

Część 1: Strategia ataku 15

- 1.1. Tlen: pierwiastek życia i śmierci 15
 - 1.1.1. Tlen — pierwiastek życia 15
 - 1.1.2. Tlen — pierwiastek chorób i śmierci 16
- 1.2. Co to są reaktywne formy tlenu? 19
- 1.3. Właściwości reaktywnych form tlenu 30
 - 1.3.1. Nieco o reakcjach wolnorodnikowych w ogólności 30
 - 1.3.1.1. Inicjacja 30
 - 1.3.1.2. Propagacja 32
 - 1.3.1.3. Terminacja 34
 - 1.3.1.4. Powstawanie rodników organicznych 34
 - 1.3.2. Anionorodnik ponadtlenkowy 35
 - 1.3.3. Nadtlenek wodoru 46
 - 1.3.4. Rodnik hydroksylowy 48
 - 1.3.5. Tlen singletowy 51
 - 1.3.6. Ozon 53
 - 1.3.7. Kwas podchlorawy i jego krewniacy 54
 - 1.3.8. Tlenek azotu i nadtlenoazotyn 55
 - 1.3.9. Rodniki organiczne 57
- 1.4. Jak powstają reaktywne formy tlenu? 58
 - 1.4.1. Promieniowanie jonizujące 59
 - 1.4.2. Ultradźwięki 61
 - 1.4.3. Promieniowanie nadfioletowe 62
 - 1.4.4. Światło. Fotosensybilizacja. Fotoredukcja 62
 - 1.4.5. Utlenianie zredukowanych form niskocząsteczkowych składników komórek 64
 - 1.4.6. Utlenianie ksenobiotyków. Cykle redoks 66
 - 1.4.7. Utlenianie białek oddechowych 69
 - 1.4.8. Reakcje enzymatyczne 71
 - 1.4.9. Łańcuch oddechowy 73
 - 1.4.10. Peroksysomy 75
 - 1.4.11. Inne łańcuchy transportu elektronów 76
 - 1.4.12. W jakich okolicznościach powstaje tlen singletowy? 78
 - 1.4.13. Narodziny dalszych krewnych 79
 - 1.4.14. Jakie jest stacjonarne stężenie i H₂O₂ w komórkach? 81
 - 1.4.15. Stykamy się z reaktywnymi formami tlenu częściej, niż podejrzewamy 82
- 1.5. Biologiczne znaczenie reakcji RFT 84
 - 1.5.1. Oskarżenie: reaktywne formy tlenu uszkadzają komórki 84
 - 1.5.2. Kto jest zabójcą? Podejrzany: rodnik hydroksylowy 86
 - 1.5.3. Skąd się bierze rodnik hydroksylowy in vivo? Domniemana droga: reakcja Habera–Weissa 87
 - 1.5.4. Lepsza hipoteza: reakcja Fentona 88
 - 1.5.5. Podejrzany utrudnia zbieranie dowodów: regiospecyficzna reakcja Fentona 90
 - 1.5.6. Inni podejrzani 91
- 1.6. Niebezpieczne jony metali 91
 - 1.6.1. Czy jony metali przejściowych są wolnymi rodnikami? 91
 - 1.6.2. Jony metali przejściowych: nieproszeni goście 94
 - 1.6.3. Dobrze i źle chelatory jonów metali 95
 - 1.6.4. Czy in vivo dostępne są jony metali katalizujące reakcję Habera–Weissa? 97
- 1.7. Uszkodzenie składników komórek przez reaktywne formy tlenu 99
 - 1.7.1. Peroksydacja lipidów 99
 - 1.7.2. Co to jest peroksydacja enzymatyczna? 105
 - 1.7.3. Produkty końcowe peroksydacji lipidów: wtórne mediatory działania reaktywnych form tlenu 106
 - 1.7.4. Jakie jest biologiczne znaczenie peroksydacji lipidów? 107
 - 1.7.5. Peroksydacja lipidów a starczy barwnik (lipofuscyna) 109
 - 1.7.6. Uszkodzanie białek przez reaktywne formy tlenu 110
 - 1.7.7. Nie tylko lipidy ulegają peroksydacji! 115
 - 1.7.8. Gromadzenie się białek uszkodzonych przez reaktywne formy tlenu w starych komórkach 116
 - 1.7.9. Uszkodzanie kwasów nukleinowych 117
 - 1.7.10. Ile uszkodzeń DNA powstaje w komórce? 119
 - 1.7.11. Cukrowce też są uszkodzane 119

1.8.	Tlen a promieniowanie jonizujące	120	
1.9.	Jak się to robi? Najczęściej stosowane metody wykrywania reaktywnych form tlenu i wywołanych przez nie uszkodzeń	120	
1.9.1.	Przegląd metod	121	
	1.9.1.1. Spektrometria elektronowego rezonansu paramagnetycznego	121	
	1.9.1.2. Pułapkowanie spinów	122	
	1.9.1.3. Chemiluminescencja	124	
	1.9.1.4. Reakcje dające specyficzne, łatwo wykrywalne produkty	125	
1.9.2.	Detekcja anionorodnika nadadtlenkowego	127	
1.9.3.	Detekcja nadttenu wodoru	131	
1.9.4.	Detekcja rodnika hydroksylowego	132	
1.9.5.	Jak można wyznaczyć stałe szybkości reakcji reaktywnych form tlenu?	136	
1.9.6.	Badanie peroksydacji lipidów	138	
	1.9.6.1. Reakcja z kwasem tiobarbiturowym	138	
	1.9.6.2. Pomiar stężenia nadttlenków lipidów	139	
	1.9.6.3. Pomiar stężenia sprzężonych dienów	140	
	1.9.6.4. Pomiar uwalniania alkanów	140	
	1.9.6.5. Chemiluminescencja	140	
	1.9.6.6. Inne metody	141	
1.9.7.	Badanie produktów utlenienia białek	142	
Część 2: Mechanizmy obrony 144			
2.1.	Ochrona osobista komórek: mechanizmy obrony przed reaktywnymi formami tlenu	144	
2.2.	Białka chroniące przed reaktywnymi formami tlenu	145	
	2.2.1. Służby wysoce specjalne: enzymy rozkładające reaktywne formy tlenu	145	
	2.2.2. Inne enzymy obronne	149	
	2.2.3. Jony metali pod ścisłą strażą	152	
	2.2.4. Podwójna rola peroksydazy glutationowej	156	
	2.2.5. Wywiad z agentką SOD-1	159	
	2.2.6. Dysmutazy z epoki przedmiedziowej	166	
	2.2.7. Nieco rozważań o ewolucji dysmutaz nadttlenkowych	168	
	2.2.8. Dysmutazy a endosymbiotyczna teoria pochodzenia mitochondriów i chloroplastów	169	
	2.2.9. Występowanie dysmutaz. Prawidłowości i zagadki	169	
	2.2.10. Pozakomórkowa dysmutaza nadttlenkowa	171	
	2.2.11. Zapoznajmy się nieco bliżej: katalaza	173	
	2.2.12. Zapoznajmy się nieco bliżej: peroksydaza glutationowa	174	
	2.2.13. Bakteryjni krewniacy katalaz i peroksydaz	175	
	2.2.14. Układ tioredoksyny	176	
	2.2.15. Jeszcze jedno białko obronne: metalotioneina	177	
	2.2.16. Białka — kamikadze	179	
2.3.	Mali obrońcy	179	
	2.3.1. Pionki gry obronnej komórek: antyoksydanty niskocząsteczkowe	179	
	2.3.2. Nowa rola końcowych produktów metabolizmu?	184	
	2.3.3. Osobliwy tripeptyd: glutation	186	
	2.3.4. Askorbinian: antyoksydant trochę podejrzany	189	
	2.3.5. Główne antyoksydanty hydrofobowe: tokoferole	192	
	2.3.6. Kolejne antyoksydanty hydrofobowe: karotenoidy i ksantofile	194	
	2.3.7. Budująca współpraca antyoksydantów	196	
	2.3.8. Czy metale mogą być antyoksydantami?	198	
	2.3.9. Sztuczne antyoksydanty i niby-enzymy	199	
	2.3.10. Dla każdego coś miłego	201	
2.4.	Powrót anionorodnika nadttlenkowego. Zlew wolnorodnikowy	203	
2.5.	Askorbinianowy zlew wolnorodnikowy	204	
2.6.	Co chroni płyny pozakomórkowe przed reaktywnymi formami tlenu?	205	
2.7.	Całkowita zdolność antyoksydacyjna	208	
2.8.	Czarna teczka na Antyoksydanty (podsluchane w Urzędzie Ochrony Komórki)	215	
2.9.	Trzecia linia obrony	218	
	2.9.1. Uszkodzenia DNA są naprawiane	218	
	2.9.2. Uszkodzone białka są trawione szybciej	220	
2.10.	Jak to się robi? Oznaczanie aktywności głównych enzymów chroniących przed reaktywnymi formami tlenu	222	
	2.10.1. Dysmutaza nadttlenkowa	222	

- 2.10.2. Katalaza 225
- 2.10.3. Peroksydaza glutationowa 225

Część 3: Obrazki z pola bitwy 227

- 3.1. Koncepcja stresu oksydacyjnego 227
- 3.2. Metaboliczne efekty stresu oksydacyjnego 228
- 3.3. Mutagenne działanie reaktywnych form tlenu 231
- 3.4. Adaptacje komórek 232
- 3.5. Reaktywne formy tlenu jako obrońcy organizmu 234
 - 3.5.1. Wybuch oddechowy fagocytów 234
 - 3.5.1.1. Nowy rodzaj wybuchu: wybuch oddechowy 234
 - 3.5.1.2. Fagocytarny miotacz ognia: oksydaza NADPH 235
 - 3.5.1.3. Tragiczne konsekwencje niedoboru oksydazy NADPH: przewlekła choroba ziarniniakowa 237
 - 3.5.1.4. Czynniki modyfikujące wybuch oddechowy 237
 - 3.5.1.5. Jak wybuch oddechowy zabija bakterie? 238
 - 3.5.1.6. Inna broń granulocytów obojętnochłonnych: mieloperoksydaza 239
 - 3.5.2. Reaktywne formy tlenu w parazytologii: bronią nie tylko przed bakteriami 239
 - 3.5.3. Co ślina przeciw mikrokom przynosi 241
- 3.6. Inne komórki również uwalniają reaktywne formy tlenu 242
- 3.7. Medycyna pisana na nowo 242
 - 3.7.1. Reaktywne formy tlenu a choroby 242
 - 3.7.2. Niebezpieczeństwa zapalenia 243
 - 3.7.3. Kolejny paradoks związany z tlenem: reperfuzyja po niedokrwieniu. Uwaga przy transplantacji narządów! 245
 - 3.7.4. Inne występkę reaktywnych form tlenu 248
 - 3.7.4.1. Reumatoidalne zapalenie stawów 248
 - 3.7.4.2. Miażdżycę 249
 - 3.7.4.3. Cukrzyca 252
 - 3.7.4.4. Choroby ośrodkowego układu nerwowego 255
 - 3.7.4.5. Choroby układu pokarmowego 257
 - 3.7.4.6. Choroby krwinek czerwonych 258
 - 3.7.4.7. Nowotwory 260
 - 3.7.4.8. AIDS 261
 - 3.7.4.9. Choroby samouodpornieniowe 262
 - 3.7.4.10. Grypa 263
 - 3.7.4.11. Wstrząs 263
 - 3.7.4.12. Alkaptonuria 263
 - 3.7.4.13. Prion a sprawa dysmutazy 264
 - 3.7.5. Reaktywne formy tlenu przeszkadzają w leczeniu 264
 - 3.7.6. Reaktywne formy tlenu także leczą i pomagają 266
 - 3.7.7. Antyoksydanty i enzymy rozkładające reaktywne formy tlenu jako leki 267
 - 3.7.7.1. Czy antyoksydanty mogą leczyć? 267
 - 3.7.7.2. Antyoksydanty już leczą! 270
 - 3.7.7.3. Enzymy jako leki 273
 - 3.7.7.4. Problemy i kłopoty 276
 - 3.7.8. Gdzie jeszcze mogą przydać się antyoksydanty i enzymy broniące przed reaktywnymi formami tlenu? 277
- 3.8. Fizjologiczny stres oksydacyjny 278
 - 3.8.1. Czy bieg po zdrowie jest zdrowy? 278
 - 3.8.2. Gdy działa wewnętrzny grzejnik 281
- 3.9. Reaktywne formy tlenu a starzenie się 282
- 3.10. Reaktywne formy tlenu jako agenci szkodliwych czynników środowiskowych 288
 - 3.10.1. Azbest i sfrustrowane fagocyty 288
 - 3.10.2. Powietrze, które wdychamy 289
 - 3.10.3. Herbicydy bipyrydylowe 291
 - 3.10.4. Ksenobiotyki i biedna wątroba 292
 - 3.10.5. Gdy Wojtek zostanie strażakiem 293
- 3.11. Ludzie przeciwko sobie — za pośrednictwem reaktywnych form tlenu 293
 - 3.11.1. Zanim wychylisz kieliszek 293
 - 3.11.2. Co jest w dymku z papierosa? 296
- 3.12. Reaktywne formy tlenu a rośliny 298
 - 3.12.1. Glon trujący ryby i inni truciele 298
 - 3.12.2. Pomidory: SOD zamiast okularów słonecznych 298

3.12.3.	Dysmutaza na straży wiązania azotu	299	
3.12.4.	SOD jako wyłącznik światła?	299	
3.12.5.	Rośliny adaptują się do parakwatu	299	
3.12.6.	Szok tlenowy po niedotlenieniu — również u roślin	300	
3.12.7.	Reaktywne formy tlenu bronią rośliny	300	
3.13.	Pochwała równowagi	301	
3.14.	Szukamy okoliczności łagodzących: w jaki jeszcze sposób reaktywne formy tlenu mogą być pożyteczne?		304
3.14.1.	Reaktywne formy tlenu jako substraty reakcji enzymatycznych	304	
3.14.2.	Anionorodnik ponadtlenkowy jako patron ojcostwa?	306	
3.14.3.	Wybuch na początku nowego życia	307	
3.14.4.	Nadtlenki takie, że do rany przyłożysz	307	
3.14.5.	Bez reaktywnych form tlenu nie byłoby czerwonych jabłuszek	308	
3.14.6.	Czy stres oksydacyjny może być korzystny dla organizmu?	308	
3.15.	Reaktywne formy tlenu indukują biosyntezę białek	309	
3.15.1.	Szoki indukują syntezę białek chroniących przed reaktywnymi formami tlenu	309	
3.15.2.	Reaktywne formy tlenu indukują biosyntezę białek w komórkach bakteryjnych	310	
3.15.3.	Jak to wygląda w komórkach ssaków?	312	
3.16.	Reaktywne formy tlenu jako mediatory i regulatory metabolizmu	315	
3.16.1.	Reaktywne formy tlenu indukują różnicowanie?	316	
3.16.2.	Nadtlenek wodoru jako mediator działania insuliny — i nie tylko	318	
3.16.3.	Reaktywne formy tlenu stymulują transport	319	
3.16.4.	Reaktywne formy tlenu wpływają na przekazywanie informacji do komórki i w komórce		321
3.16.5.	Nadtlenki regulują syntezę prostanoidów	327	
3.16.6.	Tlenek azotu: niezwykle pośrednik	328	
3.16.7.	Główny komórkowy bufor redoks	333	
3.16.8.	Reaktywne formy tlenu a apoptoza	336	
3.17.	Czy powinniśmy jeść więcej antyoksydantów?	337	
3.18.	Smutne dziedzictwo	339	
3.19.	Czego możemy oczekiwać?	342	

Część 4: Książka kucharska dla początkujących badaczy reaktywnych form tlenu 343

4.1.	Detekcja anionorodnika ponadtlenkowego	343	
4.1.1.	Detekcja wytwarzania przez zaktywowane granulocyty w pełnej krwi na podstawie redukcji cytochromu c	343	
4.1.2.	Detekcja wytwarzania na podstawie redukcji błękitu nitrotetrazoliowego (NBT)	344	
4.1.3.	Detekcja wytwarzania na podstawie utleniania hydroetydyny	345	
4.2.	Detekcja nadtlenu wodoru	346	
4.2.1.	Detekcja wytwarzania H ₂ O ₂ na podstawie utleniania czerwieni fenolowej	346	
4.2.2.	Detekcja wytwarzania H ₂ O ₂ na podstawie utleniania skopoletyny	347	
4.2.3.	Detekcja wytwarzania H ₂ O ₂ na podstawie utleniania dihydrorodaminy 123	347	
4.2.4.	Detekcja wytwarzania H ₂ O ₂ na podstawie utleniania 2',7'-dichlorofluorescyny	348	
4.3.	Detekcja rodnika hydroksylogowego	349	
4.3.1.	Detekcja wytwarzania rodnika hydroksylogowego poprzez pomiar degradacji deoksyrybozy	349	
4.3.2.	Detekcja wytwarzania rodnika hydroksylogowego poprzez pomiar hydroksylacji salicylanu	350	
4.3.3.	Detekcja rodnika hydroksylogowego poprzez pomiar hydroksylacji benzoesanu	351	
4.3.4.	Detekcja rodnika hydroksylogowego na podstawie tworzenia metanosulfonianu	352	
4.4.	Kompetycyjne wyznaczenie stałych szybkości reakcji rodnika hydroksylogowego na podstawie hamowania degradacji deoksyrybozy	353	
4.5.	Detekcja słabo związanych jonów metali	354	
4.5.1.	Oznaczenie stężenia żelaza niehemowego za pomocą ferrozyny	354	
4.5.2.	Test utleniania askorbinianu w celu stwierdzenia obecności „katalitycznych jonów metali”	355	
4.5.3.	Test uszkodzenia DNA przez bleomycynę do oznaczenia stężenia słabo związanych jonów żelaza	355	
4.5.4.	Test uszkodzenia DNA przez fenantrolinę do oznaczenia stężenia słabo związanych jonów miedzi	356	
4.5.5.	Spektroskopowa detekcja formy ferrylowej mioglobiny	357	
4.6.	Badanie peroksydacji lipidów	358	
4.6.1.	Oznaczenie stężenia produktów peroksydacji lipidów z kwasem tiobarbiturowym	358	
4.6.1.1.	Oznaczenie spektrofotometryczne bez ekstrakcji chromogenu	359	
4.6.1.2.	Oznaczenie spektrofotometryczne z ekstrakcją chromogenu	359	
4.6.1.3.	Oznaczenie fluorometryczne	360	
4.6.2.	Spektrofotometryczna detekcja sprzężonych dienów	360	
4.6.3.	Jodometryczny pomiar stężenia nadtlenków	361	
4.6.4.	Oznaczenie stężenia nadtlenków z oranżem ksylenolowym	363	

4.7.	Badanie uszkodzeń białek przez reaktywne formy tlenu	364	
4.7.1.	Oznaczenie zawartości grup aminowych w białkach za pomocą fluoreskaminy	364	
4.7.2.	Oznaczenie zawartości grup tiolowych w białkach i w błonach	365	
	4.7.2.1. Oznaczenie zawartości grup tiolowych za pomocą odczynnika Ellmana	365	
	4.7.2.2. Oznaczenie zawartości grup tiolowych za pomocą ditiopirydyny	366	
4.7.3.	Spektrofluorymetryczna detekcja aromatycznych reszt aminokwasowych i produktów ich modyfikacji w białkach	366	
4.7.4.	Oznaczenie zawartości grup karbonylowych w białkach na podstawie reakcji z dinitrofenylohydrazyną	367	
4.8.	Oznaczenie aktywności dysmutazy ponadtlenkowej	368	
4.8.1.	Metoda redukcji NBT za pomocą ksantyny i oksydazy ksantynowej	368	
4.8.2.	Metoda cytochromowa	370	
4.8.3.	Metoda adrenalinowa	371	
4.8.4.	Metoda pirogallolowa	372	
4.8.5.	Metoda 6-hydroksydopaminowa	373	
4.8.6.	Metoda z zastosowaniem zasadowego roztworu DMSO	373	
4.8.7.	Bezpośrednia metoda spektrofotometryczna	374	
4.8.8.	Usuwanie hemoglobiny przed oznaczeniem aktywności SOD w krwinkach czerwonych	375	
4.9.	Oznaczenie aktywności katalazy	376	
4.10.	Oznaczenie aktywności peroksydazy glutationowej	376	
	4.10.1. Metoda bezpośrednia	376	
	4.10.2. Metoda pośrednia	377	
4.11.	Oznaczenie aktywności transferazy glutationowej	378	
4.12.	Barwienie żeli na aktywność dysmutazy ponadtlenkowej i katalazy po rozdzielu elektroforetycznym	379	
	4.12.1. Barwienie żeli na aktywność SOD	380	
	4.12.1.1. Barwienie negatywowe	380	
	4.12.1.2. Barwienie pozytywowe	380	
	4.12.2. Barwienie żeli na aktywność katalazy	380	
	4.12.2.1. Barwienie za pomocą żelazicyjanku	381	
	4.12.2.2. Barwienie za pomocą peroksydazy i diaminobenzyny	381	
4.13.	Oznaczenie stężenia glutationu	382	
	4.13.1. Oznaczenie całkowitego stężenia glutationu (GSH+GSSG)	382	
	4.13.2. Oznaczenie stężenia GSH	383	
	4.13.2.1. Oznaczenie za pomocą aldehydu o-ftalowego	383	
	4.13.2.2. Oznaczenie za pomocą glioksalazy I	384	
	4.13.3. Oznaczenie stężenia disulfidu glutationu	384	
	4.13.4. Oznaczenie mieszanych disulfidów białkowo-glutationowych	386	
4.14.	Oznaczenie stężenia askorbinianu	387	
	4.14.1. Oznaczenie za pomocą 2,6-dichlorofenyloindofenolu	387	
	4.14.2. Oznaczenie za pomocą a,a'-bipirydyli	388	
4.15.	Oznaczenie całkowitej zdolności antyoksydacyjnej płynów biogenych	389	
	4.15.1. Oznaczenie całkowitej zdolności antyoksydacyjnej na zasadzie hamowania utleniania ABTS	389	
	4.15.2. Oznaczenie całkowitej zdolności antyoksydacyjnej na zasadzie hamowania utleniania 2',7'-dichlorofluorescyny	391	
	4.15.3. Oznaczenie całkowitej zdolności antyoksydacyjnej na zasadzie redukcji jonów żelaza (III)	392	
	4.15.4. Oznaczenie całkowitej zdolności antyoksydacyjnej na zasadzie redukcji kationorodnika ABTS	393	
Literatura		395	
Skorowidz		436	