42, 163-171 (1982).

[28] Bize I. B., Oberley L. W., Morris H. P., Superoxide dismutase and superoxide radical in Morris Hepatomas, Cancer Res. 40, 3686-3693 (1980).

[29] Bors W., Saran M., Michel C., Radical intermediates involved in the bleaching of the carotenoid crocin. Hydroxyl radicals, superoxide anions and hydrated electrons, Int. J. Radiat. Biol. 41, 493-501 (1982).

[30] Bors W., Saran M., Lengfelder E., Michel Ch., Fuchs Ch., Frenzel Ch., Detection of oxygen radicals in biological reactions, Photochem. Photobiol. 28, 629-638 (1978).

[31] Brawn K., Fridovich I., DNA strand scission by enzymically generated oxygen radicals, Arch. Biochem. Biophys. 206, 414-419 (1981).

[32] Brigelius R., Hashem A., Lengfelder E., Paraquat-induced alterations of phospholipids and GSSG-release in the isolated perfused rat liver, and the effect of SOD-active copper complexes, Biochem. Pharmacol. 30, 349-354 (1981).

[33] Buettner G. R., Oberley L. W., Superoxide formation by protoporphyrin as seen by spin trapping, FEBS Lett. 98, 18-20 (1979).

[34] Buettner G. R., Oberley L. W., The apparent production of superoxide and hydroxyl radicals by hematoporphyrin and light as seen by spin-trapping, FEBS Lett. 161-164 (1980).

[35] Buettner G. R., Oberley L. W., Leuthauser S., The effect of iron on the distribution of superoxide and hydroxyl radicals as seen by spin trapping and on the superoxide dismutase assay, Photochem. Photobiol. 28, 693-695 (1978).

[36] Chan P. H., Fishman R. A., Transient formation of superoxide radicals in polyunsaturated fatty acid-induced brain swelling, J. Neurochem. 35, 1004-1007 (1980).

[37] Chan P. C., Peller O. G., Kesner L., Copper (II)-catalyzed lipid peroxidation in liposomes and erythrocyte membranes, "Lipids" 17, 331-337 (1982).

[38] Chelack W. S., Petkau A., Concentration-dependent inactivation of superoxide dismutase, Biochim. Biophys. Acta 660, 83-90 (1981).

[39] Chmiel J., Kopczyński Z., Rybczyńska M., The influence of the know radioprotective compounds on the metabolism of red blood cells. I, Pol. J. Pharmacol. Pharm. 28, 113-121 (1976).

[40] Chmiel J., Rybczyńska M., Kopczyński Z., The influence of the known radioprotective compounds on the metabolism of human red blood cell, part II, Pol. J. Pharmacol. Pharm. 28, 123-128 (1976).

[41] Chuaqui C. A., Petkau A., Radiation-induced inactivation of superoxide dismutase in nitrous oxide-saturated solutions, Biochim. Biophys. Acta 702, 112-116 (1982).

[42] Cohen G., The generation of hydroxyl radicals in bio-

logical systems. Toxicological aspects, Photochem. Photobiol. 28, 669-675 (1978).

[43] Colowick S. P., Kaplan N. O., Methods in Enzymology, Vol. 2, New York, 764-775 (1955).

[44] Czapski G., Ilan Y. A., On the generation of the hydroxylation agent from superoxide radical. Can the Haber-Weiss reaction be the source of OH radicals, Photochem. Photobiol. 28, 651-653 (1978).

[45] Dewey D. L., Gaugas J. M., Inhibition of proliferation of cultured cells by polyamine and cysteine interactions, "Cancer Letters" 10, 229-234 (1980).

[46] Diguiseppi J., Fridovich I., Ethylene from 2-keto-4-thiomethyl butyric acid: The Haber-Weiss reaction, Arch. Biochem. Biophys. 205, 323-329 (1980).

[47] Dinescu-Romalo G., Mihai C., Superoxide anion production and superoxide dismutase activity in several tissues from normal and Guerin T_8 ascites tumor-bearing rats, Cell. Mol. Biol. 25, 101-106 (1979).

[48] Docampo R., Moreno S., Stoppani A., Nitrofuran enhancement of microsomal electron transport, superoxide and anion production and lipid peroxidation, Arch. Biochem. Biophys. 207, 316-324 (1981).

[49] Dodge J. T., Mitchell C., Hanahan D. J., The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes, Arch. Biochem. Biophys. 100, 119-130 (1963).

[50] Dooley D., Coolbaugh T., Inhibition of bovine plasma amine oxidase by superoxide dismutase active Cu (II) complexes, Biochem. Biophys. Res. Comm. 96, 823-830 (1980).

[51] Doroshow J. H., Mitomycin C-enhanced superoxide and hydrogen peroxide formation in rat heart, J. Pharmacol. Exp. Therap. 218, 206-211 (1981).

[52] Doyle M. P., Pickering R., Dykstra R., Nelson C., Boyer R., Involvement of peroxide and superoxide in the oxidation of hemoglobin by nitrite, Biochem. Biophys. Res. Comm. 105, 127-132 (1982).

[53] Eidus L., Korystov Y. U., Kublik L., Vexler A., Dependence of radioprotective effect of chemical modifying agents on their intracellular concen-

trations, Int. J. Radiat. Biol. 41, 625-632 (1982).

[54] Ellman G. L., Courtney K. D., Andres V., Featherstone R. M., A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, Biochem. Pharmacol. 7, 88-95 (1961).

[55] Ellory J. C., Carleton S., $Na^+ - K^+$ -activated ATPase in cattle erythrocyte, Biochim. Biophys. Acta 363, 397-403 (1974).

[56] Ewing D., Hydroxyl radical damage in low oxygen concentrations in irradiated bacteria, Int. J. Radiat. Biol. 41, 203-208 (1982).

[57] Ewing D., DMSO-induced changes in radical lifetimes in irradiated bacterial spores, Int. J. Radiat. Biol. 41, 563-567 (1982).

[58] Ewing D., Oxygen-dependent damage involving OH radicals in irradiated bacteria, Int. J. Radiat. Biol. 42, 191--194 (1982).

[59] Ewing D., Powers E. L., Oxygen-dependent sensitization of irradiated cells, Radiation Biology in Cancer Research, New York, 143-168 (1980).

[60] Feldberg R. S., Carew J. A., Water radiolysis products and nucleotide damage in gamma-irradiated DNA, Int. J. Radiat. Biol. 40, 11-17 (1981).

[61] Ferradini C., Foos J., Gilles L., Haristoy D., Pucheault J., Gamma and pulse radiolysis studies of the reaction between superoxide ions and oxyhemoglobin-methemoglobin system, Photochem. Photobiol. 28, 851-855 (1978).

[62] Ferradini C., Foos J., Houee C., Pucheault J., The reaction between superoxide anion and hydrogen peroxide, Photochem. Photobiol. 28, 697-700 (1978).

[63] Fielden E. M., Roberts P. R., Bray R. C., Lowe D. J., Mautner G. N., Rotilio G., Calabrese L., The mechanism of action of superoxide dismutase from pulse radiolysis and electron paramagnetic resonance, Biochem. J. 139, 49-60 (1974).

[64] Finkelstein E., Rosen G. M., Rauckman E. J., Invited paper. Spin trapping of superoxide

and hydroxyl radical: practical aspects, Arch. Biochem. Biophys. 200, 1-16 (1980).

[65] Finkelstein E., Rosen G. M., Rauckman E. J., Paxton J., Spin trapping of superoxide, Mol. Pharmacol. 16, 676-685 (1979).

[66] Fischer L. J., Hamburger S. A., Inhibition of alloxan action in isolated pancreatic islets by superoxide dismutase, catalase, and a metal chelator, "Diabetes" 29, 213-216 (1980).

[67] Floyd R. A., DNA-ferrous iron catalysed hydroxyl free radical formation from hydrogen peroxide, Biochem. Biophys. Res. Commun. 99, 1209-1215 (1981).

[68] Fong K., McCay P. B., Poyer J. L., Keele B. B., Misra H., Evidence that peroxidation of lysosomal membranes is initiated by hydroxyl free radicals produced during flavin enzyme activity, J. Biol. Chem. 248, 7792-7797 (1973).

[69] Foote C. S., Photosensitized oxidation and singlet oxygen: consequences in biological systems, [w:] Free radicals in biology, Vol. 2, New York, 85-133 (1976).

[70] Foote C. S., Shook F. C., Abakerli R.A. Chemistry of superoxide ion. 4. Singlet oxygen is not a major product of dismutation, J. Am. Chem. Soc. 102, 2503-2504 (1980).

[71] Fridovich I., Superoxide dismutases, Adv. Enzymol. 41, 35-97 (1974).

[72] Fried R., Fried L. W., Babin D., The inhibition of reduction of tetrazolium by a protein liver, Eur. J. Biochem. 16, 399-406 (1970).

[73] Fried R., Fried L. W., Babin D., Biological role of xanthine oxidase and tetrazolium-reductase inhibition, Eur. J. Biochem. 33, 439-445 (1973).

[74] Fung L. W., Spin-label studies of the lipid and protein components of erythrocyte membranes, Biophys. J. 33, 253-262 (1981).

[75] Fung L. W., Simpson M. J., Topology of a protein spin label in erythrocyte membranes, FEBS Lett. 108, 269-273 (1979).

[76] Goldberg B., Stern A., The role of the su-

peroxide anion as a toxic species in the erythrocyte, Arch. Biochem. Biophys. 178, 218-225 (1977).

[77] Goldstein I. A., Kaplan H. B., Edelson H. S., Weissmann G., Ceruloplasmin, A scavenger of superoxide anion radicals, J. Biol. Chem. 254, 4040-4045 (1979).

[78] Goldstein B. D., Searle A. J., Willson R. L., The susceptibility of red cell acetylcholinesterase to radiation-induced free radicals, Arch. Biochem. Biophys. 201, 235-240 (1980).

[79] Goodman J., Hochstein P., Generation of free radicals on lipid peroxidation by redox cycling of adriamycin and daunomycin, Biochem. Biophys. Res. Commun. 77, 797-803 (1977).

[80] Grankvist K., Marklund S., Sehlin J., Täljedal I., Superoxide dismutase, catalase and scavengers of hydroxyl radical protect against the toxic action of alloxan on pancreatic islet cells in vitro, Biochem. J. 182, 17-25 (1979).

[81] Greenwald R., Effects of oxygen-derived free radicals on connective tissue macromolecules: inhibition by copper-penicillamine complex, J. Rheumat. 8, 9-13 (1981).

[82] Grzelińska E., Bartkowiak A., Bartosz G., Leyko W., Effect of OH scavengers on radiation damage to the erythrocyte membrane, Int. J. Radiat. Biol. 41, 473-481 (1982).

[83] Gutteridge J. M., The protective action of superoxide dismutase on metal-ion-catalysed peroxidation of phospholipids, Biochem. Biophys. Res. Commun. 77, 379-386 (1977).

[84] Gutteridge J. M., Richmond R., Halliwell B., Inhibition of the iron-catalysed formation of hydroxyl radicals from superoxide and of lipid peroxidation by desferrioxamine, Biochem. J. 184, 469-472 (1979).

[85] Gutteridge J. M., Richmond R., Halliwell B., Oxygen free-radicals and lipid peroxidation: inhibition by the protein caeruloplasmin, FEBS Lett. 112, 269-272 (1980).

[86] Gutteridge J. M., Xiao-Chang F., Protection of iron catalyzed free radical damage to DNA and

lipids by copper(II)-bleomycin, Biochem. Biophys. Res. Commun. 99, 1354-1360 (1981).

[87] Gwoździński K., Bartosz G., Leyko W., Effect of gamma-radiation on the transport of spin-labeled compounds across erythrocyte membrane, Radiat. Environ. Biophys. 19, 275-285 (1981).

[88] Haber F., Weiss J., The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts, Proc. R. Soc. 147, 332-351 (1934).

[89] Habour J. R., Bolton J. R., Superoxide formation in spinach chloroplasts: electron spin resonance detection by sping trapping, Biochem. Biophys. Res. Commun. 64, 803-807 (1975).

[90] Hall E. J., Astor M., Geard C., Biaglow J. E., Cytotoxicity of Ro-07-0582; Enhancement by hyperthermia and protection by cysteamine, Br. J. Cancer 35, 809-815 (1977).

[91] Halliwell B., Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of iron chelates, FEBS Lett. 92, 321-326 (1978).

[92] Halliwell B., Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of iron salts, FEBS. Lett. 96, 238-242 (1978).

[93] Halliwell B., The biological effects of the superoxide radical and its products, Bull. europ. Physiopath. resp. 17, 21-28 (1981).

[94] Halliwell B., Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of iron salts is a feasible source of hydroxyl radicals in vivo, Biochem. J. 205, 461-462 (1982).

[95] Halliwell B., Gutteridge J. M., Formation of a thiobarbituric-acid-reactive substance from deoxyribose in the presence of iron salts, FEBS Lett. 128, 347-352 (1981).

[96] Hashimoto S., Kira A., Imamura M., Masuda D., Lysozyme dimer formation on lysozyme oxidation with Br_2^- as studied by fluorescence evolution, Int. J. Radiat. Biol. 41, 303-314 (1982).

[97] Hassan H., Fridovich I., Intracellular production of superoxide radical and of hydrogen peroxide

by redox active compounds, Arch. Biochem. Biophys. 196, 385--395 (1979).

[98] Heikkila R., Cohen G., 6-hydroxydopamine: evidence for superoxide radical as an oxidative intermediate, "Science" 181, 456-457 (1973).

[99] Helszer Z., Jóźwiak Z., Leyko W., Osmotic fragility and lipid peroxidation of irradiated erythrocytes in the presence of radioprotectors, "Experientia" 36, 521-522 (1980).

[100] Hoe S. T., Bisby R. H., Cundall R. B., Anderson R. F., Free radical reactions with proteins and enzymes. The inactivation of bovine carbonic anhydrase B, Biochim. Biophys. Acta 662, 65-71 (1981).

[101] Hoffman M., Autor A. P., Production of superoxide anion by an NADPH-oxidase from rat pulmonary macrophages, FEBS Lett. 121, 352-354 (1980).

[102] Hunt W. A., Dalton T. K., Reduction in cyclic nucleotide levels in the brain after a high dose of ionizing radiation, Radiat. Res. 83, 210-215 (1980).

[103] Ilan Y. A., Czapski G., The reaction of superoxide radical with iron complexes of EDTA studied by pulse radiolysis, Biochim. Biophys. Acta 498, 386-394 (1977).

[104] Inouye B., Aono K., Iida S., Utsumi K., Influence of superoxide generating system, Vit E, and superoxide dismutase on radiation consequences, Physiol. Chem. Phys. 11, 151-160 (1979).

[105] Ishibashi F., Howard B., Alloxan and H_2O_2 action on glucose metabolism in cultured fibroblasts, J. Biol. Chem. 256, 12 134-12 139 (1981).

[106] Jain S. K., Hochstein P., Generation of superoxide radicals by hydrazine, Biochim. Biophys. Acta 586, 128-136 (1979).

[107] Jarvis S. M., Young J. D., Ansay M., Archibald A. L., Harkness R A., Simmonds R. J., Is inosine the physiological energy source of pig erythrocytes, Biochim. Biophys. Acta 597, 183--188 (1980).

[108] Jóźwiak Z., Popromienne zmiany zawartości nukleotydów w elementach morfotycznych krwi. Wpływ radioprotektorów

enzymatycznych na zaburzenia metabolizmu energetycznego erytrocytów, Acta Univ. Lodz. 1-100 (1978).

[109] J ó ź w i a k Z., Właściwości anionorodników ponadtlenkowych i funkcje biologiczne dysmutazy ponadtlenkowej, Zag. Biof. Współ. 6, 249-269 (1981).

[110] J ó ź w i a k Z., Radiation damage to the erythrocyte membrane in the presence of radical anions; I, Int. J. Radiat. Biol. 43, 195-200 (1983).

[111] J ó ź w i a k Z., 1983, Effect of ionizing radiation on the transport of spin labelled compounds across the porcine erythrocyte membrane. II, Int. J. Radiat. Biol. 43, 201-205 (1983).

[112] J ó ź w i a k Z., B a r t o s z G., Dysmutaza ponadtlenkowa, Zag. Biof. Współ. 2, 71-98 (1977).

[113] J ó ź w i a k Z., B a r t o s z G., Free radicals in biology, Zag. Biof. Współ. (w druku, (1985).

[114] J ó ź w i a k Z., H e l s z e r Z., Participation of free oxygen radicals in damage of porcine erythrocytes, Radiat. Res. 88, 11-19 (1981).

[115] J ó ź w i a k Z., H e l s z e r Z., Changes in enzyme activities of porcine erythrocytes exposed to radiation, Studia biophys. 95, 19-23 (1983).

[116] J ó ź w i a k Z., L e y k o W., Changes of adenylate energy charge of hog blood lymphocytes, platelets and erythrocytes following gamma-irradiation, J. Radiat. Res. 19, 189-196 (1978).

[117] J ó ź w i a k Z., L e y k o W., Effect of gamma-irradiation on energetic metabolism of porcine blood lymphocytes, platelets and erythrocytes, Acta Univ. Lodz. 1, 149--160 (1981).

[118] K a c h e r M. L., F o o t e C. S., Chemistry of singlet oxygen. XXVIII. Steric and electronic effects on the reactivity of sulfides with singlet oxygen, Photochem. Photobiol. 29, 765 (1979).

[119] K e l l o g g E. W., F r i d o v i c h I., Liposome oxidation and erythrocyte lysis by enzymically generated superoxide and hydrogen peroxide, J. Biol. Chem. 252, 6721--6728 (1977).

[120] K i e f e r J., Does singlet oxygen contribute to the oxygen effect, Int. J. Radiat. Biol. 34, 587-588 (1978).

[121] Kim H. D., Watts R. P., Luthra M. G., Schwalbe C. R., Conner R. T., Brendel K., A symbiotic relationship of energy metabolism between a non-glycolitic mammalian red cell and the liver, Biochim. Biophys. Acta 589, 256-263 (1980).

[122] Kobayashi Y., Okahata S., Usui T., Hemolysis of human erythrocytes by paraquat in relation to superoxide dismutase activity, Biochem. Biophys. Res. Commun. 91, 1288-1294 (1979).

[123] Koch J. C., Howell R. L., Combined radiation-protective and radiation-sensitizing agents, Radiat. Res. 87, 265-289 (1981).

[124] Kong S., Davison A. J., The role of interactions between O_2, H_2O_2, $^{\bullet}OH$, e^- and O_2^- in free radical damage to biological systems, Arch. Biochem. Biophys. 204, 18-29 (1980).

[125] Kong S., Davison A. J., Actions of gamma-radiation on resealed erythrocyte ghosts. A comparison with intact erythrocytes and a study of the effects of oxygen, Int. J. Radiat. Biol. 40, 19-29 (1981).

[126] Kong S., Davison A. J., The relative effectiveness of $^{\bullet}OH$, H_2O_2, O_2^-, and reducing free radicals in causing damage to biomembranes, Biochim. Biophys. Acta 640, 313-325 (1981).

[127] Koningsa A., Drijver E., Radiation effects on membranes, I. Vitamin E deficiency and lipid peroxidation, Radiat. Res. 80, 494-501 (1979).

[128] Koningsa A., Oosterloo S., Radiation effects on membranes. II. A comparison of the effects of X irradiation and ozone exposure with respect to the relation of antioxidant concentration and the capacity for lipid peroxidation, Radiat. Res. 81, 200-207 (1980).

[129] Koppenol W. H., Superoxide dismutase and oxygen toxicity, Bull. europ. Physiopath. resp. 17, 85-89 (1981).

[130] Koppenol W. H., Butler J., Leeuwen J. W., The Haber-Weiss cycle, Photochem. Photobiol. 28, 655-660 (1978).

[131] Kovarova H., Krizala J., Dostal M., Activity of superoxide dismutase in erythrocytes of irradiated dogs, Studia biophys. 87, 41-45 (1982).

[132] Krinsky N. I., Biological role of singlet oxygen, [w:] Singlet oxygen, New York, 597-641 (1979).

[133] Krizala J., Kovarova H., Stoklasova A., Ledvina M., Superoxide dismutase levels in various radioresistant and radiosensitive tissues of irradiated rats, Physiol. bohemoslov 31, 151-157 (1982).

[134] Kunimoto M., Inoue K., Nojima S., Effect of ferrous ion and ascorbate-induced lipid peroxidation on liposomal membranes, Biochim. Biophys. Acta 646, 169-178 (1981).

[135] Kuwabara M., Zhi-Yi Z., Yoshii G., E.S.R of spin-trapped radicals in aqueous solutions of pyrimidine nucleosides and nucleotides. Reactions of the hydroxyl radical, Int. J. Radiat. Biol. 41, 241-259 (1982).

[136] Lai C. S., Piette L. H., Spin-trapping studies of hydroxyl radical production involved in lipid peroxidation, Arch. Biochem. Biophys. 190, 27-38 (1978).

[137] Land E. J., Swallow A. J., One-electron reactions in biochemical systems as studied by pulse radiolysis, I. Biochim. Biophys. Acta 162, 327-337 (1968).

[138] Land E. J., Swallow A. J., One-electron reactions in biochemical systems as studied by pulse radiolysis. IV. Oxidation of dihydronicotinamide-adenine dinucleotide. Biochim. Biophys. Acta 234, 34-42 (1971).

[139] Laurent M., Daveloose D., Leterrier F., Fischer S., Schapira G., A spin label study of the erythrocyte membranes in Duchenne muscular dystrophy, Clin. Chim. Acta. 105, 183-194 (1980).

[140] Lees M. B., Paxman S., Modification of the Lowry procedure for the analysis of proteolipid protein, Anal. Biochem. 47, 184-192 (1972).

[141] Leeuwen F. X. van, Gelder B. F. van, A spectroscopic study of nitric-oxide-treated ceruloplasmin, Eur. J. Biochem. 87, 305-312 (1978).

[142] Lehnert S., Fischer G., Methot G., Radioprotection by normal and malignant tissue in the mouse by diethylaminoreserpine, Int. J. Radiat. Biol. 40, 63-73 (1981).

[143] Lengfelder E., Fuchs Ch., Younes M.,

W e s e r V., Functional aspects of the superoxide dismutative action of Cu-penicillamine, Biochim. Biophys. Acta 567, 492-502 (1979).

[144] L e n g f e l d e r E., W e s e r V., Superoxide dismutation by low molecular weight Cu-complexes, Bull. europ. Physiopath. resp. 17, 73-80 (1981).

[145] L e u t h a u s e r S., O b e r l e y L., O b e r l e y T., S o r e n s o n J., R a m a k r i s h n a K., Antitumor effect of a copper coordination compound with superoxide dismutase-like activity, JNCL 66, 1077-1081 (1981).

[146] L e y k o W., J ó ź w i a k Z., H e l s z e r Z., B a r t o s z G., In vitro radioprotection of erythrocytes by superoxide dismutase, [w:] Biological and clinical aspects of superoxide and superoxide dismutase, Vol. 11B, New York, 311-317 (1980).

[147] L i J. R., K i m D., Effects of superoxide dismutase on cholesterol 7α-hydroxylation in swine, "Steroids" 35, 459--469 (1980).

[148] L i n W., A r m s t r o n g D. A., L a l M., Effects of superoxide dismutase, dithiothreitol and formate ion on the inactivation of papain by hydroxyl and superoxide radicals in aerated solutions, Int. J. Radiat. Biol. 33, 231--243 (1978).

[149] L i n g C. C., M i c h a e l s H. B., G e r w e c k L., E p p E. R., P e t e r s o n E. C., Oxygen sensitization of mammalian cells under different irradiation conditions, Radiat. Res. 86, 325-340 (1981).

[150] L o h m a n n W., G r e u l i c h W., D ö l l G., II. Electron spin resonance (ESR) and absorption investigations on erythrocyte ghosts and plasma, "Blut" 39, 327-332 (1979).

[151] L o h m a n n W., S c h r e i b e r J., G r e u l i c h W., IV. ESR investigations on the interaction between ascorbic acid and some copper proteins, Z. Naturforsch. 34c, 550--554 (1979).

[152] L o h m a n n W., S c h r e i b e r J., S t r o b e t t W., M ü l l e r-E c k h a r d t Ch., On the possible involvement of ascorbic acid and copper proteins in Leukemia: I. Electron spin resonance (ESR) investigations on native

blood, erythrocytes, and leukocytes, Blut" 39, 317-326 (1979).

[153] Lowen D.P., Oberley L. W., Rousseau F.M., Stevens R. H., Superoxide dismutase activity in 1,2--dimethylhydrazine-induced rat colon adenocarcinoma, JNCI 65, 377-381 (1980).

[154] Lown J.W., Chen H., Plambeck J. A., Diminished superoxide anion generation by reduced 5-iminodaunorubicin relative to daunorubicin and the relationship to cardiotoxicity of the anthracycline antitumor agents, Biochem. Pharmacol. 28, 2563-2568 (1979).

[155] Lown J. W., Joshua A. V., Interactions of the glycopeptide antitumor antibiotics bleomycin and tallysomycin with deoxyribonucleic acid in vitro, Biochem. Pharmacol. 29, 521-532 (1980).

[156] Lown J. W., Sim S., Majumolar K. C., Chang R., Strand scission of DNA by bound adriamycin and daunorubicin in the presence of reducing agents, Biochim. Biophys. Res. Commun. 76, 705-710 (1977).

[157] Lovstad R. A., The protective action of ceruloplasmin on Fe^{2+}-stimulated lysis of rat erythrocytes, Int. J. Biochem. 13, 221-224 (1981).

[158] Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A.L., Randall R. J., Protein measurement with the Folin phenol reagent, J. Biol. Chem. 193, 265-275 (1951).

[159] Lynch R. E., Fridovich I., Effects of superoxide on the erythrocyte membrane, J. Biol. Chem. 253, 1838--1845 (1978).

[160] Lynch R. E., Fridovich I., Permeation of the erythrocyte stroma by superoxide radical, J. Biol. Chem. 253, 4697-4699(1978).

[161] Lynch R. E., Thomas J. E., Lee G. R., Inhibition of methemoglobin formation from purified oxyhemoglobin by superoxide dismutase,"Biochemistry" 16, 4563--4567 (1977).

[162] Maral J., Puget K., Michelson A. M.,Comparative study of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase levels in erythrocytes of different animals, Biochem. Biophys. Res. Commun. 77, 1525-1535 (1977).

[163] Marklund S., Spectrophotometric study of spontaneous disproportionation of superoxide anion radical and sensitive direct assay for superoxide dismutase, J. Biol. Chem. 251, 7504-7507 (1976).

[164] Markossian K., Poghossian A., Paitian N., Nalbandyan R., Superoxide dismutase activity of cytochrome oxidase, Biochem. Biophys. Res. Commun. 81, 1336-1343 (1978).

[165] McCay P. B., Gibson D. D., Hornbrook K. R., Glutathione-dependent inhibition of lipid peroxidation by a soluble, heat-labile factor not glutathione peroxidase, Fed. Proceed. 40, 199-205 (1981).

[166] McCord J. M., Day E. D., Superoxide-dependent production of hydroxyl radical catalyzed by iron-EDTA complex, FEBS Lett. 86, 139-142 (1978).

[167] McCord J. M., Fridovich I., Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocuprein, J. Biol. Chem. 244, 6049-6055 (1969).

[168] McDearmon G. F., Moulton G. C., Radiation-induced free radicals in l - ascorbic acid: An ESR study, Radiat. Res. 89, 468-480 (1982).

[169] Michaels H. B., Hunt J. W., A model for radiation damage in cells by direct effect and by indirect effect: A radiation chemistry Approach, Radiat. Res. 74, 23--34 (1978).

[170] Mills G. C., Burger D. O., Schneider M., Levin W. C., Ion exchange analysis of organic phosphate compounds of erythrocytes from individuals with neoplastic diseases, J. Lab. Clin. Med. 58, 725-735 (1961).

[171] Misra H. P., Fridovich I., The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase, J. Biol. Chem. 247, 3170-3175 (1972).

[172] Misra H. P., Fridovich I., The generation of superoxide radical during the autoxidation of ferredoxins, J. Biol. Chem. 246, 6886-6890 (1971).

[173] Misra H. P., Fridovich I., The univalent reduction of oxygen by reduced flavins and quinones, J. Biol. Chem. 247, 188-192 (1972).

[174] Mitchel R. E., Morrison D. P., Unrau P., Is radiation-generated aqueous electron-type damage repaired by the recombinational repair pathway in Saccharomyces cerevisiae, Radiat. Biol. 89, 481-487 (1982).

[175] Miura T., Ogiso T., Formation of denaturated erythrocytes by exposure to a superoxide radical generating system of xanthine oxidase, Chem. Pharm. Bull. 29, 1730--1735 (1981).

[176] Moody C. S., Hassan H. M., Mutagenicity of oxygen free radicals, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 2855--2859 (1982).

[177] Morse M. L., Dahl R. H., Cellular glutathione is a key to the oxygen effect in radiation damage, "Nature" 271, 660-662 (1978).

[178] Nakano M., Kiyoshige T., Shimizu Y., Yasuhiro T., Humio I., Toshchikp M., Spectroscopic evidence for the generation of singlet oxygen in self-reaction of sec-peroxy radicals, J. Amer. Chem. Soc. 98, 1974-1975 (1976).

[179] Nakano M., Noguchi T., Biochemical and medical aspects of active oxygen, Tokyo, 29-44 (1977).

[180] Nanni E. J., Stallings M. D., Sawyer D.T., Does superoxide ion oxidize catechol, α-tocopherol, and ascorbic acid by direct electron transfer, J. Am. Chem. Soc. 102, 4481-4485 (1980).

[181] Natarajan P., Raghavan N. V., Reaction between superoxide ion and the superoxide coordinated in a cobalt (III) complex, J. Am. Chem. Soc. 102, 4518-4519 (1980).

[182] Näslund M., Fedorcsak I., Ehrenberg L., Role of peroxide in the radioprotective action of thiols in E. coli, Int. J. Radiat. Biol. 29, 501--511 (1976).

[183] Oberley L. W., Buettner G. R., The production of hydroxyl radical by bleomycin and iron (II), FEBS Lett. 97, 47-49 (1979).

[184] Oberley L. W., Buettner G. R., Role of superoxide dismutase in Cancer: A review, Cancer Res. 39, 1141-1149 (1979).

[185] Oberley L. W., Oberley T. D., Buettner G. R., Cell differentiation, aging and cancer: The possible role of superoxide and superoxide dismutases, Med. Hypotheses 6, 249-268 (1980).

[186] Oberley L. W., Oberley T. D., Buettner G. R., Cell division in normal and transformed cells. The possible role of superoxide and hydrogen peroxide, Med. Hypotheses 7, 21-42 (1981).

[187] Olive P. L., Inhibition of DNA synthesis by nitroheterocycles. I. Correlation with half-wave reduction potential, Br. J. Cancer 40, 89-93 (1979).

[188] Ozawa T., Hanaki A., Reactions of superoxide with water and with hydrogen peroxide, Chem. Pharm. Bull. 29, 926-928 (1981).

[189] Pan S., Bachur R., Xanthine oxidase catalized reductive cleavage of anthracycline antibiotics and free radical formation, Mol. Pharmacol. 17, 95-99(1979).

[190] Pasternack R. F., Skowronek W. R., Catalysis of the disproportionation of superoxide by metalloporphyrins, J. Inorg. Biochem. 11, 261-267 (1979).

[191] Pederson T. C., Aust S. D., The role of superoxide and singlet oxygen in lipid peroxidation promoted by xanthine oxidase, Biochem. Biophys. Res. Commun. 52, 1071--1078 (1973).

[192] Petkau A., Radiation protection by superoxide dismutase, Photochem. Photobiol. 28, 765-774 (1978).

[193] Petkau A., Chelack W. S., Pleskach S. D., Protection by superoxide dismutase of white blood cells in X-irradiated mice, Life Sci. 22, 867-882 (1978).

[194] Petkau A., Copps T. P., Kelly K., Superoxide dismutase within the bovine erythrocyte membrane, Biochim. Biophys. Acta 645, 71-80 (1981).

[195] Piatt J. F., Cheema A. S., O'Brien P.J., Perioxidase catalyzed singlet oxygen formation from hydrogen peroxide, FEBS Lett. 74, 251-254 (1977).

[196] Płonka A., Radioliza wody i jej aspekty biologiczne, Acta Univ. Lodz. 19, 27-66 (1976).

[197] Pollack S., Campana T., Early events in guinea pig reticulocyte iron uptake, Biochim. Biophys. Acta 673, 366-373 (1981).

[198] P r y o r W. A., The formation of free radicals and the consequences of their reactions in vivo, Photochem. Photobiol. 28, 787-801 (1978).

[199] P u p p o A., R i g a u d J., J o b D., Role of superoxide anion in leghemoglobin autoxidation, Plant. Sci. Lett. 22, 353-360 (1981).

[200] P u r o h i t S., B i s b y R., C u n d a l l R., Chemical damage in gamma-irradiated human erythrocyte membranes, Int. J. Riadiat. Biol. 38, 159-166 (1980).

[201] R a f f i n T. A., S i m o n L., D o u g l a s W., T h e o d o r e J., R o b i n E., The effects of variable O_2 tension and of exogenous superoxide dismutase on type II pneumocytes exposed to paraquat, Lab. Investig. 42, 205-208 (1980).

[202] R a h i m t u l a A. D., H a w c o F. J., O'B r i e n P. J., The involvement of $^1O_2$ in the inactivation of mixed function oxidase and peroxidation of membrane lipids during the photosensitized-oxidation of liver microsomes, Photochem. Photobiol. 28, 811-815 (1978).

[203] R a l s t o n A., Wstęp do analizy numerycznej, Warszawa, 248-255 (1975).

[204] R i b a r o v S. R., B e n o v L. C., Relationship between the hemolytic action of heavy metals and lipid peroxidation, Biochim. Biophys. Acta 640, 721-726 (1981).

[205] R i b a r o v S. R., B e n o v L. C., B e n c h e v I.C., The effect of lead on hemoglobin-catalyzed lipid peroxidation, Biochim. Biophys. Acta 664, 453-459 (1981).

[206] R o b e r t s P. B., Enhanced radiation damage to the erythrocyte membrane in the presence of azide and other anions, Int. J. Radiat. Biol. 35, 561-570 (1979).

[207] R o b e r t s o n P., F r i d o v i c h I., Does copper--D-penicillamine catalyze the dismutation of O_2^-, Arch. Biochem. Biophys. 203, 830-831 (1980).

[208] R o s e n G. M., F i n k e l s t e i n E., R a u c k m a n E. J., A metod for the detection of superoxide in biological systems, Arch. Biochem. Biophys. 215, 367-378 (1982).

[209] R o s s A. H., M c C o n n e l l H. M., Permeation of a spin-label phosphate into the human erythrocyte, "Biochemistry" 14, 2793-2798 (1975).

[210] Rotilio G., Bray R. C., Fielden M., A pulse radiolysis study of superoxide dismutase, Biochim. Biophys. Acta 268, 605-609 (1972).

[211] Rowley D. A., Halliwell B., Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of thiol compounds, FEBS Lett. 138, 33-36 (1982).

[212] Rowley D. A., Halliwell B., Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals from NADH and NADPH in the presence of iron salts, FEBS Lett. 142, 39-41 (1982).

[213] Russanov E. M., Kassabova T. A., Enzymes of oxygen metabolism and lipid peroxidation in erythrocytes from copper-defficient rats, Int. J Biochem. 14, 321-325 (1982).

[214] Russanov E. M., Ljutakova S. G., Leutchew S., Effect of $CuSO_4$ and $Cu(II)(Gly)_2$ on some indirect assays for superoxide dismutase activity, Arch. Biochem. Biophys. 215, 222-229 (1982).

[215] Samuni A., Chevion M., Czapski G., Unsual copper-induced sensitization of the biological damage due to superoxide radicals, J. Biol. Chem. 256, 12 632-12 635 (1981).

[216] Sasaki M. S., Matsubara S., Free radical scavenging in protection of human lymphocytes against chromosome aberration formation by gamma-ray irradiation, Int. J. Radiat. Biol. 32, 439-445 (1977).

[217] Sawyer D. T., Gibian M. J., The chemistry of superoxide ion, "Tetrahedron" 35, 1471-1481 (1979).

[218] Sawyer D. T., Valentine J. S., How super is superoxide, Acc. Chem. Res. 14, 393-400 (1981).

[219] Schubert J., Stegeman H., Swildens M., Radiosensitization of microorganisms by radical anions. I. Medium effects, Int. J. Radiat. Biol. 40, 131-141 (1981).

[220] Sealy R. C., Swartz H., Olive P., Electron spin resonance spin trapping: detection of superoxide formation during aerobic microsomal reduction of nitro-compounds, Biochem. Biophys. Res. Commun. 82, 680-684 (1978).

[221] Seki H., Imamura M., The oxidation of ferrocyto-

chrome c by Br_2^-, $(SCN)_2^-$, N_3 and OH radicals studied by pulsed-electron and γ-ray radiolysis, Biochim. Biophys. Acta 635, 81-89 (1981).

[222] S i n e t P., G a r b e r P., Inactivation of the human CuZn superoxide dismutase during exposure to O_2^- and H_2O_2, Arch. Biochem. Biophys. 212, 411-416 (1981).

[223] S i n g h A., S i n g h H., K r e m e r s W., K o r o l i G. M., Involvement of singlet oxygen in biochemical systems, Bull. europ. Physiopath. resp. 17, 31-41 (1981).

[224] S i n h a B. K., C o x M. G., Stimulation of superoxide formation by actinomycin D and its N^2-substituted spin-labeled derivatives, Mol. Pharmacol. 17, 432-434 (1979).

[225] S j ö b e r g L., E r i k s e n T. E., R e v e s z L., The reaction of the hydroxyl radical with glutathione in neutral and alkaline aqueous solution, Radiat. Biol. 89, 255-263 (1982).

[226] S k o t l a n d T., L j o n e s T., Direct spectrophotometric detection of ascorbate free radical formed by dopamine β-monooxygenase and by ascorbate oxidase, Biochim. Biophys. Acta 630, 30-35 (1980).

[227] S t r a t f o r d I. J., G r a y P., Some factors affecting the specific toxicity of misonidazole towards hypoxic mammalian cells, Br. J. Cancer 37, 129-131 (1978).

[228] S u g i u r a Y., The production of hydroxyl radical from copper (I) complex systems of bleomycin and tallysomycin: comparison with copper (II) and iron (II) systems, Biochem. Biophys. Res. Commun. 90, 375-383 (1979).

[229] S v i n g e n B. A., B u e g e J. A., O'N e a l F. O., A u s t S. D., The mechanism of NADPH-dependent lipid peroxidation, J. Biol. Chem. 254, 5892-5899 (1979).

[230] S v i n g e n B. A., P o w i s G., Pulse radiolysis studies of antitumor quinones: radical lifetimes, reactivity with oxygen, and one-electron reduction potentials, Arch. Biochem. Biophys. 209, 119-126 (1981).

[231] T a n g e r a s A., F l a t m a r k T., B ä c k s t r ö m D., E h r e n b e r g A., Mitochondrial iron not bound in heme and iron-sulfur centers. Estimation, compartmentation and redox state, Biochim. Biophys. Acta 589, 162-175 (1980).

[232] T a n i g u c h i M., A i k a w a M., S a k a g a m i T., A simple and effective method for hemolysis a hypoxanthi-

ne-xanthine oxidase system and alteration of erythrocyte phospholipid composition during the hemolysis, J. Biochem. 89, 795-800 (1981).

[233] T i e n M., S v i n g e n B. A., A u s t S. D., Superoxide dependent lipid peroxidation, Fed. Proceed. 40, 179--182 (1981).

[234] T i e n M., S v i n g e n B. A., A u s t S. D., An investigation into the role of hydroxyl radical in xanthine oxidase-dependent lipid peroxidation, Arch. Biochem. Biophys. 216, 142-151 (1982).

[235] T i l b y M. J., L o v e r o c k P. S., F i e l d e n E. M., Effects of nitrous oxide on the radiation sensitivity of Escherichia coli in the presence and absence of NPPN, Radiat. Biol. 89, 488-502 (1982).

[236] T r o c h a P. J., C a t r a v a s G. N., Variation in cyclic nucleotide levels and lysosomal enzyme activities in the irradiated rat, Radiat. Res. 83, 658-667 (1980).

[237] V a n B a l g o o y J., R o b e r t s E., Superoxide dismutase in normal and malignant tissues in different species, Comp. Biochem. Physiol. 62B, 263-268 (1979).

[238] V a r n e s M. E., B i a g l o w J. E., The reaction of the carcinogen 4-nitroquinoline-1-oxide with the non-protein thiols of mammalian cells, Cancer Res. 39, 2960-2965 (1979).

[239] V e s e l y D. L., W a t s o n B., L e v e y G. S., Activation of liver guanylate cyclase by paraquat; possible role of superoxide anion, J. Pharmacol. Exp. Therap. 209, 162-164 (1979).

[240] V o s O., B u d k e L., F a t o m e M., H o o i d o n k C., Radioprotection by thiazolidines at the cellular level, Int. J. Radiat. Biol. 39, 291-296 (1981).

[241] W a r d J. F., Some biochemical consequences of the spatial distribution of ionizing radiation-produced free radicals, Radiat. Res. 86, 185-195 (1981).

[242] W a t a n a b e S., O g a t a M., Generation of superoxide and hydrogen peroxide during interaction of nitrite with human hemoglobin, Acta Med. Okayama, 35, 173-178 (1981).

[243] W a t a n a b e H., I i z u k a H., T a k e h i s a M., Factors affecting the radiosensitization of Pseudomonas radiora O-1 by N_2O, Radiat. Res. 89, 325-333 (1982).

[244] Watts R. P., Brendel K., Luthra M. G., Kim H. D., Inosine from liver as a possible energy source for pig red blood cells, Life Sci. 25, 1577-1582 (1979).

[245] Westman N. G., Marklund S. L., Copper-and Zinc-containing superoxide dismutase and manganese-containing superoxide dismutase in human tissues and human malignant tumors, Cancer Res. 41, 2962-2966 (1981).

[246] Winterbourn C. C., Comparision of superoxide with other reducing agents in the biological production of hydroxyl radicals, Biochem. J. 182, 625-628 (1979).

[247] Winterbourn C. C., Production of hydroxyl radicals from paraquat radicals and H_2O_2, FEBS Lett. 128, 339-342 (1981).

[248] Winterbourn C. C., Hydroxyl radical production in body fluids, Biochem. J. 198, 125-131 (1981).

[249] Winterbourn C. C., French J. K., Claridge R. F., Superoxide dismutase as an inhibitor of reactions of semiquinone radicals, FEBS Lett. 94, 269-272 (1978).

[250] Winterbourn C. C., French J. K., Claridge R. F., The reaction of menadione with haemoglobin, Biochem. J. 179, 665-673 (1979).

[251] Wong S., Halliwell B., Richmond R., Skowronek W. R., The role of superoxide and hydroxyl radicals in the degradation of hyaluronic acid induced by metal ions and ascorbic acid, J. Inorg. Biochem. 14, 127-134 (1981).

[252] Wright J. R., Colby H. D., Miles P. R., Cytosolic factors which affect microsomal lipid peroxidation in lung and liver, Arch. Biochem. Biophys. 206, 296-304 (1981).

[253] Yamada T., Ohyama H., Restoration of radiation damage in rat thymocytes by adenine, Int. J. Radiat. Biol. 18, 433-438 (1970).

[254] Yamashoji S., Yoshida H., Kajimoto G., Photooxidation of lincleic acid by ultraviolet light and effect of superoxide anion quencher, Agric. Biol. Chem. 43, 1249-1254 (1979).

[255] Yasuda H., Shimada O., Nakajima A., Asano T., Cerebral protective effect and radical scavenging action, J. Neurochem. 37, 934-938 (1981).

[256] Yoshikawa K., Kuriyama K., Superoxide dismutase catalyzes activation of synaptosomal soluble guanylate cyclase from rat brain, Biochem. Biophys. Res. Commun. 95, 529-534 (1980).

[257] Youngman R. J., Dodge A. D., Mechanism of paraquat action: inhibition of the herbicidal effect by a copper chelate with superoxide dismutating activity, Z. Naturforsch. 34c, 1032-1035 (1979).

[258] Youngman R. J., Dodge A. D., Lengfelder E., Elstner E. F., Inhib ion of paraquat phytotoxicity by a novel copper chelate with superoxide dismutating activity, "Experientia" 35, 1295-1296 (1979).

[259] Youngman R. J., Elstner E. F., Oxygen species in paraquat toxicity: the crypto-OH radical, FEBS Lett. 129, 265-268 (1981).

[260] Zgirski A., Gondko R., Obliczenia chemiczne, Warszawa, 26-32 (1975).

[261] Zijlstra W. G., Van Kampen E., Standarization of hemoglobinometry, Clin. Chim. Acta 5, 719-723 (1960).

ENZYMATIC DEFENCE OF ERYTHROCYTE MEMBRANES AGAINST FREE RADICALS

(Summary)

The studies concentrate on the problem of enzymatic defence of a cell against free radicals. Porcine erythrocytes were the material for the experiments. A direct objective of this study was determination of radiation-induced changes in activities of enzymes protecting membranes against the process of lipid peroxidation and finding eventual links to alterations of chosen structural and functional parameters of erythrocyte membranes.

Three indices of structural damage to the membrane were employed, i.e. the activity of acetylcholine hydrolase, a membrane protein located on its outer surface, osmotic fragility of erythrocytes and extent of lipid peroxidation.

Distrubances in transport processes across the membranes were chosen as an index of alterations in functional properties of the membranes. The method of spin labels was used. Moreover, in experiments performed by the method of electron paramagnetic resonance, ionizing radiation was employed for differentiation of pathways of transport of various compounds across the erythrocyte membrane.

An indirect objective of these studies was an attempt to determine to which extent enzymatic protection of the cell may counteract structural and functional changes in a cell membrane due to the action of free radicals.

The results obtained indicate that cellular membranes are exposed to a high extent to the action of all products of water radiolysis. Cytoplasmic protective enzymes, due to the maintenance of high activity in irradiated erythrocytes, counteract the radiation-induced changes and constitute an important element of protection of cellular membranes against free radicals.

SPIS TREŚCI

1. ROLA WOLNYCH RODNIKÓW W BIOLOGII 3

1.1 Powstanie wolnych rodników w komórce 3
1.2 Reakcje wolnych rodników 5
1.3 Uszkodzenie błon komórkowych przez wolne rodniki 7

2. MECHANIZMY POWSTAWANIA I TOKSYCZNOŚĆ WOLNYCH RODNIKÓW W KOMÓRCE 11

2.1 Produkty radiolizy wody 11
2.1.1. Anionorodnik ponadtlenkowy 12
2.1.2. Rodnik hydroksylowy 18
2.1.3. Tlen singletowy 24
2.1.4. Metody wykrywania rodników ponadtlenkowych i hydroksylowych w materiale biologicznym 25
2.1.5. Regulacja poziomu wolnych rodników tlenowych w komórkach 27
2.1.6. Zmiatacze wolnych rodników 29
2.2. Rodniki anionowe powstające w reakcji z produktami radiolizy wody 32
2.2.1. Powstawanie rodników anionowych 32
2.2.2. Rodniki NAD i askorbinianowe 33
2.3. Toksyczność produktów radiolizy wody 34

3. CEL BADAŃ WŁASNYCH 36

4. MATERIAŁ I METODY 38

4.1. Izolowanie erytrocytów 38
4.2. Izolowanie błon erytrocytarnych 38
4.3. Preparatyka dysmutazy ponadtlenkowej (E.C. 1.15.1.1) 38
4.4. Oznaczanie aktywności dysmutazy ponadtlenkowej 40

4. 5. Oznaczanie aktywności katalazy (E.C. 1.11.1.6) 40
4. 6. Oznaczanie aktywności peroksydazy (E.C. 1.11.1.9) .. 41
4. 7. Oznaczanie aktywności hydrolazy acetylocholinowej (E.C. 3.1.1.7) 41
4. 8. Badanie oporności osmotycznej erytrocytów 41
4. 9. Oznaczanie zawartości białka w preparatach błon ... 42
4.10. Oznaczanie hemoglobiny 42
4.11. Oznaczanie stopnia peroksydacji lipidów 42
4.12. Oznaczanie szybkości transportu znaczników spinowych poprzez błony erytrocytarne 43
4.13. Pomiary stężenia znaczników 43
4.14. Napromienianie erytrocytów i błon erytrocytarnych . 43
4.15. Obliczenia statystyczne 44

WYNIKI 44

5.1. Ochrona błon erytrocytarnych przed wolnymi rodnikami 44
5.1.1. Enzymy metabolizmu nadtlenków 44
5.1.2. Hydrolaza acetylocholiny 48
5.1.3. Oporność osmotyczna erytrocytów w obecności radioprotektorów 48
5.1.4. Zmiany oporności osmotycznej erytrocytów w obecności soli o różnych anionach, badane w atmosferze powietrza 50
5.1.5. Zmiany oporności osmotycznej erytrocytów w obecności anionów, badane w atmosferze podtlenku azotu 52
5.1.6. Peroksydacja lipidów w błonach erytrocytarnych . 54
5.2. Transport przez błony erytrocytarne związków znakowanych spinowo 56

DYSKUSJA 62

6.1. Charakterystyka uszkodzenia erytrocytów przez promieniowanie i rola radioprotektorów enzymatycznych i chemicznych 64
6.2. Wykorzystanie związków tiolowych w badaniach uszkodzeń popromiennych 67
6.3. Rola rodników anionowych w popromiennym uszkodzeniu błon erytrocytarnych 70
6.4. Zastosowanie metody EPR i promieniowania do rozróż-

nienia układów transportujących związki przez błony erytrocytarne 72

7. WNIOSKI 73

OBJAŚNIENIE STOSOWANYCH SKRÓTÓW I SYMBOLI 75

LITERATURA 77

BIBLIOTEKA UNIWERSYTECKA ŁÓDZI