

Wstęp 13

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 $O_2^{\cdot -}$ i H_2O_2 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. Dobre i złe chelatory jonów metali **95**
 - 1.6.4. Czy *in vivo* dostępne są jony metali katalizujące reakcję Habera–Weissa? **97**
- 1.7. Uszkodzanie 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. Uszkodzenie 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. Uszkodzenie 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 nadadtlenku 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 nadadtlenków 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 nadadtlenkowych **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 nadadtlenkowa **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 ponadtlenkowego. Zlew wolnorodnikowy **203**
- 2.5. Ascorbinianowy 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 ponadtlenkowa **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 mikrobom 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: reperfuzja po niedokrwieniu. Uwaga przy transplantacji narządów! **245**
 - 3.7.4. Inne występki reaktywnych form tlenu **248**
 - 3.7.4.1. Reumatoidalne zapalenie stawów **248**
 - 3.7.4.2. Miażdżyca **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 bipirydylowe **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 łągodzących: 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 przyłożą **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 $O_2^{\cdot -}$ przez zaktywowane granulocyty w pełnej krwi na podstawie redukcji cytochromu c **343**
 - 4.1.2. Detekcja wytwarzania $O_2^{\cdot -}$ na podstawie redukcji błękitu nitrotetrazoliowego (NBT) **344**
 - 4.1.3. Detekcja wytwarzania $O_2^{\cdot -}$ na podstawie utleniania hydroetydyny **345**
- 4.2. Detekcja nadtlenu wodoru **346**
 - 4.2.1. Detekcja wytwarzania H_2O_2 na podstawie utleniania czerwieni fenolowej **346**
 - 4.2.2. Detekcja wytwarzania H_2O_2 na podstawie utleniania skopoletyny **347**
 - 4.2.3. Detekcja wytwarzania H_2O_2 na podstawie utleniania dihydrorodaminy 123 **347**
 - 4.2.4. Detekcja wytwarzania H_2O_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 wyznaczanie 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 fluorymetryczne **360**
 - 4.6.2. Spektrofotometryczna detekcja sprzężonych dienów **360**
 - 4.6.3. Jodometryczny pomiar stężenia nadtlenu **361**
 - 4.6.4. Oznaczenie stężenia nadtlenu 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. Oznaczanie zawartości grup karbonylowych w białkach na podstawie reakcji **367** z dinitrofenylohydrazyną **367**
- 4.8. Oznaczanie 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. Oznaczanie aktywności katalazy **376**
- 4.10. Oznaczanie aktywności peroksydazy glutationowej **376**
 - 4.10.1. Metoda bezpośrednia **376**
 - 4.10.2. Metoda pośrednia **377**
- 4.11. Oznaczanie aktywności transferazy glutationowej **378**
- 4.12. Barwienie żeli na aktywność dysmutazy ponadtlenkowej i katalazy po rozdziale 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 diaminobenzzydiny **381**
- 4.13. Oznaczanie 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. Oznaczanie 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. Oznaczanie całkowitej zdolności antyoksydacyjnej płynów biogenych **389**
 - 4.15.1. Oznaczanie całkowitej zdolności antyoksydacyjnej na zasadzie hamowania utleniania ABTS **389**
 - 4.15.2. Oznaczanie całkowitej zdolności antyoksydacyjnej na zasadzie hamowania utleniania 2',7'-dichlorofluorescyny **391**
 - 4.15.3. Oznaczanie całkowitej zdolności antyoksydacyjnej na zasadzie redukcji jonów żelaza (III) **392**
 - 4.15.4. Oznaczanie całkowitej zdolności antyoksydacyjnej na zasadzie redukcji kationorodnika ABTS^{•+} **393**

Literatura 395

Skorowidz 436