



Akademia Medyczna w Gdańsku

Dorota Kulawiak-Gałąska

Mechanizmy wolnorodnikowego działania doksorubicyny
w układach biologicznych

Praca na stopień doktora nauk medycznych

Promotor: Prof. dr hab. med. Michał Woźniak
Kierownik Katedry i Zakładu Chemii Medycznej
Akademii Medycznej w Gdańsku

Gdańsk 2006

Spis treści

1. Skróty	4
2. Wstęp	6
2.1. Dokсорubicyna - charakterystyka leku.....	7
2.2. Objawy niepożądane działania dokсорubicyny	10
2.3. Reaktywne formy tlenu (RFT) i stres oksydacyjny	12
2.4. Błony biologiczne	19
2.5. Oksydacja białek	22
2.6. Peroksydacja lipidów.....	24
2.7. Udział jonów żelaza w reakcjach wolnorodnikowych	27
2.8. Bariera antyoksydacyjna	27
2.9. Syntetyczne aminooksyle	30
2.10. Uzasadnienie wybranych celów pracy	32
3. Cele pracy	35
4. Materiały	36
4.1 Odczynniki chemiczne i bufony	36
4.2. Materiał biologiczny.....	39
4.3. Sprzęt laboratoryjny	39
5. Metody	40
5.1. Izolacja frakcji subkomórkowych	40
5.2. Izolacja błon bakteryjnych	41
5.3. Oznaczanie ilości białka	42
5.4. Oznaczanie poziomu grup karbonylowych	42
5.5. Oznaczanie poziomu MDA + 4-HNE	44
5.6. Synteza aminooksylii.....	45
5.7. Badania <i>in vivo</i> wykonane na zwierzętach	45
5.7.1. Dożylne podanie dokсорubicyny i izolacja frakcji postjądrowej z pobranych serc	45
5.7.2. Dożylne podanie dokсорubicyny i izolacja frakcji mitochondrialnej i mikrosomalnej z pobranych serc	46

5.8. Badania <i>in vitro</i> na frakcjach subkomórkowych izolowanych z serc chomików	47
5.8.1. Inkubacja izolowanych mitochondriów z doksorubicyną.....	47
5.8.2. Inkubacja izolowanych mikrosomów z doksorubicyną	48
5.9. Badania wykonane na komórkach bakterii <i>Escherichia coli</i>	49
5.9.1. Wpływ doksorubicyny na poziom syntezy białka HtrA	49
5.9.2. Inkubacja izolowanych błon bakteryjnych z doksorubicyną	50
5.10. Analiza widm elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR)	51
5.10.1. Analiza widm EPR w badaniach <i>in vitro</i>	51
5.10.2. Analiza widm EPR aromatycznych aminooksyli.....	52
5.11. Analiza statystyczna.....	54
6. Wyniki	55
6.1. Badania <i>in vivo</i>	55
6.1.1. Poziom grup karbonylowych i MDA+4-HNE we frakcji postjądrowej	55
6.1.2. Poziom grup karbonylowych we frakcjach mitochondrialnej i mikrosomalnej.....	57
6.1.3. Poziom MDA+4-HNE we frakcjach mitochondrialnej i mikrosomalnej.....	58
6.2. Badania <i>in vitro</i> na frakcjach subkomórkowych izolowanych z serc . chomików	59
6.2.1. Poziom grup karbonylowych i MDA+4-HNE w mitochondriach	59
6.2.2. Poziom grup karbonylowych i MDA+4-HNE w mikrosomach..	61
6.3. Badania na bakteriach <i>E. coli</i> B178	63
6.3.1. Indukcja syntezy białka HtrA pod wpływem doksorubicyny....	63
6.3.2. Utlenianie białek błon bakteryjnych pod wpływem doksorubicyny	64
6.4. Analiza widm EPR w badaniach <i>in vitro</i>	65
6.4.1. Widmo EPR znacznika spinowego związanego z białkami mitochondriów	65

6.4.2.	Widmo EPR znacznika spinowego związanego z białkami mikrosomów	66
6.4.3.	Widmo EPR znacznika spinowego związanego z białkami błon bakteryjnych	67
6.5.	Analiza widm EPR aromatycznych aminooksylii IA C2 i IA C18 ..	68
7.	Dyskusja.....	70
8.	Wnioski	81
9.	Streszczenie	83
10.	Piśmiennictwo.....	85

1. Skróty

BHT	-	3,5-diizobutylo-4-hydroksytoluen
BSA	-	albumina bydlęca
CO	-	grupy karbonylowe (oksydacyjnie zmienionych białek)
DNA	-	kwasy dezoksyrybonukleinowe
2,4-DNPH	-	2,4-dinitrofenylohydrazyna
DOX	-	doksorubicyna
DOX[•]	-	rodnik semichinonowy doksorubicyny
E. coli	-	bakterie <i>Escherichia coli</i>
EPR	-	elektronowy rezonans paramagnetyczny (z ang. electron paramagnetic resonance)
h_s	-	rozszerzona składowa wysokopolowa widma EPR znacznika spinowego
h_w	-	rozszerzona składowa wysokopolowa widma EPR znacznika spinowego
4-HNE	-	4-hydroksy-2-nonenal
H₂O₂	-	nadtlenek wodoru
Hsp	-	białka szoku termicznego (z ang. heat shock proteins)
HtrA	-	białko szoku termicznego bakterii <i>E. coli</i>
IA-C2	-	1,2-dihydro-2-etyl-2fenyl-3H-indol-3-fenylimino-1-oksyl
IA-C18	-	1,2-dihydro-2-oktadecyl-2fenyl-3H-indol-3-fenylimino-1-oksyl
i.p.	-	dootrzewnowo
i.v.	-	dożylnie
m.c.	-	masa ciała
MDA	-	dialdehyd malonowy
3-MSL	-	3-maleimidoproksyl
NaCl	-	chlorek sodu
NADH	-	dinukleotyd nikotynamidoadeninowy (forma zredukowana)
NADPH	-	fosforan dinukleotydu nikotynamidoadeninowego (forma zredukowana)
O₂^{•-}	-	anionorodnik ponadtlenkowy
•OH	-	rodnik hydroksylowy
OD	-	gęstość optyczna (z ang. optical density)

Ph	-	fenyloalanina
RFT	-	reaktywne formy tlenu
RNA	-	kwasy rybonukleinowe
SD	-	błąd standardowy
SEM	-	błąd standardowy średniej
SOD	-	dysmutaza ponadtlenkowa (z ang. superoxide dismutase)
τ_c	-	czas korelacji rotacyjnej znacznika spinowego

2. Wstęp

Kardiotoksyczne działanie leków przeciwnowotworowych, w szczególności antybiotyków antracyklinowych, jest przyczyną poważnych uszkodzeń mięśnia serca, które w skrajnych przypadkach prowadzą nawet do śmierci pacjenta.

Próba wyjaśnienia patomechanizmu kardiotoksyczności dokсорubicyny (DOX) trwa od początku stosowania leku w terapii przeciwnowotworowej, czyli od lat 70 tych. Mimo długoletnich obserwacji i badań nad lekiem, nie udało się jednoznacznie określić patomechanizmu selektywnej toksyczności w stosunku do mięśnia serca. Problem ten jest o tyle ważny, iż mimo pewnych skutków ubocznych działania leku, jest on nadal stosowany klinicznie ze względu na dużą skuteczność w terapii przeciwnowotworowej.

Wybór potencjalnego leku cytoprotekcyjnego jest ściśle związany z określeniem patomechanizmu działania DOX nie tylko na komórki nowotworowe ale i kardiomiocyty.

Dokсорubicyna może powodować uszkodzenie mięśnia serca, które manifestuje się zmianami elektrokardiograficznymi i hemodynamicznymi obserwowanymi w badaniach echokardiograficznych.

W literaturze opisanych zostało wiele hipotez tłumaczących kardiotoksyczny wpływ DOX, ale żadna z nich nie wyjaśnia dostatecznie wielokierunkowych zmian biochemicznych¹ i morfologicznych² zachodzących w sercu.

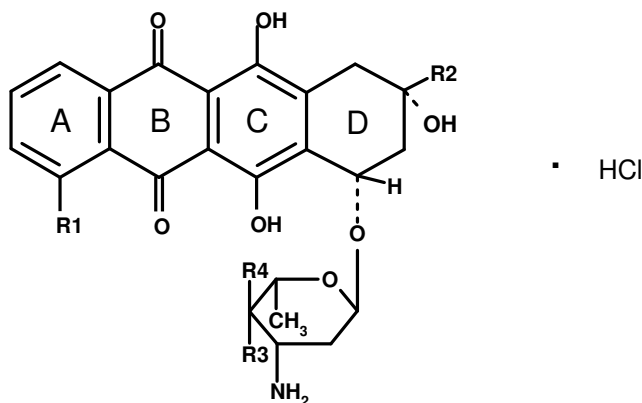
Większość danych doświadczalnych, jak również klinicznych, wskazuje na udział wolnych rodników i reaktywnych form tlenu w patomechanizmie kardiotoksyczności dokсорubicyny. Skutkiem ich działania są zmiany na poziomie lipidów błonowych, mniej uwagi przywiązuje się natomiast do zmian zachodzących w białkach błonowych.

Wolne rodniki i reaktywne formy tlenu (RFT) działają na białka i lipidy błonowe w procesach odpowiednio: oksydacji białek i peroksydacji lipidów. Intensywność tych procesów możemy oceniać na podstawie stężenia końcowych produktów przemian oksydacyjnych białek i peroksydacyjnych lipidów: tj. grup karbonylowych oksydacyjnie zmienionych białek (grup CO) oraz dialdehydu malonowego (MDA) i 4-hydroksy-2-nonenalu (4-HNE), końcowych produktów peroksydacji lipidów.

2.1. Doksorubicyna - charakterystyka leku

Doksorubicyna (DOX) to międzynarodowa nazwa leku cytostatycznego, wyizolowanego po raz pierwszy z kultury bakterii *Streptomyces peucetius* var. *caesius* przez Arcamone a zarejestrowanego jako lek w 1971 roku³. W literaturze funkcjonuje również pod handlową nazwą: adriamycyna.

Jest to związek chemiczny z grupy antybiotyków antracyklinowych zbudowany z naftacenochinonu (tetrahydrotetracenu) połączonego przy 7 atomie węgla pierścienia D wiązaniem glikozydowym z aminocukrem, daunozaminą (Rycina 1). Wiązanie glikozydowe stosunkowo łatwo ulega hydrolizie w warunkach *in vivo* oraz *in vitro*. W zależności od podstawników R1, R2, R3, R4 w grupie antybiotyków antracyklinowych wyróżniamy szereg podobnych pochodnych związków ale o różnym spektrum aktywności, wśród których DOX wykazuje najwyższą aktywność przeciwnowotworową⁴. W cząsteczce doksorubicyny występują odpowiednio podstawniki R1-OCH₃, R2-COCH₂OH, R3-OH i R4-H a nazwa chemiczna leku to: chlorowodorek 10-[(3-amino-2,3,6-trideoksy- α -L-liksoheksopiranozylo)-oksy]-7,8,9,10-tetrahydro-6,8,11-trihydroksy-8-(hydroksyacetylo)-1-metoksy-5,12-naftaceno-dionu, (C₂₇H₂₉NO₁₁•HCl), masa molowa 580.

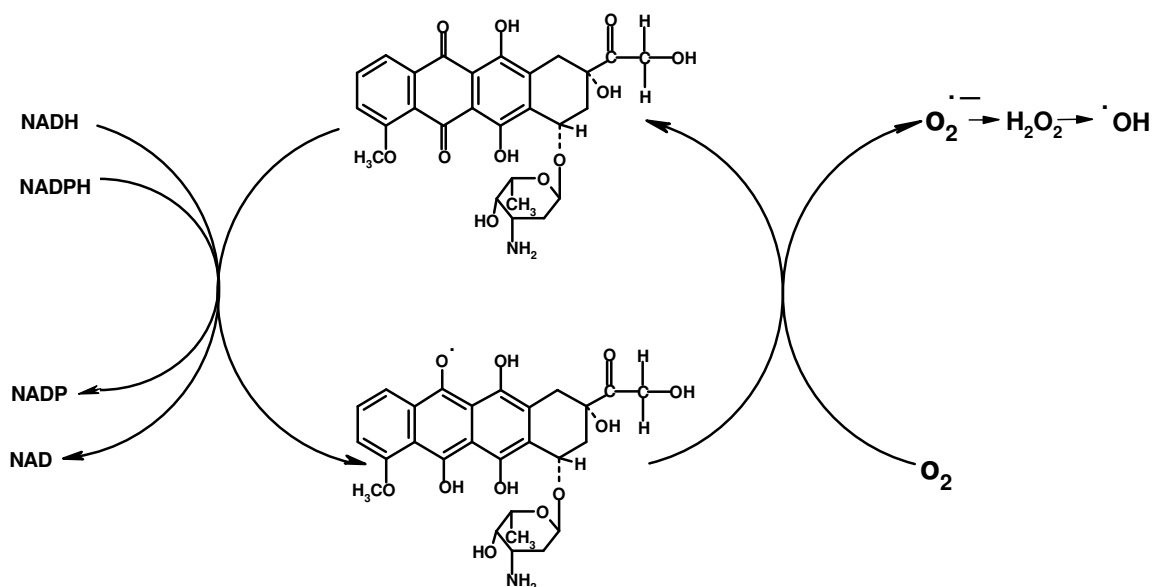


Nazwa	R1	R2	R3	R4
doksorubicyna	OCH ₃	COCH ₂ OH	OH	H
daunorubicyna	OCH ₃	COCH ₃	OH	H
epirubicyna	OCH ₃	COCH ₂ OH	H	OH
idarubicyna	H	COCH ₃	H	OH
karminomycyna	OH	COCH ₃	OH	H

Rycina 1. Struktury chemiczne wybranych antybiotyków antracyklinowych.

Wszystkie przedstawione powyżej związki mają w strukturze cząsteczki ugrupowanie chinonowe, z obecności którego wynikają własności utleniająco-redukujące.

W wyniku przyłączenia jednego elektronu do cząsteczki dokсорubicyny (reakcja niecałkowitej redukcji DOX) powstaje rodnik semichinonowy dokсорubicyny (DOX^{\bullet}) (Rycina 2), który reagując z tlenem cząsteczkowym ulega utlenieniu do wyjściowej formy chinonowej dokсорubicyny. Z kolei tlen cząsteczkowy przyjmując niesparowany elektron przechodzi w anionorodnik ponadtlenkowy, $\text{O}_2^{\bullet-}$, a dalej w H_2O_2 , w reakcji katalizowanej przez dysmutazę ponadtlenkową (SOD) bądź w wyniku spontanicznej reakcji dysmutacji⁵. H_2O_2 może być źródłem rodnika hydroksylogowego ($\bullet\text{OH}$), który jest najbardziej reaktywny spośród wolnych rodników tlenowych. DOX może działać jak akceptor elektronów, sama ulegając przy tym jednoelektronowej redukcji, w reakcji katalizowanej przez: mitochondrialną dehydrogenazę NADH-zależną⁶ i reduktazę NADPH-cytochrom P450⁷ oraz endotelialną izoformę syntazy tlenku azotu^{8,9}.



Rycina 2. Reakcja jednoelektronowej redukcji dokсорubicyny.

Miejsce cyklu redox DOX w mitochondriach zlokalizowane jest w kompleksie I łańcucha transportu elektronów^{10, 11}.

Całkowita redukcja chinonu do hydrochinonu jest reakcją odwracalną, przebiega dwuetapowo i wymaga przyłączenia 2 elektronów.

Zastosowanie dokсорubicyny

DOX stosowana jest w terapii przeciwnowotworowej od roku 1971³, zarówno u dorosłych¹² jak i dzieci^{13, 14}. Obecnie stosowana jest w terapii takich nowotworów jak: ostra białaczka limfoblastyczna i mieloblastyczna, chłoniaki ziarnicze i nieziarnicze, szpiczak mnogi, guz Wilmsa, nerwiak zarodkowy współczulny, rak sutka, jajnika, pęcherza moczowego, gruczołu krokowego, jądra, tarczycy, żołądka, wątroby, drobnokomórkowy rak płuca, guz Ewinga i mięsaki kościopochodne. Najczęściej stosowana jest z innymi lekami przeciwnowotworowymi, odpowiednimi dla danego rodzaju nowotworu, w rzadkich przypadkach raka sutka również w monoterapii¹⁵.

Przeciwnowotworowa aktywność leku wynika ze zdolności wiązania się z kwasem deoksyrybonukleinowym, co hamuje syntezę kwasów nukleinowych. DOX wbudowuje się pomiędzy pary zasad podwójnej nici kwasu DNA, hamuje aktywność topoisomerazy II^{16, 17}, polimeraz DNA i RNA¹⁸, helikaz oraz enzymów naprawiających uszkodzenia DNA¹⁹. DOX uniemożliwia w ten sposób replikację i transkrypcję²⁰, co hamuje proliferację komórek, zatrzymując je w fazie G2/M cyklu komórkowego²¹.

Transport

W znacznej większości przypadków dokсорubicyna podawana jest dożylnie. W rzadkich przypadkach może być również podana dotętniczo, bezpośrednio do guza²², dopęcherzowo w przypadku raka pęcherza moczowego²³, dootrzewnowo np. w przypadku raka jajnika²⁴ czy doopłucnowo w rozsiałym międzybłoniaku złośliwym opłucnej²⁵. W przypadku zwierząt laboratoryjnych dokсорubicyna podawana jest zarówno dożylnie jak i dootrzewnowo.

Po podaniu dożylnym jak i dootrzewnowym, dokсорubicyna szybko pojawia się w krwi, gdzie osiąga wysokie stężenie. Stężenie DOX w surowicy krwi człowieka wynosi od 1 μM do 5 μM^{26, 27}, a różnice stężeń wynikają z tego czy lek jest podany we wlewie ciągłym czy w pojedynczym wstrzyknięciu. Z surowicy krwi szybko wnika do komórek, w tym sercowych, w których osiąga 40 krotnie wyższe stężenie niż stężenie w krwi²⁸. DOX wykazuje szczególne powinowactwo do jądra komórkowego, 60 % całkowitej wewnątrzkomórkowej ilości podanego leku znajduje się w jądrze komórkowym²⁹. DOX nie przenika przez barierę krew-mózg¹². Dokładny mechanizm transportu leku do komórek nie do końca jest poznany. Z literatury wiadomo, że dokсорubicyna wnika do komórek na zasadzie dyfuzji biernej. W cytoplazmie łączy się ze specyficznym translokatorem: proteasomem, który jest multikatalitycznym kompleksem proteinaz³⁰. Jako kompleks

doksorubicyna-proteasom wnika do jądra komórkowego, a proces ten jest zależny od ATP³¹.

Metabolizm

Doksorubicyna jest metabolizowana głównie w wątrobie, do 13-hydroksyl doksorubicyny (doksorubicynol)³², związku, który jest głównym metabolitem leku oraz do aglikonów: doksorubicynonu i 7-deoksydoksorubicynonu¹². Około 40-50 % dawki leku wydalą się z żółcią, z czego 42 % w postaci niezmienionej, 22 % jako doksorubicynol oraz 36 % w postaci innych metabolitów.

Reakcja dwuelektronowej redukcji grupy karbonylowej przy węglu C13 doksorubicyny (podstawnik R2 Rycina 1), w wyniku, której powstaje doksorubicynol, katalizowana jest przez cytoplazmatyczną aldoketoreduktazę NADPH-zależną, obecną we wszystkich komórkach i tkankach, np. w krwinkach czerwonych, wątrobie i nerkach³³, również w sercu³². Główny metabolit doksorubicyny, doksorubicynol, ma własności kardiotoksyczne³⁴.

2.2. Objawy niepożądane działania doksorubicyny

Doksorubicyna, podobnie jak inne leki cytostatyczne, wywołuje objawy niepożądane takie jak mielosupresja, zaburzenia żołądkowo-jelitowe (nudności, wymioty) i wypadanie włosów, które wynikają z uszkodzenia komórek szybko proliferujących; szpiku kostnego, błony śluzowej przewodu pokarmowego oraz mieszków włosowych. Pod wpływem DOX zmianie ulega lipidogram surowicy krwi³⁵ oraz uszkodzeniu ulegają nerki^{36, 37, 38, 39}. Objawem, na który zwraca się szczególną uwagę podczas terapii doksorubicyną jest kardiotoksyczność, charakterystyczna dla grupy antybiotyków antracyklinowych, wśród których DOX wywołuje najwięcej objawów ze strony serca, co limituje jej zastosowanie⁴⁰. Jednakże ze względu na swoją skuteczność przeciwnowotworową jest nadal stosowana w terapii nowotworów. Trwają badania nad wyjaśnieniem mechanizmów uszkodzenia serca w celu określenia skutecznej, selektywnej metody zapobiegania skutkom ubocznym doksorubicyny, bez zmiany aktywności przeciwnowotworowej.

Podczas terapii obserwuje się zmiany rejestrowane w badaniu elektrokardiograficznym czy echokardiograficznym, wynikające z bezpośredniego działania

farmakologicznego na serce oraz zmiany morfologiczne oceniane na podstawie preparatów mikroskopowych.

Wpływ dokсорubicyny na układ sercowo-naczyniowy widoczny jest u niektórych pacjentów już w trakcie podawania leku, m.in. pod postacią hypotonii, tachykardii i zmian w elektrokardiogramie, chociaż często są to objawy przemijające.

Ze względu na moment pojawienia się objawów ubocznych wynikających z toksycznego działania leku na układ sercowo-naczyniowy, można przyjąć podział na objawy wczesne (od początku podawania leku do około 2 miesięcy po zakończeniu terapii) i objawy późne. Objawy wczesne to hypotonia, tachykardia, zapalenie osierdzia i niespecyficzne zmiany w zapisie EKG dotyczące odcinka ST, redukcji woltażu zespołu QRS i wydłużenia odstępu QT^{41, 42, 43}. Opisywano również przypadki nagłej śmierci w trakcie podawania leku⁴⁴.

Objawy późne ze strony serca, związane są raczej z osiągnięciem dawki kumulacyjnej, co prowadzi do niewydolności serca, związanej ze zmniejszeniem frakcji wyrzutowej lewej komory serca, nawet po 4 latach od początku chemioterapii⁴⁵, bywa że po 20 latach⁴⁶ od ostatniego cyklu chemioterapii. W skrajnych przypadkach odpornej na leczenie niewydolności serca konieczna jest transplantacja serca⁴⁷. Istnieje jednak indywidualna wrażliwość pacjenta na lek, a objawy kardiotoxyczności niekoniecznie muszą wynikać z osiągnięcia dawki kumulacyjnej. Dawka kumulacyjna może być nawet niższa u pacjentów z grupy podwyższonego ryzyka: zaawansowany wiek, przebyta radioterapia⁴⁸, współtowarzysząca chemioterapia⁴⁹ i u pacjentów z wcześniejszym uszkodzeniem serca w innym mechanizmie.

Pierwszymi, którzy skojarzyli związek między kardiotoxycznością a dawką kumulacyjną byli Gottlieb⁵⁰ i Lefrak⁵¹, którzy zaproponowali w 1973 roku dawkę kumulacyjną nieprzekraczającą 550 mg/m² powierzchni ciała jako taką, która wywołuje uszkodzenie serca o częstości procentowej w akceptowalnym zakresie. Dawka kumulacyjna nie powinna przekraczać 550 mg/m² powierzchni ciała. Ryzyko wystąpienia niewydolności serca w przypadku dawki kumulacyjnej 500-550 mg/m² wynosi od 4 % do 7 %⁵², wzrasta jednak znacznie do 18 % przy dawce 551-600 mg/m², a powyżej 600 mg/m² do 36 %⁵³.

Decyzja o rozpoczęciu leczenia dokсорubicyną powinna być poprzedzona badaniami: elektrokardiograficznym oraz echokardiograficznym z oceną funkcji lewej komory serca⁵⁴. Konieczne jest również monitorowanie czynności mięśnia serca w trakcie leczenia.

2.3. Reaktywne formy tlenu (RFT) i stres oksydacyjny

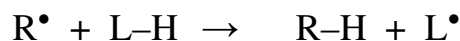
Wolny rodnik (ang. free radical) to atom lub cząsteczka zdolne do samodzielnego istnienia mające jeden lub więcej niesparowanych elektronów.

Wolne rodniki tlenowe to cząsteczki chemiczne zbudowane przynajmniej z jednego atomu tlenu i posiadające jeden lub więcej niesparowanych elektronów, a więc takie które charakteryzują się wyższą reaktywnością niż tlen w stanie podstawowym.

Reaktywne formy tlenu (RFT, ang. skrót ROS, reactive oxygen species), to grupa związków, będących pochodnymi tlenu, do których zalicza się wolne rodniki tlenowe. Jednak nie każdy związek będący RFT jest wolnym rodnikiem. I tak, np. nadtlenek wodoru (H_2O_2), należy do grupy RFT, a nie jest wolnym rodnikiem, ponieważ nie posiada niesparowanego elektronu na powłoce walencyjnej.

Zarówno wolne rodniki jak i RFT cechują się wysoką reaktywnością i wchodzą w reakcje z wieloma różnymi cząsteczkami. Dążą w ten sposób do pozbycia się nadmiernego elektronu, oddając go innej cząsteczce, (działając jak reduktor) lub przyłączają dodatkowy elektron od innej cząsteczki, (działając jak utleniacz).

Wolne rodniki powstają najczęściej w wyniku oderwania atomu wodoru od cząsteczki wg schematu:



Nazwa polska	Nazwa angielska	struktura
tlen singletowy	singlet oxygen	1O_2
ozon	ozone	O_3
rodnik wodoronadtlenkowy	hydroperoxyl radical	HO_2^{\bullet}
anionorodnik ponadtlenkowy	superoxide radical anion	$O_2^{\bullet-}$
nadtlenek wodoru	hydrogen peroxide	H_2O_2
rodnik hydroksylowy	hydroxyl radical	$^{\bullet}OH$

Rycina 3. Reaktywne formy tlenu i formy pokrewne.

RFT powstają w komórkach, w których zachodzą przemiany metaboliczne z udziałem tlenu. Tlen tak niezbędny do życia organizmom tlenowym, może w niektórych warunkach być dla nich szkodliwy. Organizmy tlenowe (aerobowe), w tym człowiek, przystosowały się do stężenia tlenu atmosferycznego. Podwyższone stężenie w powietrzu wdychanym niekorzystnie wpływa na organizm człowieka^{55, 56}, szczególnie narażone są płuca, w których może dochodzić do uszkodzenia pęcherzyków płucnych. Tlen w stężeniu wyższym niż atmosferyczne również niekorzystnie wpływa na narząd wzroku oraz układ nerwowy⁵⁷. Ponowny dopływ tlenu po wcześniejszym niedokrwieniu i niedotlenieniu serca, tzw. reoksygenacja, jest również toksyczny dla serca^{58,59}.

Toksyczność tlenu związana jest z tworzeniem wolnych rodników tlenowych, co jako pierwsi wykazali w 1954 roku Gershan Rebecca i Gilbert Daniel⁶⁰, a w latach późniejszych Fridovich sformułował „ponadtlenkową teorię toksyczności tlenu”^{61, 62}. Niekiedy podwyższone stężenie tlenu stosowane jest w terapii np. leczeniu zgorzeli gazowej czy w zatruciu tlenkiem węgla^{63, 64}. Tlenoterapia wskazana u przedwczesnie urodzonych noworodków jest przyczyną podwyższonego ryzyka zachorowania na retinopatię, dysplazję oskrzelowo-płucną, krwawienia dokomorowe i martwicze zapalenie jelit⁶⁵.

RFT są rozpowszechnione w środowisku człowieka, występują zarówno w wodzie jak i powietrzu. Powstają w wyniku działania zewnętrznych czynników takich jak promieniowanie jonizujące, promieniowanie nadfioletowe i ultradźwięki. Wewnątrz komórek RFT powstają w wyniku utleniania zredukowanych form niskocząsteczkowych składników komórek, utleniania białek oddechowych, ksenobiotyków, w tym leków, oraz w wyniku reakcji enzymatycznych.

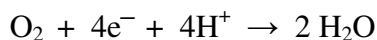
Powstawanie RFT wykazano w komórkach wątroby⁶⁶, serca⁶⁷, nerek⁶⁸, płuc⁶⁹, śledziony⁶⁹ i krwinkach czerwonych⁷⁰. Tak więc RFT powstają niemal we wszystkich komórkach organizmu człowieka i to zarówno w fizjologii jak i patologii. Przypisuje się im znaczenie w patogenezie wielu chorób⁷¹.

Komórkowe źródła RFT to:

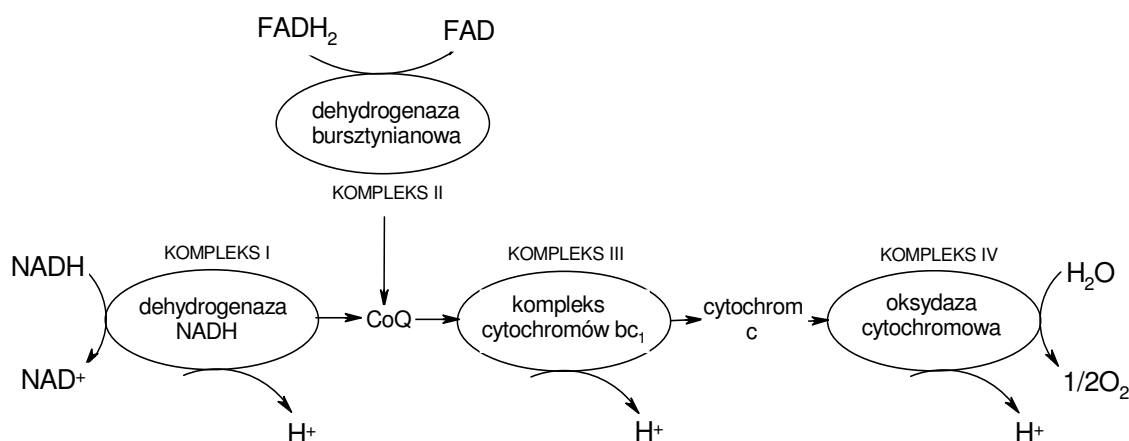
A/ Mitochondrialny łańcuch transportu elektronów (łańcuch oddechowy), to najważniejsze źródło RFT w organizmie człowieka

W prawidłowych warunkach głównym źródłem rodników tlenowych są procesy oddechowe komórki. Mitochondria to organella komórkowe występujące we wszystkich komórkach eukariotycznych z wyjątkiem erytrocytów. Przy udziale mitochondriów jedna

cząsteczka tlenu ulega całkowitej, czteroelektronowej redukcji w reakcji katalizowanej przez oksydazę cytochromową a produktem reakcji są 2 cząsteczki wody:

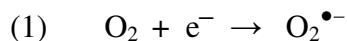


Przeniesienie elektronów na tlen odbywa się przy udziale mitochondrialnego łańcucha transportu elektronów zwanego łańcuchem oddechowym. W skład łańcucha wchodzi cztery kompleksy enzymatyczne (kompleks I, II, III i IV) zlokalizowane w wewnętrznej błonie mitochondrialnej i sprzężone z syntazą ATP, przy udziale której odbywa się synteza wysokoenergetycznego związku ATP. Proces ten nazywany jest fosforylacją oksydacyjną.

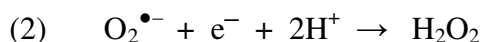


Rycina 4. Mitochondrialny łańcuch oddechowy.

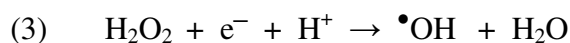
Tlen cząsteczkowy zdolny jest do jednoelektronowej redukcji tzn. przyłączenia dodatkowego elektronu, w wyniku czego powstaje anionorodnik nadadtlenkowy: $\text{O}_2^{\bullet-}$



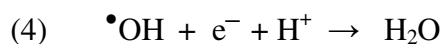
przyłączenie kolejnego elektronu prowadzi do powstania nadtlenu wodoru: H_2O_2



przyłączenie trzeciego elektronu prowadzi do powstania rodnika hydroksylowego: $\bullet\text{OH}$



przyłączenie czwartego elektronu (całkowita redukcja cząsteczki tlenu) prowadzi do powstania wody



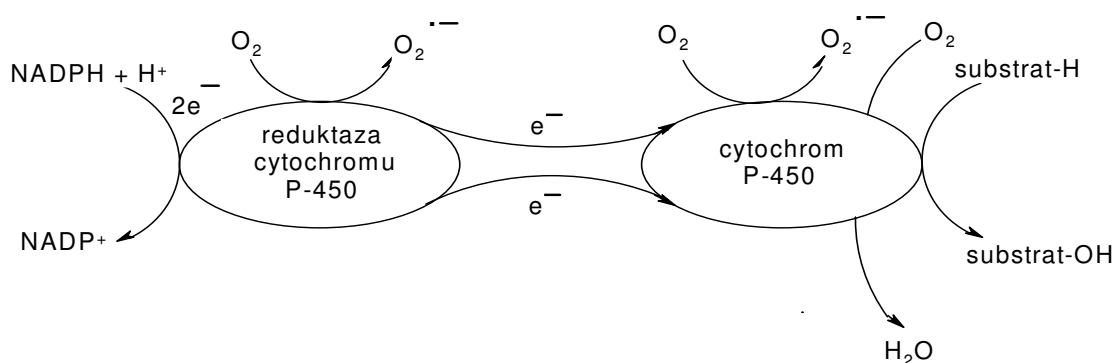
Reakcje jednoelektronowej, dwuelektronowej i trójelektronowej redukcji tlenu są reakcjami niecałkowitej redukcji tlenu. Zakłada się, że w sprawnych czynnościowo mitochondriach 3-5 %⁷² tlenu ulega niecałkowitej redukcji z wytworzeniem wolnych rodników⁷³. Produktami niecałkowitej redukcji cząsteczki tlenu są: anionorodnik ponadtlenkowy (1), rodnik hydroksylowy (3) oraz nadrtlenek wodoru (2).

B/ Mikrosomalny łańcuch transportu elektronów

Mikrosomalny łańcuch transportu elektronów odgrywa główną rolę w biotransformacji ksenobiotyków. Ksenobiotyki, wśród których dużą część stanowią leki (w tym doksorubicyna), metabolizowane są głównie w mikrosomach hepatocytów. Cytochrom P-450 wchodzi w skład w/w łańcucha i katalizuje hydroksylację substratu (S-H), a produktem jest cząsteczka z grupą hydroksylową -OH (S-OH), zgodnie z ogólną reakcją:



W trakcie transportu elektronów przez mikrosomalny łańcuch transportu elektronów dochodzi do reakcji niecałkowitej redukcji cząsteczki tlenu i powstają RFT (Rycina 5).



Rycina 5. Mikrosomalny układ transportu elektronów.

C/ Reakcje w których tlen uczestniczy jako substrat, katalizowane przez np. następujące enzymy:

oksydaza ksantynowa, lipooksygenaza, cyklooksygenaza⁷⁴

D/ Mechanizm autooksydacji związków biologicznie czynnych

np.: askorbinianu⁷⁵, katecholamin^{76, 77}

W wyniku reakcji związków niskocząsteczkowych z tlenem powstają rodniki tych związków (\bullet RH) oraz anionorodnik ponadtlenkowy. Reakcje te przyjęło się nazywać reakcjami samoutleniania (z ang. autoxidation), co nie jest do końca prawdą, ponieważ związek niskocząsteczkowy utleniany jest przez tlen, zgodnie z równaniem reakcji:



Szybkość reakcji zwiększają jony metali przejściowych.

E/ Enzymy występujące w peroksysomach

Oksydazy, m.in. D-aminokwasowa, α -hydroksykwasowa, acylokoenzymu A, glikolanowa oraz moczanowa⁷⁸, katalizują reakcje w których powstaje H_2O_2 . Oksydaza ksantynowa⁷⁹, która prowadzi do powstania $\text{O}_2^{\bullet-}$. Dodatkowym źródłem anionorodnika ponadtlenkowego jest łańcuch transportu elektronów zlokalizowany w błonie peroksysomów⁸⁰. Peroksysomy są głównym źródłem nadtlenku wodoru powstającego w komórce, ale jego przenikanie do cytozolu jest znikome ze względu na działanie katalazy wewnątrz peroksysomów.

Wymienione powyżej źródła komórkowe są przyczyną powstania niżej wymienionych reaktywnych form tlenu:

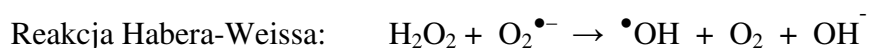
Anionorodnik ponadtlenkowy $\text{O}_2^{\bullet-}$

Jest produktem jednoelektronowej redukcji cząsteczki tlenu, a jego źródłem jest głównie łańcuch oddechowy⁸¹. Fizjologicznie człowiek narażony jest na 10^{10} cząsteczek anionorodnika każdego dnia⁸². Spośród wszystkich RFT, anionorodnik ponadtlenkowy wytwarzany jest w największych ilościach a łańcuch oddechowy jest jego najistotniejszym źródłem. Za tworzenie $\text{O}_2^{\bullet-}$ odpowiedzialne są głównie kompleksy I i III mitochondrialnego

łańcucha transportu elektronów^{5, 83}. W znacznie mniejszych ilościach powstaje w mikrosomach⁸⁴ i jądrze komórkowym⁸⁵. Anionorodnik ponadtlenkowy jest stosunkowo mało reaktywny, charakteryzuje się długim czasem półtrwania, ale ma zdolność dyfundowania do odległych struktur komórkowych i jest prekursorem bardziej reaktywnego rodnika hydroksylogowego.

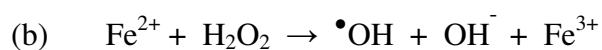
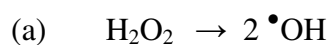
Rodnik hydroksylogowy •OH

Najbardziej reaktywny spośród wszystkich rodników tlenowych, występujących w układach biologicznych. Może powstać w reakcji Habera-Weissa z anionorodnika ponadtlenkowego i nadtlenu wodoru, ale reakcją o znaczeniu fizjologicznym, w której powstaje ten rodnik jest reakcja Fentona (reakcja b, poniżej).



Nadtlenek wodoru H₂O₂

Nie jest wolnym rodnikiem ale jest reaktywną formą tlenu. W porównaniu z anionorodnikiem ponadtlenkowym, jest lepszym utleniaczem, gorszym reduktorem a jego reaktywność jest niższa. Łatwo przenika przez błony komórkowe i może utleniać cząsteczki biologiczne: lipidy, kwasy nukleinowe, białka i węglowodany⁸⁶. Jego reaktywność wzrasta w wyniku konwersji do rodnika hydroksylogowego •OH, np. po ekspozycji na promieniowanie ultrafioletowe (a) lub w wyniku reakcji z jonami metali przejściowych (b) (reakcja Fentona), z których największe znaczenie fizjologiczne mają jony żelaza.



Nadtlenek wodoru, jako reaktywna dyfundująca w komórkach forma tlenu, wykazuje zdolność do bezpośredniego utlenienia reszty cysteiny zlokalizowanej w centrum katalitycznym fosfataz fosfotyrozynowych do formy sulfonowej cysteiny, co powoduje odwracalną inhibicję aktywności enzymatycznej⁸⁷. Sygnalizacja komórkowa związana z hamowaniem aktywności fosfatazy tyrozynowej białek PT B-1B przez insulinę, okazuje się zależna od przejściowej akumulacji H₂O₂ i jest również procesem odwracalnym⁸⁸.

RFT i wolne rodniki charakteryzują się dużą reaktywnością i mogą reagować ze wszystkimi składnikami komórkowymi; białkami, lipidami, węglowodanami, kwasami nukleinowymi DNA i RNA oraz związkami niskocząsteczkowymi. Wynikiem tych reakcji są modyfikacje wyżej wymienionych biomolekuł i zmiany w funkcjonowaniu komórek, prowadzące niekiedy do ich uszkodzenia a nawet śmierci komórki.

Reakcje wolnorodnikowe mają swój udział w patogenezie wielu chorób, np. w chorobie Alzheimera⁸⁹, chorobie Parkinsona, cukrzycy, ostrym zapaleniu trzustki⁹⁰, stwardnieniu rozsianym i we wszystkich innych chorobach, w których występują procesy zapalne, jak np. reumatoidalnym zapaleniu stawów⁹¹ czy zapaleniu jelit⁹². Szczególnie wnikliwie udokumentowano znaczenie RFT w chorobach serca⁹³. Stres oksydacyjny indukuje również wieloetapowy proces karcinogenezy (inicjacji, promocji i progresji)⁹⁴.

Stres oksydacyjny jest pojęciem oznaczającym zachwianie równowagi między ilością produkowanych RFT a aktywnością bariery antyoksydacyjnej komórki lub tkanki.

Stres oksydacyjny odgrywa rolę w patofizjologii serca⁷², m.in. w mechanizmie kardiotoxyczności indukowanej ksenobiotykami⁹⁵. Eksperymenty wykazały, że stres oksydacyjny wpływa zarówno na strukturę jak i funkcję serca⁹⁶.

W uszkodzeniu mięśnia serca o podłożu wolnorodnikowym szczególne znaczenie odgrywają mitochondria, jako główne źródło RFT. Z drugiej strony, skurczowa czynność serca wymaga dużej aktywności metabolicznej i znacznych ilości związków wysokoenergetycznych (ATP) produkowanych w mitochondriach. Podczas przepływu elektronów w mitochondrialnym łańcuchu transportu elektronów następuje synteza ATP ale i generacja RFT.

W komórkach bakteryjnych stres oksydacyjny indukuje ekspresję szeregu genów, w tym genów kodujących białka szoku termicznego (Hsp). Należą do nich białka opiekuńcze (czaperonowe) oraz proteazy, które degradują oksydacyjnie zmodyfikowane białka⁹⁷. W komórkach bakterii m.in. *Escherichia coli*, w zależności od lokalizacji komórkowej wyróżniamy proteazy cytoplazmatyczne oraz periplazmatyczne, których przykładem jest HtrA⁹⁸. Nadekspresję białek szoku termicznego wykazano w komórkach nowotworowych⁹⁹,¹⁰⁰, a wzrost ekspresji białka Hsp70 miał miejsce po indukcji doksorubicyną¹⁰¹.

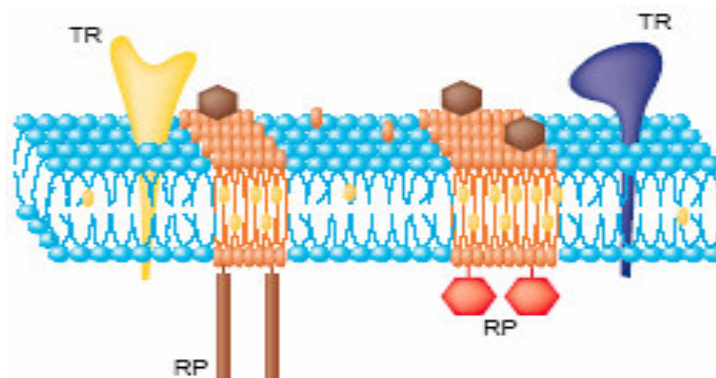
2.4. Błony biologiczne




Błony biologiczne stanowią ważny element strukturalny i funkcjonalny komórek. Błona otaczająca cytoplazmę komórki, która oddziela środowisko zewnętrzne od wewnętrznego i stanowi główną barierę osmotyczną, to błona komórkowa (zwana również plazmatyczną). W cytoplazmie każdej komórki znajduje się wiele błon wewnątrzkomórkowych, które stanowią integralną część organelli komórkowych, takich jak: jądro komórkowe, mitochondria, retikulum endoplazmatyczne, aparat Golgiego, lizosomy, peroksyosomy.

Błony wewnątrzkomórkowe tworzą przedziały komórkowe, tzw. kompartmenty, rozdzielające produkty od substratów i ułatwiają kontrolowanie procesów metabolicznych, które zachodzą jednocześnie w komórce.

Struktura błon, niezależnie od rodzaju komórki i lokalizacji błon w komórce, jest podobna, błony różnią się natomiast składem ilościowym oraz jakościowym poszczególnych składników.

W roku 1935, przez Danielliego i Davsona¹⁰², zaproponowany został model budowy błony komórkowej jako dwuwarstwy lipidowej otoczonej białkami. W 1966 roku Robertson¹⁰³ postawił hipotezę błony elementarnej, która zakładała, iż wszystkie błony zarówno roślinne, zwierzęce oraz mikroorganizmów zbudowane są w ten sam sposób i na podstawie badań w mikroskopie elektronowym przedstawił model asymetrycznego rozmieszczenia białek po obu stronach dwuwarstwy lipidowej¹⁰⁴. W 1972 roku Singer i Nicolson¹⁰⁵ przedstawili płynno-mozaikowy model budowy błony, który z uzupełnieniem o obecność raft lipidowych¹⁰⁶ obowiązuje do chwili obecnej (Rycina 6).



Rycina 6. Model błony biologicznej z raftą lipidową ( - białko z kotwicą glikozylofosfatydyloinozytolową,  - sfingolipid,  - cholesterol, TR-receptor, RP-białko związane z raftą)¹⁰⁷.

Charakterystyczną cechą błony w modelu płynno-mozaikowym jest jej płynność oraz asymetria. Płynność uwarunkowana jest przemieszczaniem się cząsteczek lipidów i białek, natomiast asymetria - nieasymetrycznym rozmieszczeniem poszczególnych rodzajów lipidów oraz białek w dwuwarstwie błony biologicznej. Cząsteczki lipidów mogą obracać się wokół osi prostopadłej do powierzchni błony (dyfuzja rotacyjna) jak i przemieszczać się w jej płaszczyźnie (dyfuzja lateralna). Dyfuzji rotacyjnej i lateralnej ulegają również białka wbudowane w dwuwarstwę błony (białka integralne), chociaż odbywa się to wolniej niż w przypadku lipidów. Tak więc o dynamicznej strukturze błony świadczy nie tylko fakt przemieszczania się lipidów błonowych ale również białek.

W skład błon biologicznych wchodzi lipidy, białka i cukry, składnikiem nieorganicznym jest woda. Lipidy stanowią od 25 do 70 % wszystkich składników a wśród nich najwięcej jest fosfolipidów. Skład lipidowy błon jest charakterystyczny dla danego typu błon biologicznych.

Kardiolipina jest jednym z fosfolipidów błonowych, charakterystycznych dla mitochondriów, podaje się, że procentowa zawartość kardiolipiny w wewnętrznej błonie mitochondrialnej wynosi od 18 %¹⁰⁸ do 20 %¹⁰⁹ wszystkich fosfolipidów. Mikrosomy również zawierają niewielką ilość kardiolipiny, około 12 %¹¹⁰. Kardiolipina występuje również w komórkach prokariotycznych, w błonach plazmatycznych bakterii¹¹¹. W kardiolipinie komórek eukariotycznych przeważają długołańcuchowe nienasycone kwasy tłuszczowe, kwas linolowy (C18;2) stanowi 82 %¹¹², natomiast w komórkach bakteryjnych przewagę stanowią nasycone kwasy tłuszczowe¹¹³, a w miejscu wiązań podwójnych pojawiają się pierścienie cyklopropanu (Rycina 11).

Funkcja kardiolipiny związana jest z utrzymaniem aktywności białek mitochondrialnego łańcucha transportu elektronów: cytochromu c, oksydazy cytochromu oraz translokatora ADP/ATP^{81,114}. Kardiolipina ze względu na zawartość nienasyconych kwasów tłuszczowych w swojej strukturze i lokalizację w wewnętrznej błonie mitochondrialnej, miejscu generacji wolnych rodników, jest szczególnie podatna na proces peroksydacji lipidów, w tym przypadku nienasyconych kwasów tłuszczowych¹¹⁵. Oksydaza cytochromu c katalizuje reakcję przepływu elektronów ze zredukowanej formy cytochromu c na tlen cząsteczkowy. Aktywność oksydazy cytochromu c jest kontrolowana przez różne czynniki, m.in. stan fizykochemiczny fosfolipidów wewnętrznej błony mitochondrialnej¹¹⁶. Dla uzyskania optymalnej aktywności wymagane jest jej specyficzne związanie z kardiolipiną¹¹⁷. Zmiany w strukturze kardiolipiny wiążą się z obniżeniem aktywności oksydazy cytochromu c. RFT powodując peroksydację kardiolipiny mogą pośrednio

powodować obniżenie aktywności oksydazy cytochromu c¹¹⁸. W tym kontekście szczególnie interesującym wydaje się fakt, że doksorubicyna tworzy kompleks z kardiolipiną¹¹⁹ w stosunku molarnym 2:1¹²⁰.

Błony bakterii różnią się od błon komórek eukariotycznych. Przede wszystkim bakterie cechuje brak mitochondriów, retikulum endoplazmatycznego jak również wyodrębnionego jądra komórkowego, a wiele funkcji błon związanych w wymienionych organellami komórkowymi, pełni w bakteriach błona plazmatyczna¹²¹. Wyróżniamy w niej szereg białek o aktywnościach enzymatycznych, m. in. aktywność dehydrogenazy NADH-zależnej¹²². Bakterie *Escherichia coli* należą do bakterii gramujemnych, w których wyróżniamy błonę wewnętrzną oraz zewnętrzną, które oddzielone są przestrzenią periplazmatyczną. W skład błony plazmatycznej bakterii wchodzi kardiolipina, której funkcja związana jest m. in. z utrzymaniem aktywności dehydrogenazy bursztynianowej¹²³ translokatora ADP/ATP¹²⁴ oraz ma znaczenie w przebiegu replikacji¹²⁵.

Błony biologiczne ze względu na skład lipidowy, zawartość reszt nienasyconych kwasów tłuszczowych, są szczególnie podatne na działanie RFT. Wiele czynników prowadzących do zmian fizyko-chemicznych błon, jak RFT czy niektóre leki, mogą zaburzać ich funkcje; np. regulację transportu przezbłonowego, utrzymanie równowagi między środowiskiem zewnątrzkomórkowym a wewnątrzkomórkowym oraz rozdział kompartmentów subkomórkowych, czy też funkcje enzymatyczne lub receptorowe. Jednym z parametrów warunkujących prawidłową strukturę i funkcję błon biologicznych jest ich płynność. W wyniku działania niekorzystnych czynników na błony dochodzi do: spadku płynności błon, większego usztywnienia błon czy wzrostu przepuszczalności błon.

Procesy peroksydacji lipidów i oksydacji białek, które zachodzą w błonach biologicznych pod wpływem RFT, mogą być jednym z czynników odpowiedzialnych za dezintegrację błon.

Błony biologiczne stanowią integralny element komórek, ale mogą być izolowane i stanowić materiał do badań biochemicznych oraz fizyko-chemicznych. Do badania wpływu różnych związków na komórki stosuje się m. in. „świeżo wyizolowane” frakcje subkomórkowe z zachowanymi aktywnościami enzymatycznymi białek.

2.5. Oksydacja białek

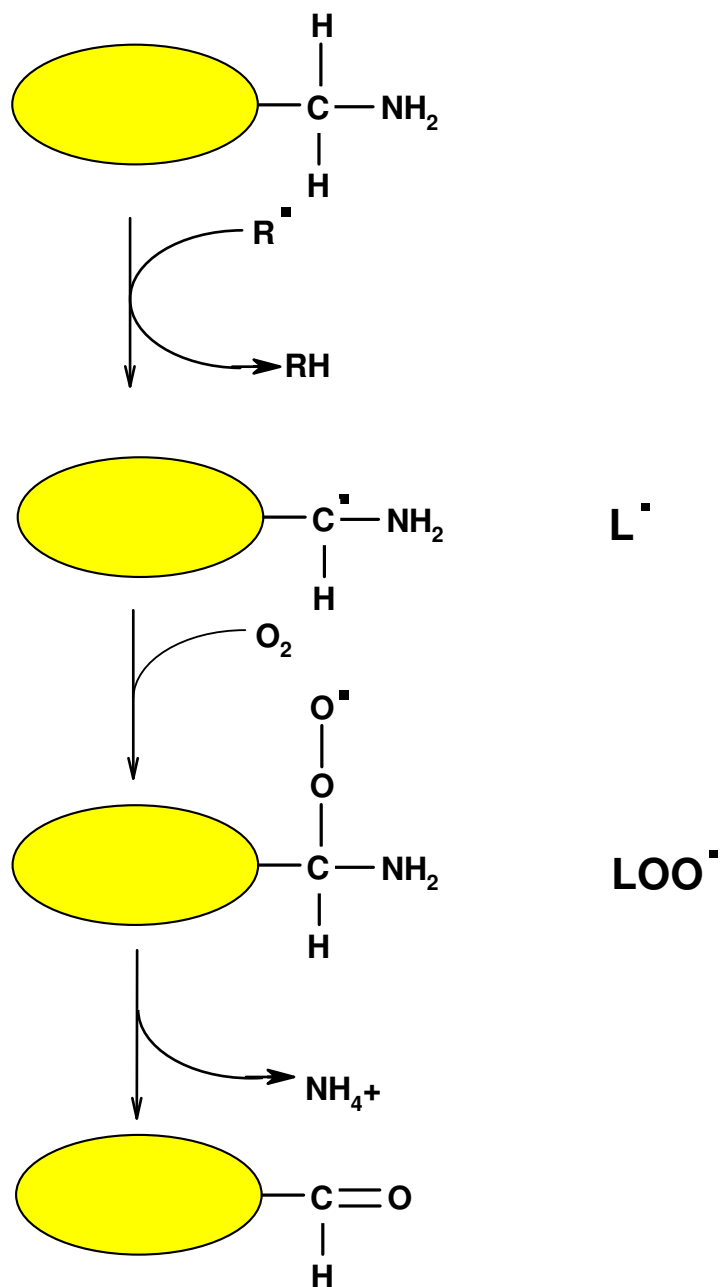
Celem ataku reaktywnych form tlenu mogą być białka zewnątrzkomórkowe i wewnątrzkomórkowe¹²⁶, a oksydacyjne modyfikacje białek przebiegać mogą *in vitro*¹²⁷ i *in vivo*¹²⁸. Wyliczono, że na każde 100 cząsteczek tlenu zużywanych przez przeciętną komórkę organizmu człowieka w stanie spoczynku, jedna cząsteczka tlenu zużywana jest w procesie oksydacji białek¹²⁹.

W wyniku oksydacyjnych modyfikacji dochodzi do zmian ilościowych i jakościowych białek komórkowych¹³⁰, co przejawia się zaburzeniami funkcji określonych rodzajów białek komórkowych. W wyniku oksydacji odpowiednio: białek enzymatycznych następuje obniżenie aktywności enzymów, białek błonowych - zaburzenia integralności błon. Zachowanie integralności błon mitochondrialnych, zewnętrznej i wewnętrznej ma znaczenie dla energetyki serca. Szczególnie ważne jest prawidłowe funkcjonowanie białek mitochondrialnych związanych z wewnętrzną błoną mitochondrialną, tworzących łańcuch oddechowy, ich oksydacyjne modyfikacje¹³¹ mogą nawet prowadzić do śmierci komórek¹³².

Oksydacja białek może być indukowana bezpośrednio przez RFT^{133, 134} lub pośrednio przez związki będące końcowymi produktami stresu oksydacyjnego, węglowodany oraz lipidy¹³⁵. Kończącymi produktami powstającymi w przebiegu peroksydacji lipidów są m.in. aldehydy i hydroksyaldehydy. Największe znaczenie mają: dialdehyd malonowy (MDA) oraz 4-hydrokso-2-nonenal (4-HNE), ponieważ powstają w największej ilości oraz przypisuje się im znaczenie w inicjowaniu procesu oksydacji białek¹³⁶.

Oksydacja białek przebiega wg następującego schematu (Rycina 7):

1. wolny rodnik R^\bullet odszczepia atom wodoru, od atomu węgla łączącego się z wolną grupą aminową, powstaje rodnik alkilowy L^\bullet łańcucha bocznego aminokwasu
2. rodnik L^\bullet reaguje z tlenem cząsteczkowym co prowadzi do powstania rodnika nadtlenkowego, LOO^\bullet
3. LOO^\bullet jako związek nietrwały ulega dekompozycji oraz ulega od niego odszczepieniu jon amonowy NH_4^+ i tworzy się ugrupowanie karbonyłowe (CO).



Rycina 7. Schemat oksydacji białek.

Grupy karbonylowe (CO) aldehydów i ketonów są produktami oksydacji łańcuchów bocznych aminokwasów wchodzących w skład białek¹³⁰, w szczególności prolina, argininy, lizyny, treoniny i tryptofanu^{133, 137}, które należą do aminokwasów najbardziej podatnych na oksydację¹³⁴. W przeciwieństwie do procesu peroksydacji lipidów, oksydacja białek nie ma charakteru reakcji łańcuchowej. Proces oksydacji białek ma miejsce w układach *in vivo*¹³⁸ i *in vitro*¹³⁹, a wzrost poziomu grup karbonylowych obserwuje się w warunkach

stresu oksydacyjnego w obu tych układach, co jako pierwszy opisał Stadtman¹⁴⁰. Oznaczenie grup karbonylowych jest markerem stresu oksydacyjnego¹⁴¹, a jego podwyższony poziom obserwuje w przebiegu wielu chorób¹³⁶ m.in. młodzieńczego idiopatycznego zapalenia stawów⁹¹ czy w przebiegu zapalenia jelit⁹².

Procesy oksydacji białek prowadzą do modyfikacji reszt aminokwasowych, agregacji, wynikającej z tworzenia wiązań krzyżowych, fragmentacji oraz wzrostu wrażliwości zmodyfikowanych białek na proteolizę^{139, 142, 143, 144}.

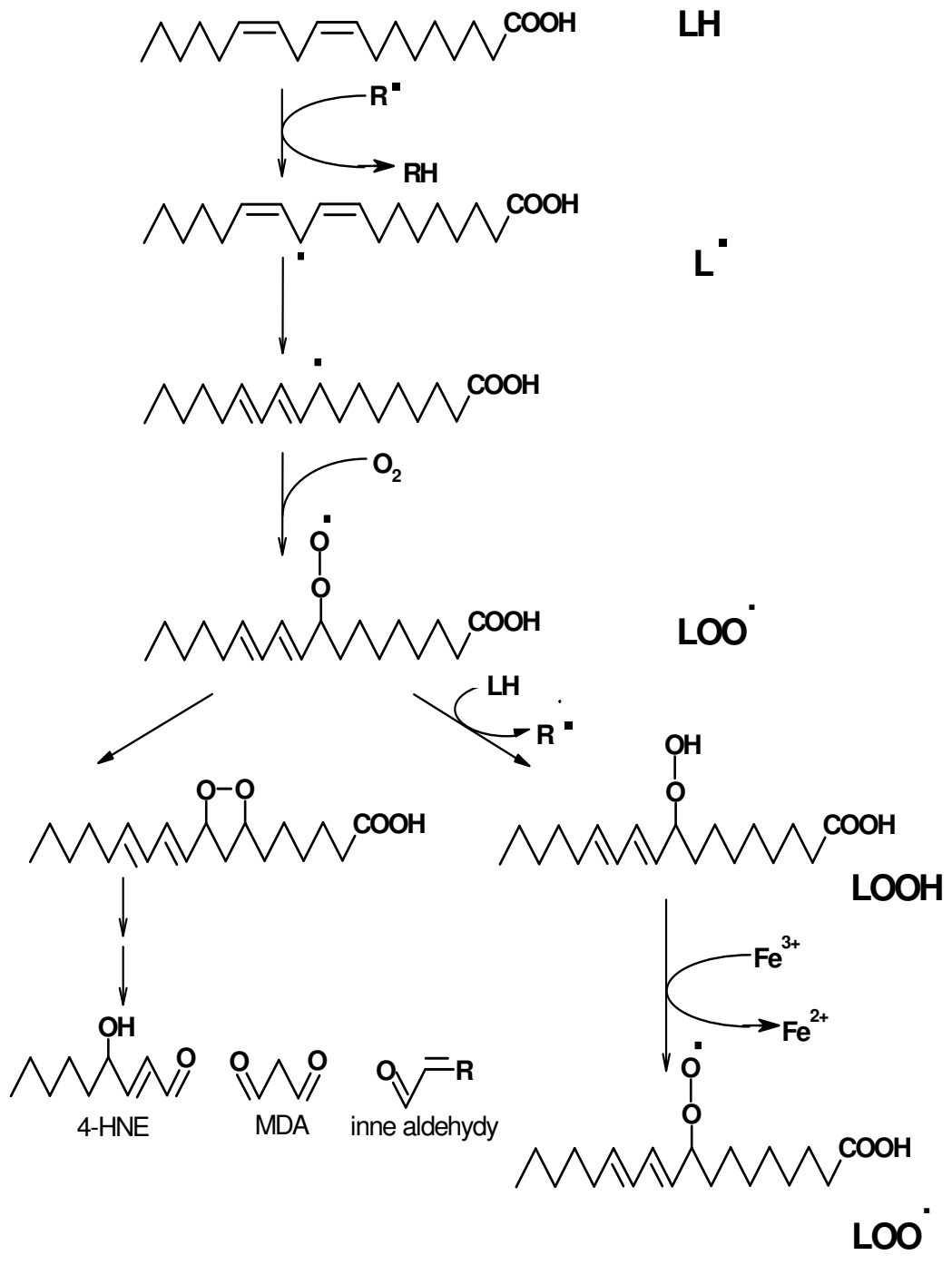
W komórkach ssaków wyróżnia się dwie główne drogi degradacji oksydacyjnie zmodyfikowanych białek: z udziałem enzymów proteolitycznych znajdujących się w lizosomach¹⁴⁵ oraz z udziałem multikatalitycznych kompleksów proteaz zwanych proteasomami^{146, 147}. W komórkach prokariotycznych, w tym bakterii, degradację białek katalizują proteazy należące do białek szoku termicznego (Hsp). Przykładem tego typu białka jest HtrA z bakterii *Escherichia coli*. Dotychczas zidentyfikowano aż cztery homologi białka HtrA^{148, 149} występujące w komórkach człowieka. Są to proteazy, które biorą udział w odpowiedzi na stres oksydacyjny, w regulacji, różnicowaniu i wzroście komórek oraz w procesach związanych z transformacją nowotworową¹⁵⁰.

2.6. Peroksydacja lipidów

Peroksydacja lipidów to cykl reakcji prowadzący do utlenienia i degradacji nienasyconych kwasów tłuszczowych wchodzących w skład lipidów. Wielonienasycone kwasy tłuszczowe (PUFAs z ang. polyunsaturated fatty acids) są szczególnie podatne na utlenianie.

Określenie „peroksydacja” odnosi się do nadtlenu lipidów (z ang. lipid peroxide, lipid hydroperoxide), powstających w przebiegu ciągu reakcji składających się na proces peroksydacji lipidów. Peroksydacja może być procesem enzymatycznym lub przebiegać bez udziału enzymów¹⁵¹. Oba procesy różnią się mechanizmem jednakże efekt końcowy jest podobny, z tą różnicą, że pośrednie produkty peroksydacji w mechanizmie nieenzymatycznym są wysoce reaktywnymi związkami, rodnikami, i mogą atakować kolejne cząsteczki, a reakcje mają charakter łańcuchowy¹⁵².

Utlenianie nienasyconych kwasów tłuszczowych w mechanizmie niezależnym od enzymów przedstawia Rycina 8.



Rycina 8. Schemat peroksydacji lipidów.

Utlenianie nienasyconych kwasów tłuszczowych w mechanizmie niezależnym od enzymów przedstawione na Rycinie 8, przebiega wg następującego schematu:

1. faza inicjacji - wolny rodnik R^\bullet odszczepia atom wodoru, od atomu węgla C sąsiadującego z atomem C tworzącego z kolejnym atomem C wiązanie podwójne nienasyconego kwasu tłuszczowego (LH), w ten sposób powstaje rodnik alkilowy, L^\bullet .
2. faza propagacji - rodnik L^\bullet reaguje z tlenem cząsteczkowym przechodząc w rodnik nadtlenny, LOO^\bullet . Rodnik ten ulega kolejnym przekształceniom, a cykliczny nadtlenek jest jednym z produktów pośrednich, ostatecznie powstają końcowe produkty peroksydacji lipidów, m. in. dialdehyd malonowy (MDA) i 4-hydroksy-2-nonenal (4-HNE). Rodnik LOO^\bullet może też reagować z kolejną cząsteczką nienasyconego kwasu tłuszczowego, tworząc wodoronadtlenek kwasu tłuszczowego (LOOH).

W procesie peroksydacji lipidów uczestniczą również jony żelaza. W wyniku reakcji LOOH z jonami Fe^{3+} powstaje rodnik LOO^\bullet .

3. faza terminacji – na tym etapie reagują ze sobą związki, które są rodnikami, natomiast produktami są związki, które nie mają charakteru rodnikowego.

W wyniku przemian końcowych produktów powstających w procesie peroksydacji lipidów powstają alkany, aleny i alkadieny. Najbardziej istotnymi końcowymi produktami powstającymi z nienasyconych kwasów tłuszczowych w procesie peroksydacji lipidów w największych ilościach są dialdehyd malonowy (MDA) oraz 4-hydroksy-2-nonenal (4-HNE). Oznaczenie ilościowe tych związków m.in. metodą kolorymetryczną jest jedną z metod wykorzystywanych do oceny stopnia peroksydacji lipidów.

Peroksydacja lipidów jest jednym z głównych mechanizmów toksyczności RFT. Szczególnie wrażliwe są błony biologiczne, ze względu na zawartość nienasyconych kwasów tłuszczowych, a proces peroksydacji przebiega w warunkach *in vivo* jak i *in vitro*. Peroksydacja lipidów jest przyczyną wielu chorób. m.in. chorób serca¹⁵³.

Dokсорubicyna może również indukować peroksydację błon biologicznych komórek, przy czym szczególną uwagę zwraca się na proces peroksydacji lipidów przebiegający w komórkach mięśnia serca, który może być jedną z przyczyn kardiotoxyczności dokсорubicyny^{154, 155}.

2.7. Udział jonów żelaza w reakcjach wolnorodnikowych

Żelazo jest jednym z metali przejściowych uczestniczącym w reakcjach wolnorodnikowych. Występujące w organizmie człowieka żelazo związane jest z białkami takimi jak: hemoglobina, mioglobina, enzymy (np. cytochrom c), transferyna, ferrytyna, hemosyderyna. Najwięcej, bo aż 65 % całkowitej ilości żelaza, w ustroju związane jest z hemoglobiną, mniej (30 %) z ferrytyną¹⁵⁶. Duże ilości ferrytyny znajdują się w wątrobie, śledzionie, szpiku kostnym, nerkach, sercu, błonie śluzowej jelit i łożysku. Istnieje specyfika tkankowa ferrytyny i w każdym z narządów występują izoformy, tzw. izoferrytyny, różniące się budową i siłą wiązania żelaza. Izoferrytyna występująca w sercu charakteryzuje się zdolnością łatwiejszego i krótkotrwałego przyłączenia żelaza, a ilość żelaza zawartego w izoferrytynie sercowej jest większa niż w izoferrytynie wątrobowej¹⁵⁷. Ma to znaczenie w metabolizmie, gdyż nagły wzrost zapotrzebowania na żelazo jest szybko zaspokajany. Żelazo jest niezbędne do prawidłowego funkcjonowania organizmu i do przebiegu procesów biochemicznych, jednakże w formie wolnych jonów może być toksyczne, co wynika z jego katalitycznej aktywności. Żelazo, w postaci jonowej uczestniczy w reakcjach, których produktami są reaktywne formy tlenu¹⁵⁸ np. w reakcji Fentona (rozdział Reaktywne formy tlenu i stres oksydacyjny).

Doksozobicylina ma zdolność tworzenia kompleksów z jonami żelaza, w stosunku molarnym 1:3¹⁵⁹. Kompleks ten wiąże się z DNA, jak również do błon biologicznych, prowadząc do ich destrukcji¹⁶⁰.

2.8. Bariera antyoksydacyjna

Skuteczna ochrona przed stresem oksydacyjnym i RFT zapewnia prawidłowe funkcjonowanie komórek a w konsekwencji tkanek i narządów. Komórki cały czas narażone są na działanie RFT, które powstają w warunkach patologii jak i fizjologii. Organizmy tlenowe wykształciły mechanizmy obronne, celem „unieszkodliwienia” RFT i zapobiegania skutkom ich działania.

W komórkach istnieją dwa systemy ochrony, enzymatyczny oraz nieenzymatyczny do którego należą związki niskocząsteczkowe tzw. przeciwutleniacze (ang. antioxidant)¹⁶¹. Systemy ochrony przed RFT działają na każdym z 3 etapów ochrony: prewencji, terminacji, eliminacji.

Enzymy należące do bariery antyoksydacyjnej to: dysmutaza ponadtlenkowa (oksydoreduktaza ponadtlenek:ponadtlenek), katalaza (oksydoreduktaza nadtlenuk wodoru:nadtlenek wodoru) i peroksydaza glutationowa (oksydoreduktaza glutation:nadtlenek wodoru).

Dysmutaza ponadtlenkowa (ang. superoxide dismutase, SOD) (E.C. 1.15.1.1), enzym odkryty przez Fridovich i McCord w roku 1969^{61,162}, katalizuje reakcję dysmutacji anionorodnika ponadtlenkowego:



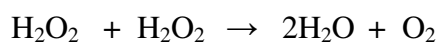
W komórkach eukariotycznych, w zależności od występującego w cząsteczce enzymu jonu metalu, ilości podjednostek i występowania, tzn. kompartmentacji komórkowej, wyróżniamy 3 rodzaje tego enzymu^{163, 164}:

SOD-1 - zbudowany z dwóch podjednostek oraz jonu miedzi i cynku, występuje w cytoplazmie komórkowej

SOD-2 - zbudowany z czterech podjednostek, zawiera jony manganu, występuje w macierzy mitochondrialnej

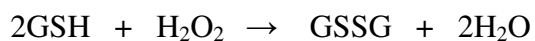
SOD-3 – zbudowany z czterech podjednostek, zawiera jony miedzi i cynku, występuje w macierzy pozakomórkowej

Katalaza (ang. catalase, CAT) (E.C. 1.11.1.6), enzym, który katalizuje reakcję konwersji, tzw. dysproporcjonacji, nadtlenuk wodoru do wody i tlenu:



Enzym ten jest tetrametrem zbudowanym z czterech identycznych podjednostek.

Peroksydaza glutationowa (ang. glutathione peroxidase) (E.C. 1.11.1.9), katalizuje reakcję, w której substratami są zredukowana forma glutationu (GSH) i nadtlenuk wodoru:



W wyniku tej reakcji powstaje utleniona forma glutationu (GSSG) i woda.

Do niskocząsteczkowych antyoksydantów należą związki o charakterze hydrofilowym, takie jak: glutation, askorbinian, cysteina, kwas moczowy, kreatynina, melanina, oraz hydrofobowe, np.: alfa-tokoferol, karotenoidy, bilirubina.

Obok systemu enzymatycznego i związków niskocząsteczkowych bariery antyoksydacyjnej wyróżnia się systemy naprawcze kwasów nukleinowych jak ligazy, usuwania utlenionych białek na drodze proteolizy oraz rozkładu uszkodzonych lipidów przez fosfolipazy.

Systemy ochrony w zależności od rodzaju tkanki i ilości atakujących RFT są mniej lub bardziej wykształcone. Bariera antyoksydacyjna poszczególnych narządów różni się pod względem jakościowym jak i ilościowym, np. aktywność poszczególnych enzymów bariery antyoksydacyjnej w narządach jest inna. Różnice te są na tyle istotne, iż można dopatrywać się związku między podatnością poszczególnych narządów na stres oksydacyjny a aktywnością bariery antyoksydacyjnej.

W przypadku serca, poziom aktywności poszczególnych elementów bariery antyoksydacyjnej, znacznie różni się od innych narządów. I tak, aktywność enzymatyczna katalazy serca królika i szczura stanowi 4 % aktywności katalazy wątroby⁷.

Również aktywności dysmutazy ponadtlenkowej i peroksydazy glutationu są w sercu niższe¹⁶⁵. Aktywność enzymu SOD serca w przeliczeniu na miligram białka stanowi około 25 % aktywności SOD znajdującej się w wątrobie¹⁶⁶. Relatywnie wyższa jest natomiast aktywność peroksydazy glutationu, w sercu szczura stanowi ona aż 80 % aktywności oznaczanej w wątrobie¹⁶⁷.

Jak wynika z powyższych danych, serce jest narządem szczególnie wrażliwym na działanie reaktywnych form tlenu. Wykazano również, że trening fizyczny wpływa korzystnie na efektywność bariery antyoksydacyjnej serca¹⁶⁸.

2.9. Syntetyczne aminooksyle

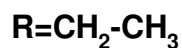
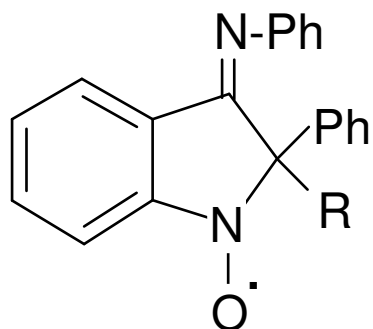
Syntetyczne aminooksyle (RNO^\bullet) to niskocząsteczkowe związki chemiczne, które mają ugrupowanie aminooksylowe NO^\bullet z niesparowanym elektronem na atomie tlenu i wykazują własności antyoksydacyjne^{169, 170, 171}. Do związków tych należą aminooksyle o charakterze alifatycznym: TEMPO (2,2,6,6,-tetra-metyl-piperydino-1-oksyl) i 4-OH-TEMPO (4-hydroksy-2,2,6,6,-tetra-metyl-piperydino-1-oksyl) oraz aromatycznym, których przykładem są aromatyczne aminooksyle indolinowe.

Aromatyczne aminooksyle indolinowe to grupa stabilnych rodników azototlenowych różniących się długością bocznego łańcucha wodorowęglowego przy węglu drugim (C2) pierścienia indolowego (Rycina 9). Związki te mają zdolność kotwiczenia w błonach biologicznych. Długość łańcucha wodorowęglowego wpływa na własności cząsteczki tzn. zarówno na siłę kotwiczenia (stopień immobilizacji) wewnątrz błony jak i aktywność antyoksydacyjną. Łańcuch boczny umożliwia wnikanie i kotwiczenie w hydrofobowym wnętrzu błony, a stopień immobilizacji zależy od długości łańcucha wodorowęglowego.

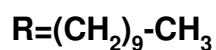
W cząsteczce aromatycznych aminooksyli indolinowych elektrony π pierścienia aromatycznego sprzężone są z niesparowanym elektronem ugrupowania aminooksylowego NO^\bullet . Sprzężenie niesparowanego elektronu NO^\bullet powoduje powstanie formy rezonansowej (Rycina 10) o charakterze N-tlenku z delokalizacją niesparowanego elektronu na atomie węgla pięścienia aromatycznego (C^\bullet). Ułatwia to reakcje z rodnikami ponadtlenkowymi (LOO^\bullet) i tlenkowymi (LO^\bullet) powstającymi w przebiegu wolnorodnikowych reakcji łańcuchowych wielonienasyconych kwasów tłuszczowych oraz wolnorodnikowych reakcji reszt aminokwasowych białek.

Wykazano, że 1,2-dihydro-2-oktadecyl-2-fenyl-3H-indol-3-fenylimino-1-oksyl (IA C18) o łańcuchu 18-węglowym z większym stopniem chroni białka przed utlenieniem niż 1,2-dihydro-2-etyl-2-fenyl-3H-indol-3-fenylimino-1-oksyl (IA C2) o 2-węglowym łańcuchu przy węglu drugim pierścienia indolowego. Natomiast w przypadku peroksydacji lipidów IA C2 wykazuje większą skuteczność antyoksydacyjną niż IA C18¹⁷².

Cząsteczki aromatycznych aminooksylii wykazują własności paramagnetyczne i mogą być stosowane do badania błon biologicznych techniką elektronowego rezonansu paramagnetycznego.



IA C2



IA C10



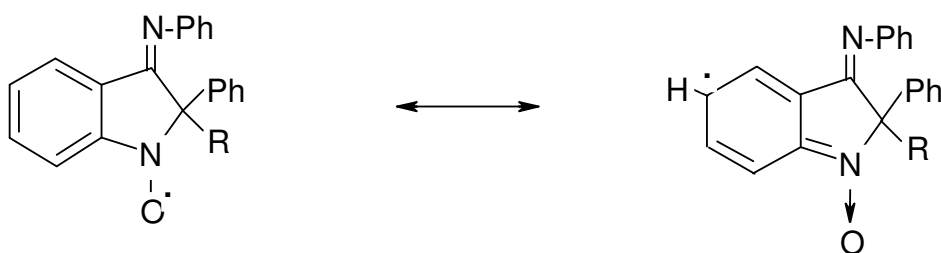
IA C18

Rycina 9. Struktura aromatycznych aminooksylii indolinowych

IA C2: 1,2-dihydro-2-etyl-2fenyl-3H-indol-3fenylimino-1-oksyl

IA C10: 1,2-dihydro-2-decyl-2fenyl-3H-indol-3fenylimino-1-oksyl

IA C18: 1,2-dihydro-2-oktadecyl-2fenyl-3H-indol-3fenylimino-1-oksyl



Rycina 10. Struktura molekularna formy wolnego rodnika aminooksylowego oraz N-tlenku z niesparowanym elektronem w pierścieniu cząsteczki.

2.10. Uzasadnienie wybranych celów pracy

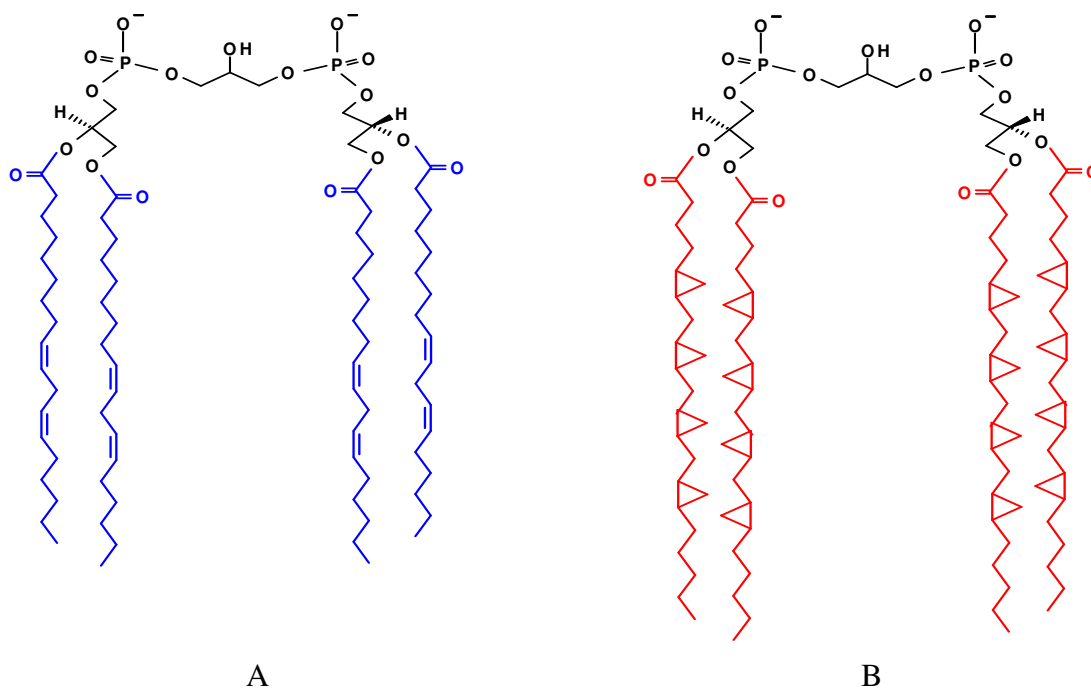
Wykazano zdolność dokсорubicyny do wiązania z białkami oraz lipidami błon komórkowych¹⁷³ i mitochondrialnych¹⁷⁴. Wydaje się, iż kardiolipina jest lipidem warunkującym wysoką specyficzną wiązania dokсорubicyny do lipidów błonowych. Powinowactwo DOX do kardiolipiny jest 80-krotnie większe niż do kwasu fosfatydowego¹⁷⁵. Zaobserwowano obniżenie płynności błon komórkowych w następstwie interakcji z dokсорubicyną, które powiązано z generowaniem przez dokсорubicynę reaktywnych form tlenu i związaną z tym procesem peroksydacją lipidów błon komórkowych^{176, 177}. Podobne zmiany zmniejszenia płynności błon komórkowych wykazał Ogura¹⁷⁸, wykorzystując technikę EPR.

Proces peroksydacji lipidów może inicjować proces oksydacji białek¹³⁶, nie można wykluczyć niezależności procesu oksydacji białek wywołanej rodnikiem semichinonowym dokсорubicyny od peroksydacji lipidów. Kardiotosyczość dokсорubicyny można tłumaczyć obecnością w mitochondriach serca specyficznego enzymu, dehydrogenazy egzogenego NADH¹⁷⁹, katalizującego reakcję jednoelektronowej redukcji dokсорubicyny do rodnika semichinonowego (Rycina 1). nierozstrzygnięta pozostaje kwestia: czy w krótkim czasie, do 30 minut, po ekspozycji na dokсорubicynę w układach *in vivo* i *in vitro* dochodzi do utlenienia lipidów czy też białek błonowych, czy procesy te przebiegają niezależnie i czy do ich przebiegu niezbędna jest obecność jonów żelaza. Część badaczy uważa, że kompleks dokсорubicyny z żelazem uwalnia RFT, które mogą prowadzić do peroksydacji lipidów¹⁸⁰.

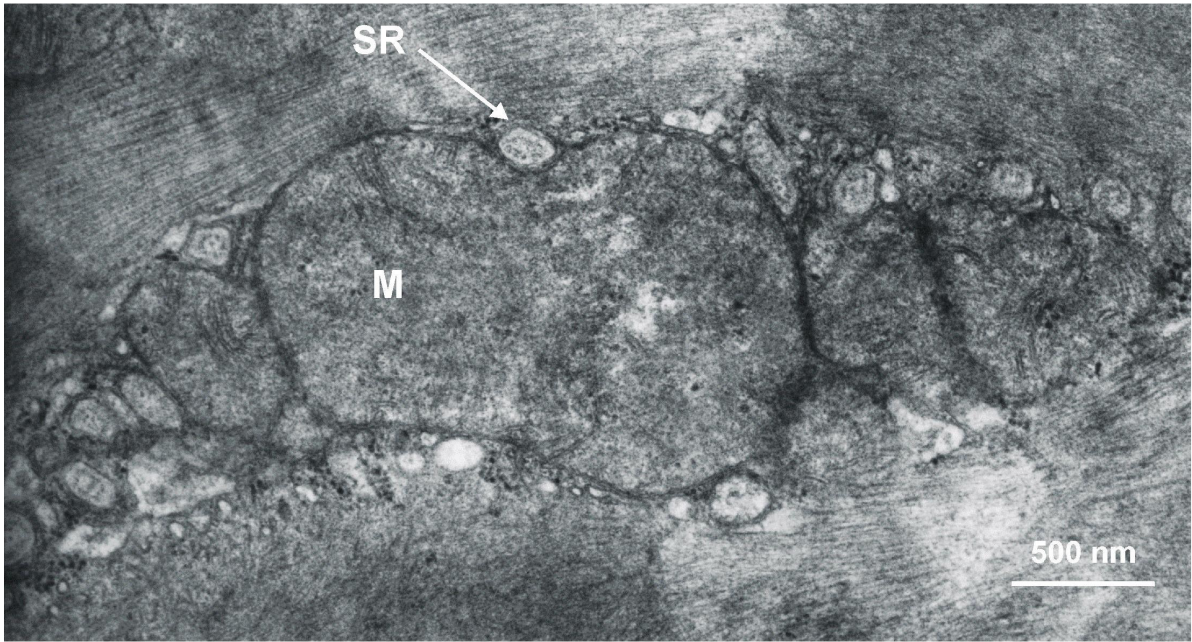
Nienasycone kwasy tłuszczowe wchodzące w skład lipidów błonowych podatne są na proces peroksydacji. Kardiolipina komórek eukariotycznych, jest fosfolipidem błonowym, zawierającym w cząsteczce reszty nienasyconych kwasów tłuszczowych¹¹². Błony komórek prokariotycznych, np. bakterii *E. coli*, zawierają również znaczną ilość kardiolipiny¹¹¹, mogą więc stanowić model błon subkomórkowych serca. W świetle ostatnich badań wydaje się, iż kardiolipina błon komórkowych, podobnie jak inne lipidy błon bakterii *E. coli* nabyła własności uniewrażliwiającej ją na stres oksydacyjny, w tym na procesy peroksydacji lipidów. W miejscu nienasyconych wiązań reszt kwasów tłuszczowych wchodzących w skład kardiolipiny eukariota, w kardiolipinie występującej w bakteriach *E. coli* występują pierścienie cyklopropanu (Rycina 11). Taka struktura kwasu tłuszczowego zapewnia znaczną płynność tego fosfolipidu w środowisku błonowym a równocześnie zwiększa odporność na stres oksydacyjny. Biorąc powyższe pod uwagę,

komórki bakteryjne *E. coli* i błony komórek bakteryjnych mogą być idealnym modelem biologicznym do zbadania ewentualnej selektywnej oksydacji białek przebiegającej bez udziału peroksydacji lipidów indukowanej doksorubicyną.

Za istotnym udziałem reakcji wolnorodnikowych w kardiotoxyczności DOX przemawiają wyniki eksperymentu wykonanego w warunkach *in vivo* na transgenicznym myszach, w których dokonano nadekspresji mitochondrialnej formy enzymu dysmutazy ponadtlenkowej (MnSOD) w sercu, uzyskując w ten sposób zahamowanie zmian odpowiadających za niepożądane efekty działania doksorubicyny, w tym zmian ultrastrukturalnych¹⁸¹. Fakty te przemawiają za istotną rolą reaktywnych form tlenu w kardiotoxyczności doksorubicyny oraz za mitochondriami jako miejscem toksycznego działania leku, czym pośrednio tłumaczyć można objawy kardiotoxyczności. Doświadczenia własne wskazują na toksyczne działanie doksorubicyny na mitochondria oraz na mikrosomy komórek mięśnia serca chomika, po dożylnym podaniu doksorubicyny w dawce 5 mg/kg m.c. Zmiany ultrastrukturalne pod postacią obrzęku mitochondriów i rozrzedzenia grzebieni mitochondrialnych oraz obrzęk retikulum sarkoplazmatycznego widoczne były już po 10 minutach od podania leku (Rycina 12). Uzyskane zmiany ultrastrukturalne w mięśniu serca są zgodne ze zmianami uzyskanymi przez innych autorów¹⁸².



Rycina 11. Struktura kardiolipiny występującej w sercu (A) oraz bakteriiach *E. coli* (B).



Rycina 12. Zdjęcie preparatu mikroskopowego mięśnia serca chomika po 10 minutach od dożylnego podania doksorubicyny 5 mg/kg m.c.(materiał własny).

3. Cele pracy

1. Ocena nasilenia stresu oksydacyjnego w sercu chomika na poziomie białek i lipidów błon mitochondriów i mikrosomów indukowanego doksorubicyną.
2. Analiza parametrów wolnorodnikowych modyfikacji białek i lipidów po ekspozycji na doksorubicynę w warunkach *in vitro*. Rola jonów żelaza Fe^{2+} .
3. Ocena wpływu antyoksydacyjnego aromatycznych aminooksyli różniących się stopniem mobilności w fazie lipidowej błony w ochronnym wpływie na lipidy i białka błonowe.
4. Ocena stopnia uszkodzenia białek błonowych i systemu naprawczego (HtrA) w komórkach prokariotycznych zawierających kardiolipinę eksponowanych na działanie doksorubicyny.

4. Materiały

4.1 Odczynniki chemiczne i bufory

Preparaty farmakologiczne

Dokсорubicyna-HCl: Doxolem, firmy Lemury S.A.

Ketamina: Calypsol, firmy Gedeon-Richter

Heparyna; Heparinum, firmy Polfa

Ksylazyna: Xylavet, firmy Scanvet

0,9 % NaCl, firmy Polfa

Odczynniki chemiczne firmy Bio-Rad

akryloamid ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$)

bis-akryloamid (N',N' -metylenobisakryloamid)

Odczynniki chemiczne firmy Difco

bacto-trypton

ekstrakt drożdżowy

Odczynniki chemiczne firmy Fluka

mannitol

Odczynniki chemiczne firmy ICN

APS – nadsiarczan amonu

Odczynniki chemiczne firmy Merck

FeCl_3

Odczynniki chemiczne firmy OxisResearch

Bioxytech LPO-586

Odczynniki chemiczne firmy Polskie Odczynniki Chemiczne Gliwice S.A.

alkohol etylowy 96 %

dezoksyholan sodu – $\text{C}_{24}\text{H}_{39}\text{O}_4\text{Na}$

eter dietylowy

kwask trójchlorooctowy – TCA

siarczan miedzi - $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

winian sodowo-potasowy $\text{Na}_2\text{K}_2\text{H}_4\text{O}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$

wodorotlenek sodu - NaOH

Odczynniki chemiczne firmy Serva, Heidelberg

Tris-(hydroksymetyl)aminometan

β -merkaptoetanol

Odczynniki chemiczne firmy Sigma-Aldrich

aceton

ATP – adenzynotrójfosforan

BCIP – sól p-toluidynowa 5-bromo-4-chloro-3-indolilofosforan

BHT - 3,5-diizobutylo-4-hydroksytoluen

BSA - albumina bydlęca

chlorowodorek guanidyny – $\text{CH}_5\text{N}_3 \cdot \text{HCl}$

Coomassie brilliant – błękit kumasyny

DNA-za I

DNPH - 2,4-dinitrofenylohydrazyna

EDTA – kwas etylenodiaminotetraoctowy

EGTA – kwas etylenoglikol-O-O'-bis(2-aminoetyl)-N,N,N',N'tetraoctowy

2N HCl - 2N kwas solny

KCl - chlorek potasu

KH_2PO_4 - kwaśny fosforan potasu

lizozym z jaja kurzego

3-MSI – 3-maleimidoproksyl

NADH - dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy

NADPH - fosforan dinukleotydu nikotynamidoadeninowego

octan etylu

przeciwciała anty-DNP

przeciwciała królicze anty-HtrA

przeciwciała kozie anty-królicze sprzężone z alkaliczną fosfatazą

przeciwciała kozie anty-królicze sprzężone z peroksydazą chrzanową

sacharoza

TBA - kwas tiobarbiturowy

TMED – N,N,N',N'tetrametyloetylenodiamina

Odczynniki chemiczne zsyntetyzowane:

1,2-dihydro-2-ethyl-2phenyl-3H-indole-3-phenylimino-1-oxyl (IA-C2)

1,2-dihydro-2-octadecyl-2phenyl-3H-indole-3-phenylimino-1-oxyl (IA-C18)

Białko HtrA

Białko HtrA zostało oczyszczone w Katedrze Biochemii Uniwersytetu Gdańskiego

Bufor MSE do izolacji frakcji mitochondrialnej i mikrosomalnej

225 mM mannitol

75 mM sacharoza

10 mM Tris/HCl

1 mM EGTA pH 7.4

Bufor Tris-HCl/KCl do zawieszania mitochondriów i mikrosomów

10 mM Tris-HCl

150 mM KCl pH 7.4

Bufor prób inkubacyjnych

50 mM bufor fosforanowy pH 7.4

Pożywka bakteryjna LB (Luria-Bertani)¹⁸³

bacto-trypton 10 g

ekstrakt drożdżowy 5g

NaCl 10 g

ad 1000 ml H₂O pH 7,4

Odczynnik biuretowy

CuSO₄x5H₂O 0,75 g

NaK₄H₄O₆xH₂O 3g

NaOH 15g

ad 500 ml H₂O

6 M roztwór chlorowodoru guanidyny pH 6,5

57,3 g chlorowodoru guanidyny

ad 100 ml 50 mM buforu fosforanowego pH 7,4

5 mM roztwór BHT w etanolu

4.2. Materiał biologiczny

Doświadczenia przeprowadzono na chomikach syryjskich, samcach o masie ciała około 100 gram, zakupionych oraz pochodzących z hodowli własnej. Zwierzęta karmiono paszą granulowaną Labofeed, Kcynia, Polska. Nie stosowano ograniczeń w dostępie wody.

Bakterie *Escherichia coli* B178 genotyp F⁻ IN (rrnD-rrE) 1pgs⁺cls⁺galEsup⁺ - pochodziły z kolekcji Katedry Biochemii Uniwersytetu Gdańskiego.

4.3. Sprzęt laboratoryjny

Aparat do elektroforezy pionowej, f-my Sigma

Homogenizatory szklane typu Potter-Elvehjem o obj. 5 ml i 2 ml, z teflonowym tłokiem

Łaźnia wodna

Pompa infuzyjna

Probówki wirownicze

Spektrofotometr Cecil Ce 1011

Spektrofotometr EPR Varian E4

Vortex IKA MS1

Waga Kern 770

Wirówki: Beckman J2-21, Beckman L7-55, Janetzki K24, Janetzki K26,

Janetzki VAC 602-1, MPW-340, Sigma 3K30

5. Metody

Doświadczenia *in vivo* oraz *in vitro* wykonano na modelu zwierzęcym, zgodnie z zasadami przedstawionymi i zaakceptowanymi przez Biuro Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach Akademii Medycznej w Gdańsku (zezwolenie indywidualne nr 9 z dnia 28.04.2003) oraz za zgodą Terenowej Komisji Etyki Badań przy AMG (Nr TKE BN/414/98).

Doświadczenia *in vivo* na komórkach bakteryjnych wykonano w Katedrze Biochemii Uniwersytetu Gdańskiego.

5.1. Izolacja frakcji subkomórkowych

Poszczególne frakcje subkomórkowe z serc chomików otrzymano metodą różnicowego wirowania homogenatów tkankowych¹⁸⁴, uzyskując w ten sposób poszczególne frakcje: postjądrową, mitochondrialną oraz mikrosomalną.

I homogenat

Chomika usypiano podając wziewnie eter dietylowy, dokonywano dekapitacji a następnie wyjmowano serce, które umieszczano w buforze MSE do izolacji mitochondriów o temp. 4 °C, pH 7.4. Serce wypłukiwano z krwi i ewentualnych skrzeplin, tkankę cięto na drobne kawałki (<0,5 mm), dodawano odpowiednią objętość buforu MSE, całość homogenizowano w homogenizatorze szklanym Porter-Elvehjem'a, uzyskując 15 % homogenat (w/v).

II frakcja postjądrowa

Uzyskany, metodą opisaną powyżej, homogenat wirowano przez 2 minuty z przyspieszeniem 450 x g. Supernatant zlewano a osad rozcierano w 2 ml buforu MSE i wirowano ponownie w tych samych warunkach przez 2 min. Po tym czasie supernatant z pierwszego i drugiego wirowania łączono. Uzyskany w ten sposób supernatant służył bezpośrednio do dalszych oznaczeń jako frakcja postjądrowa lub poddawany był kolejnemu wirowaniu celem uzyskania frakcji mitochondrialnej i mikrosomalnej.

III frakcja mitochondrialna

Uzyskany osad po 10 min wirowania z przyspieszeniem 10 000 x g wg procedury opisanej powyżej wirowano jeszcze 2 razy; za każdym razem po zlaniu supernatantu dodawano po 2 ml buforu MSE do każdej probówki i osad rozcierano ponownie. Po trzecim wirowaniu uzyskany osad mitochondrialny zawieszano w buforze MSE (rozdział Odczynniki chemiczne i bufor), uzyskana frakcja mitochondrialna służyła do dalszych oznaczeń. Z 1 grama serca uzyskiwano 16-18 mg białka mitochondriów.

IV frakcja mikrosomalna

Supernatant uzyskany z pierwszego wirowania z przyspieszeniem 10 000 x g, wirowano następnie przez godzinę z przyspieszeniem 100 000 x g, a uzyskany osad rozcierano w buforze do zawieszania frakcji mikrosomalnej. Z 1 grama serca uzyskiwano około 6 mg białka mikrosomów.

5.2. Izolacja błon bakteryjnych

Zakładano hodowlę nocną bakterii *E. coli* B178. Bakterie hodowano w pożywce LB przez noc w temperaturze 37 °C z wytrząsaniem. Hodowlę nocą odmładzano w stosunku 1:50 i hodowano w 1500 ml świeżej pożywki LB do OD₅₉₅ = 0,6. Następnie hodowlę rozdzielono do 6 probówek i wirowano w temperaturze 4 °C przez 10 minut z przyspieszeniem 5000 x g. Po zlaniu supernatantu do uzyskanego osadu dodano 7,5 ml 0,75 M roztworu sacharozy w 10 mM Tris/HCl pH 7,5 i pozostawiono w lodzie. Po 5 minutach do każdej probówki dodano 7,5 ml 1,5 mM EDTA oraz 250 µl roztworu 10 mg/ml lizozymu w 10 mM Tris/HCl, pH 8,0 i na 1 minutę wstawiono do łaźni wodnej o temperaturze 37 °C, po czym ponownie dodano po 7,5 ml 1,5 mM EDTA oraz 25 ml wody dwukrotnie destylowanej o temperaturze 0 °C, mieszając każdorazowo. Dodano 250 µl 1M MgCl₂ oraz DNAzę I do końcowego stężenia 5 µg/ml i pozostawiono w lodzie delikatnie mieszając. Po 15 minutach wirowano przez 60 minut z przyspieszeniem 100 000 x g. Uzyskany po wirowaniu osad błon bakteryjnych stanowił materiał do dalszych badań.

5.3. Oznaczanie ilości białka

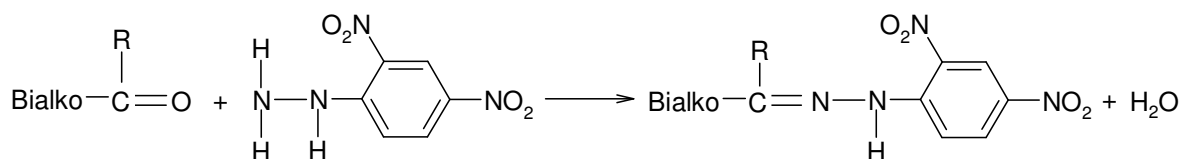
Białko w materiale biologicznym pochodzącym od zwierząt oznaczano metodą biuretową¹⁸⁵. W tym celu 50 µl lub 100 µl badanej próby uzupełniano do objętości 1 ml 1 % roztworu dezoksychoalanu sodu. Próbę ślełą stanowił 1 ml 1 % dezoksychoalanu sodu. Do każdej probówki dodawano 4 ml odczynnika biuretowego (rozdział Materiały) i pozostawiano 25 min bez dostępu światła. Absorbancję mierzono spektrofotometrycznie względem próby ślepej przy długości fali 540 nm. Wyniki odniesiono do krzywej wzorcowej otrzymanej na podstawie oznaczeń znanych stężeń roztworów albuminy (BSA).

Białko w błonach bakteryjnych oznaczano metodą wg Bradford¹⁸³. Do badanej próby objętości 5 µl zawierającej nieznaną ilość białka dodawano 200 µl odczynnika Bradford 5 x stężonego i dopełniano wodą dwukrotnie destylowaną do objętości 1 ml. Równolegle w analogiczny sposób przygotowywano próbki o znanych ilościach białka, za wzorzec przyjęto BSA. Wszystkie próby mieszano i inkubowano przez 5 minut w temperaturze pokojowej. Absorbancję mierzono spektrofotometrycznie przy długości fali 595 nm. Na podstawie wyników znanych stężeń białka wykresowano krzywą wzorcową, z której odczytywano ilość białka w próbce badanej.

5.4. Oznaczanie poziomu grup karbonylowych

Poziom grup karbonylowych w oksydacyjnie zmodyfikowanych białkach mitochondriów i mikrosomów oznaczano na podstawie reakcji z 2,4-dinitrofenylohydrazyną (2,4-DNPH), metodą opisaną przez Levine'a¹⁸⁶ z własnymi modyfikacjami¹⁶⁹.

W wyniku reakcji grup karbonylowych oksydacyjnie zmodyfikowanych białek z 2,4-DNPH powstają hydrazony, których ilość możemy oznaczać spektrofotometrycznie przy długości fali 360 nm.



Po zakończonej inkubacji odpowiednią objętość prób inkubacyjnych lub bezpośrednio uzyskanych frakcji postjądrowej, mitochondrialnej lub mikrosomalnej przeniesiono do szklanych probówek wirowniczych tak, aby ilość białka w każdej z nich wynosiła około 2 miligramów. Do prób dodano 0,5 ml 2,4-DNPH w 2 N HCl, do analogicznych prób 0,5 ml 2 N HCl. W trakcie godzinnej inkubacji w temperaturze 25°C próby mieszano co 10 minut. Po zakończonej inkubacji do każdej z prób dodano 1 ml 20 % kwasu trójchlorooctowego i wirowano 10 minut z przyspieszeniem 3000 x g. Supernatant zlewano a osad płukano trzykrotnie mieszaniną octan etylu/etanol (1:1, v/v) w objętościach odpowiednio 1 ml, 1 ml, 2 ml, każdorazowo wirując 5 minut z przyspieszeniem 3000 x g. Uzyskany osad po ostatnim wirowaniu rozpuszczano w 1 ml 6M chlorowodoru guanidyny przygotowanym w 50 mM buforze fosforanowym (rodział Odczynniki chemiczne i bufony), podgrzewając do temperatury 40°C. Po schłodzeniu prób mierzono absorbancję powstałego hydrazonu związanego z białkiem (zgodnie z powyższym równaniem reakcji) przy długości fali 360 nm. Wartość wyrażano jako ilość nmoli grup karbonylowych w przeliczeniu na 1 mg białka (nmol CO/mg białka).

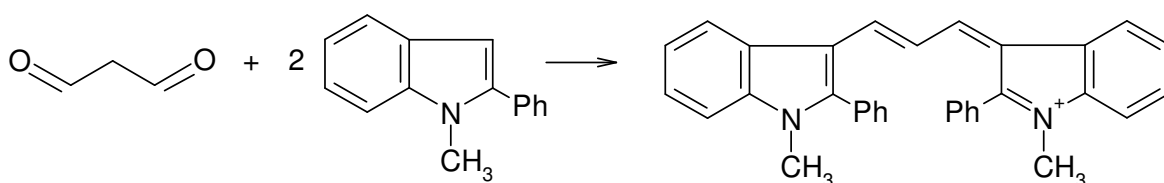
Poziom grup karbonylowych w oksydacyjnie zmodyfikowanych białkach błon bakteryjnych oznaczano na podstawie reakcji z 2,4-dinitrofenylohydrazyną (2,4-DNPH).

Po zakończonej inkubacji do badanych prób o objętości 100 µl zawierających po 100 µg białka dodawano 100 µl 2,4-DNPH (25 mM DNPH w 2 N HCl). W trakcie godzinnej inkubacji w temperaturze 25°C próby mieszano co 10 minut. Po zakończonej inkubacji białka z prób inkubacyjnych strącano kwasem trójchlorooctowym (TCA). Do Każdej z prób dodawano kwasu TCA tak aby jego końcowe stężenie kwasu wynosiło 10 % i pozostawiono na 30 minut w lodzie. Następnie próby wirowano 10 minut z przyspieszeniem 13 000 x g, supernatant zlewano a osad płukano 1 ml mieszaniny octan etylu/etanol (1:1, v/v) trzykrotnie powtarzając procedurę wirowania. Po ostatnim wirowaniu zlewano supernatant a do osadu dodawano 1 ml acetonu i wirowano jak wyżej a uzyskany osad zawieszano w buforze Laemmli zawierającym 4M mocznik.

Białka prób po reakcji z 2,4-DNPH rozdzielano elektroforetycznie i analizowano metodą Western-blotting z zastosowaniem przeciwciał anty-DNP w celu oznaczenia poziomu grup karbonylowych. Przeprowadzono detekcję barwną białek z zastosowaniem przeciwciał sprzężonych z alkaliczną fosfatazą.

5.5. Oznaczanie poziomu MDA + 4-HNE

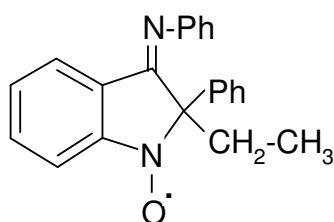
Ocenę peroksydacji lipidów oparto na oznaczeniu poziomu końcowych produktów peroksydacji lipidów, dialdehydu malonowego (MDA) i 4-hydroksy-2-nonenalu (4-HNE), metodą kolorymetryczną przy pomocy zestawu odczynników Bioxytech LPO-586 firmy OxisResearch. Metoda oparta jest na reakcji 2 cząsteczek chromogenu, N-metylo-2-fenylindolu z 1 cząsteczką MDA lub 4-HNE, w wyniku której powstaje trwały chromofor, a jego ilość możemy oznaczać spektrofotometrycznie przy długości fali 586 nm.



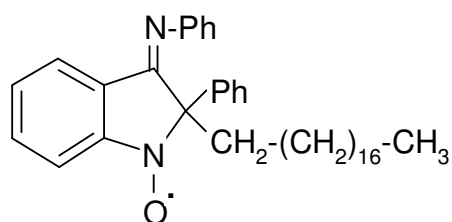
Po zakończonej inkubacji do prób inkubacyjnych (doświadczenia *in vitro*) lub bezpośrednio uzyskanych frakcji: postjądrowej, mitochondrialnej lub mikrosomalnej (doświadczenia *in vivo*) dodawano BHT tak aby jego stężenie końcowe wynosiło 0,5 mM. Pobierano odpowiednią objętość prób inkubacyjnych i oznaczano poziom MDA+4-HNE wg procedury załączonej do zestawu do oznaczeń Bioxytech LPO-586.

5.6. Synteza aminooksylii

Pochodne aminooksylii indolinowych: 1,2-dihydro-2-etyl-2-fenyl-3H-indol-3-fenylimino-1-oksyl (IA C2) i 1,2-dihydro-2-oktadecyl-2-fenyl-3H-indol-3-fenylimino-1-oksyl (IA C18) zostały zsyntetyzowane i dostarczone przez Profesora. Lucedio Greci z Katedry Chemii Organicznej Uniwersytetu w Ankonie we Włoszech a metoda została opublikowana w czasopiśmie *Tetrahedron*¹⁸⁷ i *Acta Biochimica Polonica*¹⁸⁸.



IA C2



IA C18

5.7. Badania *in vivo* wykonane na zwierzętach

Chomiki otrzymały doksorubicynę dożylnie (*i.v.*) z zachowaniem zasad aseptyki i norm etycznych.

5.7.1. Dożylne podanie doksorubicyny i izolacja frakcji postjądrowej z pobranych serc

Znieczulenie

Zwierzęta usypiano eterem dietylowym a następnie dootrzewnowo podawano Ketaminę (10 mg/kg m.c.) i Ksylazynę (12 mg/kg m.c.).

Procedura chirurgiczna

Skórę pachwiny depilowano, odkażano pole operacyjne, wykonywano cięcie boczne na odcinku około 2 cm, a następnie preparowano żyłę udową po stronie prawej. Zakładano podwiązkę z nici chirurgicznej i zamykano światło naczynia jak najdalej w kierunku

dystalnym. Do naczynia wprowadzano igłę ze strzykawką tzw. „insulinówkę” i podawano 60 µl dokсорubicyny lub odpowiednio 0,9 % roztwór NaCl przez 60 sekund, a następnie zamykano światło naczynia drugą podwiązką.

Zwierzęta podzielono na kilka grup, każda z nich liczyła 10 zwierząt

I grupa kontrolna - otrzymała *i.v.* 60 µl 0,9 % roztworu NaCl

II, III, IV grupy - otrzymały *i.v.* dokсорubicynę w dawce 5 mg/kg m.c. o objętości 60 µl

Czas podania leku: 60 sekund

Zwierzęta grupy I po 20 minutach usypiano eterem dietylowym, dokonywano dekapitacji i pobierano serca do dalszych badań, natomiast w stosunku do pozostałych grup zastosowano tę samą procedurę, ale dekapitacji dokonywano po czasie odpowiednio: grupa II-10 minut, grupa III-20 minut, grupa IV-30 minut. Z pobranych serc izolowano frakcję postjądrową (rozdział Izolacja frakcji subkomórkowych), a następnie oznaczano poziom grup karbonylowych (rozdział Oznaczenie poziomu grup karbonylowych) i MDA+4-HNE (rozdział Oznaczenie poziomu MDA+4-HNE).

5.7.2. Dożylnе podanie dokсорubicyny i izolacja frakcji mitochondrialnej i mikrosomalnej z pobranych serc

Znieczulenie i procedura chirurgiczna opisana powyżej

Zwierzęta podzielono na dwie grupy, każda z nich liczyła 30 zwierząt

I grupa kontrolna - otrzymała *i.v.* 60 µl 0,9 % roztwór NaCl

II grupa badana - otrzymała *i.v.* dokсорubicynę w dawce 5 mg/kg m.c. o objętości 60 µl dawkę 5 mg/kg m.c.

Czas podania leku: 60 sekund

Po 10 minutach od podania DOX, zwierzęta usypiano eterem dietylowym, dokonywano dekapitacji i pobierano serca celem izolacji frakcji mitochondrialnej oraz frakcji mikrosomalnej (rozdział Izolacja frakcji subkomórkowych) i dalszych oznaczeń, tj.

poziomu grup karbonylowych (rozdział Oznaczenie poziomu grup karbonylowych) i MDA+4-HNE (rozdział Oznaczenie poziomu MDA+4-HNE).

5.8. Badania *in vitro* na frakcjach subkomórkowych izolowanych z serc chomików

5.8.1. Inkubacja izolowanych mitochondriów z dokсорubicyną

Wyizolowane mitochondria podzielono na szereg prób inkubacyjnych zgodnie z poniższą tabelą.

Nr próby	
1	mitochondria
2	mitochondria + DOX
3	mitochondria + NADH
4	mitochondria + DOX + NADH
5	mitochondria + DOX + NADH + ATP/FeCl ₃
6	mitochondria + DOX + NADH + IA C2
7	mitochondria + DOX + NADH + IA C18
8	mitochondria + DOX + NADH + ATP/FeCl ₃ + IA C2
9	mitochondria + DOX + NADH + ATP/FeCl ₃ + IA C18

Stężenia odczynników:

DOX-0,1 mM, NADH-1 mM, ATP/Fe³⁺-1 mM/10 μM, IA C2-25 μM, IA C18-25 μM.

Do każdej z prób dodano odpowiednią ilość 50 mM buforu fosforanowego, pH 7.4 tak, aby końcowa objętość próby wynosiła 1ml. Próby inkubowano przez 30 minut w łaźni wodnej o temperaturze 37°C, z delikatnym mieszaniem. Następnie odpowiednią ilość prób 1-7 pobierano do oznaczeń poziomu grup karbonylowych (CO) oraz odpowiednią ilość prób 1-5 i 8-9 do oznaczeń MDA+4-HNE. Do prób, w których oznaczano bezpośrednio poziom MDA+4-HNE dodawano BHT w stężeniu końcowym 0,5 mM celu zahamowania procesu peroksydacji lipidów.

5.8.2. Inkubacja izolowanych mikrosomów z dokсорubicyną

Wyizolowane mikrosomy podzielono na szereg prób inkubacyjnych zgodnie z poniższą tabelą.

Nr próby	
1	mikrosomy
2	mikrosomy + DOX
3	mikrosomy + NADPH
4	mikrosomy + DOX + NADPH
5	mikrosomy + DOX + NADPH + ATP/FeCl ₃
6	mikrosomy + DOX + NADPH + IA C2
7	mikrosomy + DOX + NADPH + IA C18
8	mikrosomy + DOX + NADPH + ATP/FeCl ₃ + IA C2
9	mikrosomy + DOX + NADPH + ATP/FeCl ₃ + IA C18

Stężenia odczynników:

DOX-0,1 mM, NADPH-1 mM, ATP/Fe³⁺-1 mM/10 μM, IA C2-25 μM, IA C18-25 μM.

Do każdej z prób dodano odpowiednią ilość 50 mM buforu fosforanowego, pH 7.4 tak aby końcowa objętość próby wynosiła 1 ml. Próby inkubowano przez 30 minut w łaźni wodnej o temperaturze 37°C, z delikatnym mieszaniem. Następnie odpowiednią ilość prób 1-7 pobierano do oznaczeń poziomu grup karbonylowych (CO) oraz odpowiednią ilość prób 1-5 i 8-9 do oznaczeń MDA+4-HNE. Do prób, w których oznaczano bezpośrednio poziom MDA+4-HNE dodawano BHT w stężeniu końcowym 0,5 mM celu zahamowania procesu peroksydacji lipidów.

5.9. Badania wykonane na komórkach bakterii *Escherichia coli*

5.9.1. Wpływ doksorubicyny na poziom syntezy białka HtrA

Bakterie *E. coli* B178 hodowano w temperaturze 30°C w pożywce LB do OD₅₉₅ = 0,2. Bakterie traktowano doksorubicyną w stężeniach końcowych 0,1 mM i 0,25 mM i inkubowano przez 20 minut, 40 minut oraz 60 minut zgodnie z poniższą tabelą. Po odpowiednim czasie inkubacji pobierano próbki hodowli odpowiadające 200 µl hodowli o OD₅₉₅ = 0,8. Próbki hodowli wirowano przez 5 minut z przyspieszeniem 2400 x g w temperaturze 4 °C, a osad bakteryjny zawieszano w 20 µl buforu lizującego wg Laemmli¹⁸⁹. Białka lizatów rozdzielano metodą elektroforezy poliakrylamidowej z SDS i analizowano metodą Western blotting zastosowaniem króliczych przeciwciał anti-HtrA. Detekcję białek przeprowadzono metodą chemiluminescencyjną dzięki wykorzystaniu przeciwciał kozich kozich anti-króliczych sprzężonych z alkaliczną fosfatazą (AP) oraz z zastosowaniem substratów dla AP do detekcji chemiluminescencyjnej firmy Roche (rozdział Metody).

Bakterie *E. coli* podzielono na szereg prób inkubacyjnych zgodnie z poniższą tabelą.

Nr próby	
1	<i>E. coli</i> B178
2	<i>E. coli</i> B178 + DOX (0,1 mM) - inkubacja 20 minut
3	<i>E. coli</i> B178 + DOX (0,1 mM) - inkubacja 40 minut
4	<i>E. coli</i> B178 + DOX (0,1 mM) - inkubacja 60 minut
5	<i>E. coli</i> B178 + DOX (0,25 mM) - inkubacja 20 minut
6	<i>E. coli</i> B178 + DOX (0,25 mM) - inkubacja 40 minut
7	<i>E. coli</i> B178 + DOX (0,25 mM) - inkubacja 60 minut
8	Oczyszczone białko HtrA (200 ng)

5.9.2. Inkubacja izolowanych błon bakteryjnych z dokсорubicyną

Wyizolowane błony bakteryjne podzielono na szereg prób inkubacyjnych zgodnie z poniższą tabelą.

Nr próby	
1	błony bakteryjne
2	błony bakteryjne + DOX (0,1 mM) + NADPH (1 mM)
3	błony bakteryjne + DOX (0,1 mM) + NADPH (1 mM) + IA C18 (25 μ M)
4	błony bakteryjne + DOX (0,25 mM) + NADPH (1 mM)
5	błony bakteryjne + DOX (0,25 mM) + NADPH (1 mM) + IA C18 (25 μ M)

Stężenia odczynników:

DOX-0,1 mM i 0,25 mM, NADPH-1 mM, IA C18-25 μ M.

Do każdej z prób dodano 50 mM buforu fosforanowego, pH 7,4 do objętości 1 ml. Próby inkubowano przez 30 minut w łaźni wodnej o temperaturze 37°C, z delikatnym mieszaniem. Po tym czasie próby wirowano przez 60 minut z przyspieszeniem 100 000 x g w temperaturze 4 °C. W otrzymanym po odwirowaniu osadzie błon bakteryjnych oznaczano poziom grup karbonylowych (rozdział Oznaczanie poziomu grup karbonylowych).

5.10. Analiza widm elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR)

Na podstawie widm EPR znacznika spinowego, 3-maleimidoproksylu, specyficznie wiążącego się z białkami, wnioskowano o zmianie konformacji białek błonowych pod wpływem działania doksorubicyny w układzie *in vitro*.

5.10.1. Analiza widm EPR w badaniach *in vitro*

1. Wyizolowano mitochondria i mikrosomy z serc chomików oraz błony bakteryjne zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale: Izolacja frakcji subkomórkowych i Izolacja błon bakteryjnych.
2. Przygotowane próby inkubacyjne zgodnie z tabelami zamieszczonymi poniżej inkubowano w temp. 37°C przez 30 minut.

Nr próby	mitochondria
1	kontrola
2	DOX, NADH

Nr próby	mikrosomy
3	kontrola
4	DOX, NADPH

Nr próby	błony bakteryjne
5	kontrola
6	DOX, NADPH

3. Po zakończeniu inkubacji próby odwirowano odpowiednio: mikrosomy i błony bakteryjne: 60 min z przyspieszeniem 100 000 x g, a mitochondria: 10 min z przyspieszeniem 10 000 x g. Uzyskany po wirowaniu osad zawieszono w buforze 10 mM Tris-HCl/150 mM KCl, pH 7,4 o końcowej objętości 500 µl.
4. Do każdej z prób dodano 3-MSL w takiej ilości, aby końcowe stężenie znacznika wynosiło 0,65 mM.

5. Próby inkubowano przez 16 godzin, następnie do każdej z prób dodano 4 ml buforu i odwirowano wg procedury opisanej powyżej, celem odplukania niezwiązanego znacznika. Uzyskany osad zawieszono w 200 μ l buforu 10 mM Tris-HCl/150 mM KCl, pH 7,4.
6. Przygotowaną próbkę umieszczano w aparacie Varian E-4 i rejestrowano widmo EPR znacznika związanego z białkami błon; mitochondriów (Rycina 26), mikrosomów (Rycina 27) oraz błon bakteryjnych (Rycina 28).
7. Cyfrowy zapis widma EPR znacznika analizowano przy pomocy programu komputerowego EPRIK i obliczano parametry dla 3-MSL: h_s , h_w , τ_c (Ryciny 13-15).
8. Zmianę konformacji białek błonowych szacowano na podstawie wartości h_s/h_w (Rycina 14), tj. ilorazu parametrów rozszczepionej składowej wysokopolowej.

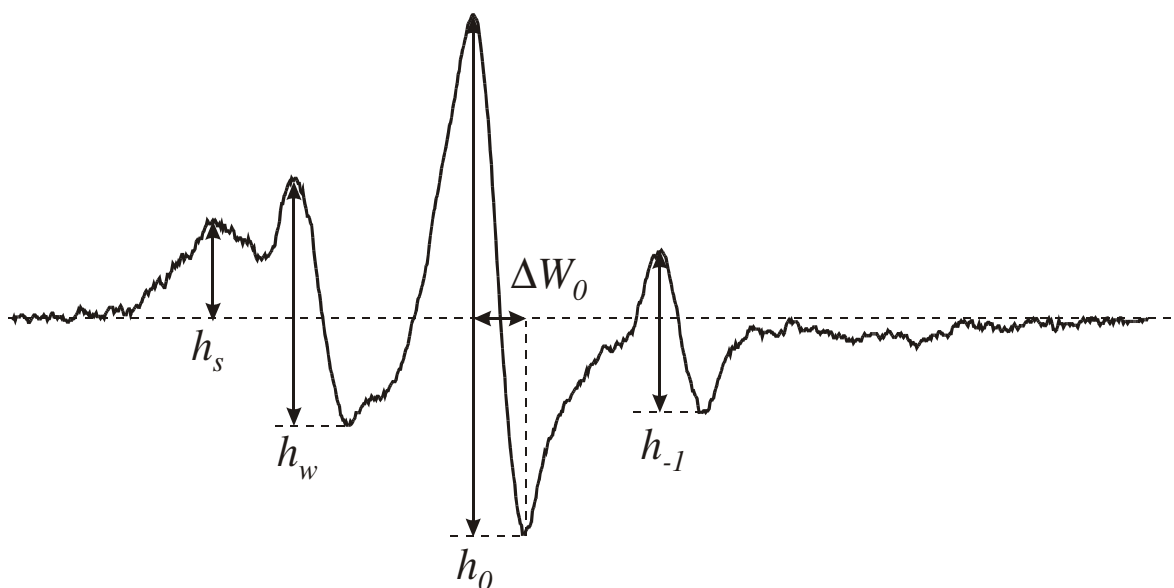
5.10.2. Analiza widm EPR aromatycznych aminooksyli

Analizę widm EPR aromatycznych aminooksyli indolinowych IA C2 i IA C18 przeprowadzono rejestrując ich widma w roztworach etanolowych oraz w mikrosomach wyizolowanych z serc chomików.

1. Przygotowano próby etanolowych roztworów 50 μ M IA C2 i IA C18 o objętości 200 μ l i umieszczono w aparacie Varian E-4 rejestrując ich widmo EPR (Rycina 29)
2. Do wyizolowanych mikrosomów z serc chomików zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale Izolacja frakcji subkomórkowych, dodano przygotowane powyżej roztwory aminooksyli tak aby ich końcowe stężenie w próbce wynosiło 50 μ M.
3. Przygotowane próby umieszczano w aparacie Varian E-4 i rejestrowano ich widmo EPR (Rycina 30).



Rycina 13. Widmo EPR znacznika 3-MSL w roztworze etanolowym, niezwiązanego z białkami.



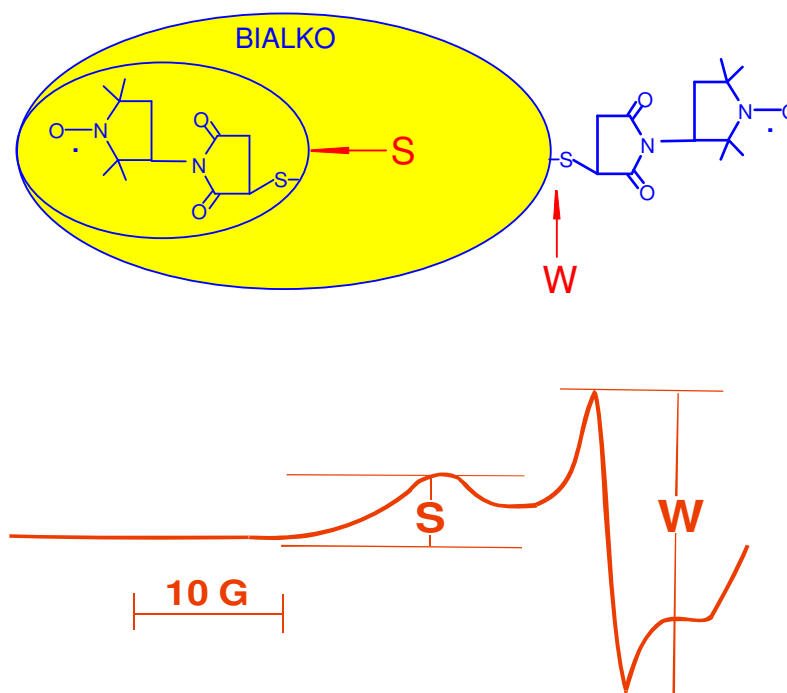
- h_s, h_w - rozszczepiona składowa wysokopolowa $h+1$,
- h_0 - składowa centralna,
- h_{-1} - składowa niskopolowa,
- ΔW_0 - szerokość składowej centralnej.

h_s/h_w - iloraz amplitudy wysokopolowych linii widma h_s i h_w .

τ_c - czas korelacji rotacyjnej znacznika związanego z białkami

$$\tau_c = 0.84ns \cdot \Delta W_0 \cdot \left[\sqrt{\frac{h_w}{h_{-1}}} - 1 \right]$$

Rycina 14. Widmo EPR znacznika 3-MSL po związaniu z białkami.



Rycina 15. Wiązanie znacznika 3-MSL do białek.

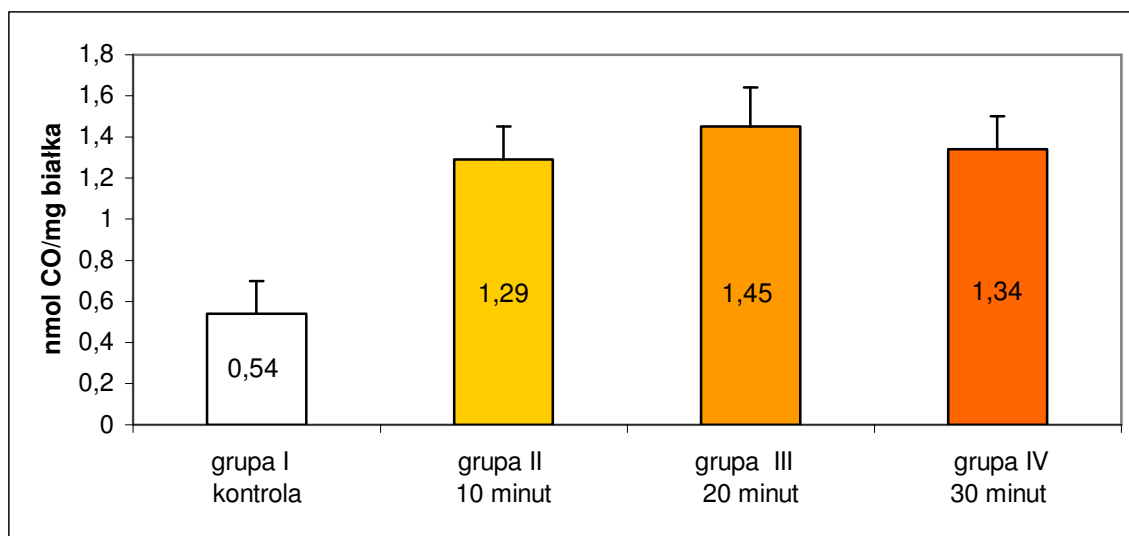
5.11. Analiza statystyczna

Wyniki przedstawiono jako wartości średnie wraz z wartością odchylenia standardowego (SD) lub błędem standardowym średniej (SEM). Analizę statystyczną przeprowadzono przy pomocy programu Statistica 7.1 firmy StatSoft, Inc., 2005 oraz arkusza kalkulacyjnego Excel 2000 PL. Zastosowano niesparowany test t-Studenta przy porównaniu dwóch grup, weryfikację normalności rozkładu danych przeprowadzono testem Shapiro-Wilka, a weryfikację hipotezy o jednorodności wariancji testem Levena. W przypadku porównań wielu grup zastosowano test ANOVA jednoczynnikowa oraz test Post-hoc (NIR Fishera). Za poziom statystycznej istotności przyjęto $p=0,05$.

6. Wyniki

6.1. Badania *in vivo*

6.1.1. Poziom grup karbonylowych i MDA+4-HNE we frakcji postjądrowej izolowanej z serc chomików po dożylnym podaniu dokсорubicyny w dawce 5 mg/kg m.c.

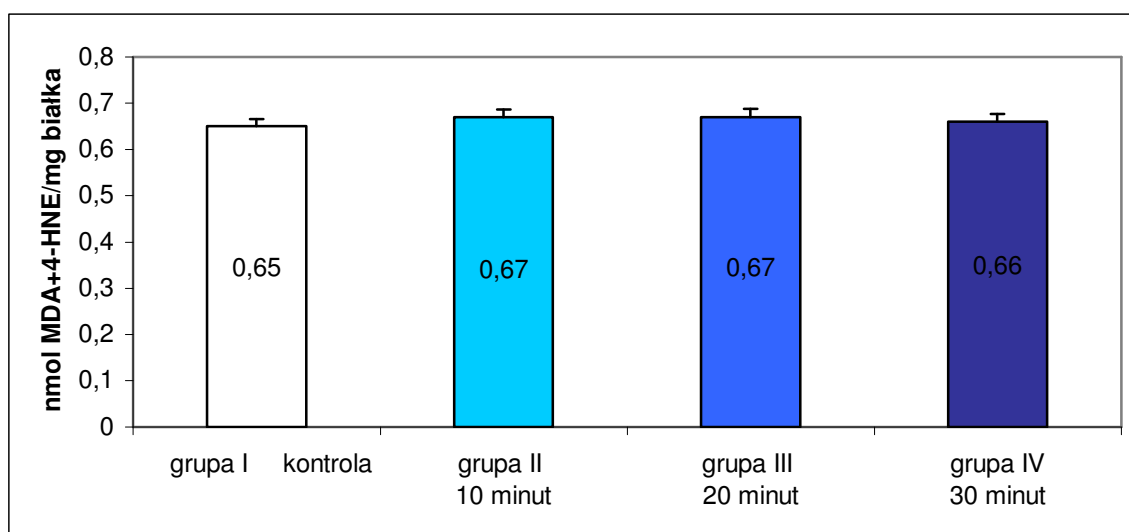


Rycina 16. Zmiany poziomu grup karbonylowych we frakcji postjądrowej izolowanej z serc chomików po dożylnym podaniu dokсорubicyny w dawce 5 mg/kg m.c.

Wartości podano w przeliczeniu na 1 mg białka frakcji postjądrowej izolowanej z serc chomików pobranych odpowiednio po 10 minutach, 20 minutach i 30 minutach od podania leku (śr. \pm SEM, $p < 0,005$).

Po 10 minutach (grupa II) od dożylnego podania chomikom dokсорubicyny w dawce 5 mg/kg m.c. stwierdzono podwyższony poziom grup karbonylowych w izolowanej z serc frakcji postjądrowej, którego wartość wynosiła $1,29 \pm 0,16$ nmol CO/mg białka w porównaniu z grupą kontrolną $0,54 \pm 0,16$ nmol CO/mg białka ($p < 0,005$) (Rycina 16). Podwyższony poziom grup karbonylowych stwierdzono również po 20 minutach (grupa III) oraz 30 minutach (grupa IV) od zakończenia podawania leku ale różnice w poziomie grup CO w grupach II-IV nie były istotne statystycznie ($p > 0,5$).

Wzrost poziomu grup karbonylowych nie korelował ze zmianami w poziomie MDA+4-HNE między poszczególnymi grupami (Rycina 17).

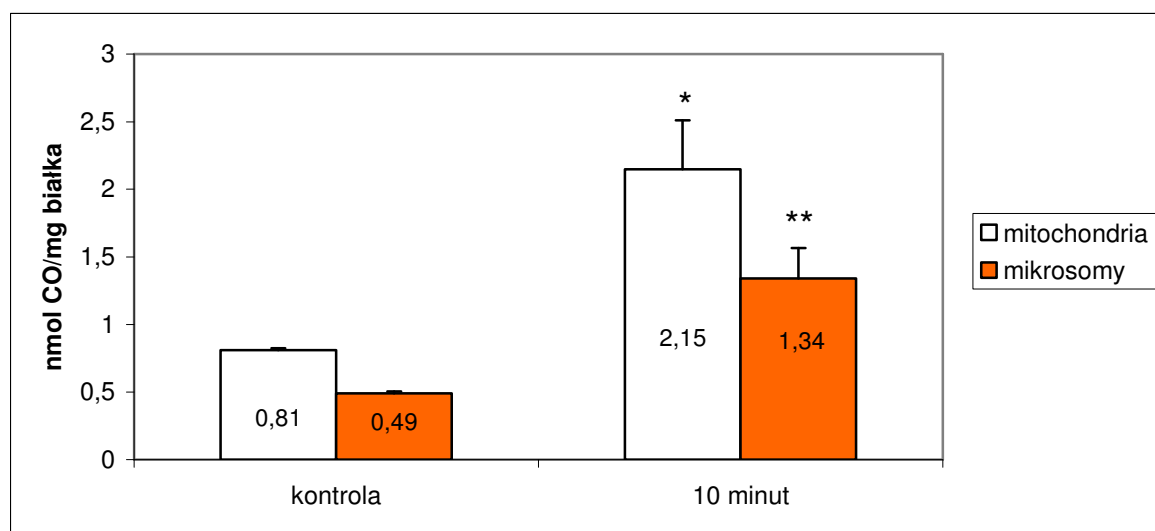


Rycina 17. Zmiany poziomu MDA+4-HNE we frakcji postjądrowej izolowanej z serc chomików po dożylnym podaniu doksorubicyny w dawce 5 mg/kg m.c.

Wartości podano w przeliczeniu na 1 mg białka frakcji postjądrowej izolowanej z serc chomików pobranych odpowiednio po 10 minutach, 20 minutach i 30 minutach od podania leku (śr. \pm SEM, $p > 0,3$).

Nie stwierdzono zmian w poziomie MDA+4-HNE oznaczonych we frakcji postjądrowej izolowanej z serc chomików, którym podano dożylnie doksorubicynę w dawce 5 mg/kg m.c. (grupy II-IV) w porównaniu z kontrolą (grupa I) (Rycina 17). Wartości średnie poziomu MDA+4-HNE w kontroli (grupa I) i poszczególnych grupach II-IV były w zakresie 0,65-0,67 \pm 0,16-0,18 nmol MDA+4-HNE /mg białka.

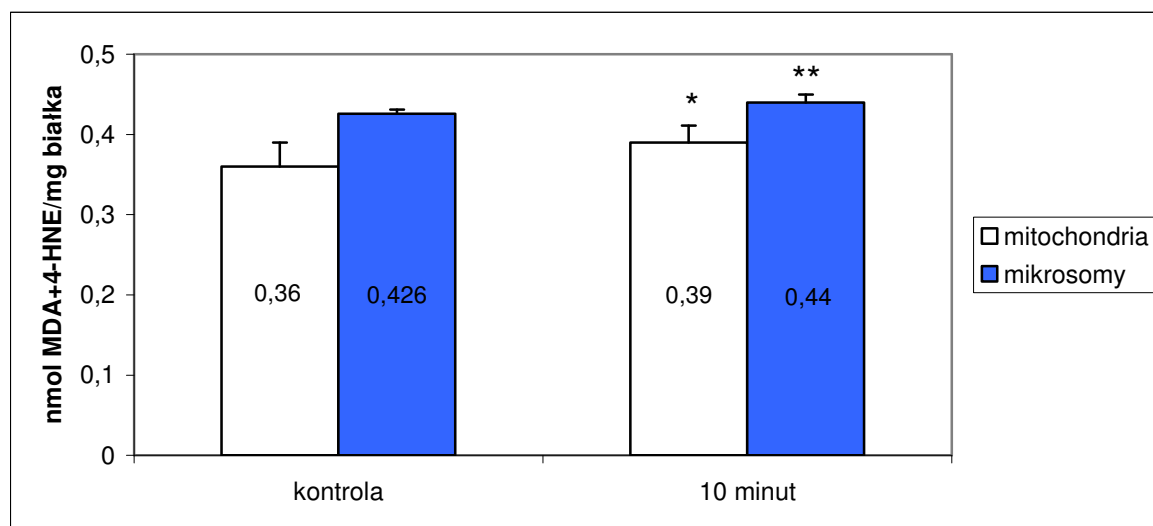
6.1.2. Poziom grup karbonylowych we frakcjach mitochondrialnej i mikrosomalnej izolowanych z serc chomików po dożylnym podaniu dokсорubicyny w dawce 5 mg/kg m.c.



Rycina 18. Zmiany poziomu grup karbonylowych w mitochondriach i mikrosomach izolowanych z serc chomików po dożylnym podaniu dokсорubicyny w dawce 5 mg/kg m.c. Pobranie serc do oznaczeń biochemicznych po 10 minutach od podania leku. Wartości podano w przeliczeniu na 1 mg białka mitochondriów i mikrosomów (śr. \pm SD, * $p < 0,05$ i ** $p < 0,05$ w porównaniu do kontroli).

Poziom grup karbonylowych oznaczony w mitochondriach i mikrosomach izolowanych z serc chomików pobranych po 10 minutach od dożylnego podania podawania dokсорubicyny w dawce 5 mg/kg m.c. wzrastał statystycznie istotnie ($p < 0,05$) w porównaniu z odpowiednimi grupami kontrolnymi (Rycina 18). Poziom grup karbonylowych oznaczony w mitochondriach w grupie badanej wynosił $2,1 \pm 0,36$ nmol CO/mg białka i był prawie trzykrotnie wyższy niż w grupie kontrolnej $0,81 \pm 0,01$ nmol CO/mg białka. Poziom grup CO w mikrosomach wzrastał z wartości $0,49 \pm 0,01$ nmol CO/mg białka do wartości $1,34 \pm 0,2$ nmol CO/mg białka. Nie zanotowano natomiast statystycznie istotnych różnic w poziomie MDA+4-HNE (Rycina 19).

6.1.3. Poziom MDA+4-HNE we frakcjach mitochondrialnej i mikrosomalnej izolowanych z serc chomików po dożylnym podaniu dokсорubicyny w dawce 5 mg/kg m.c.

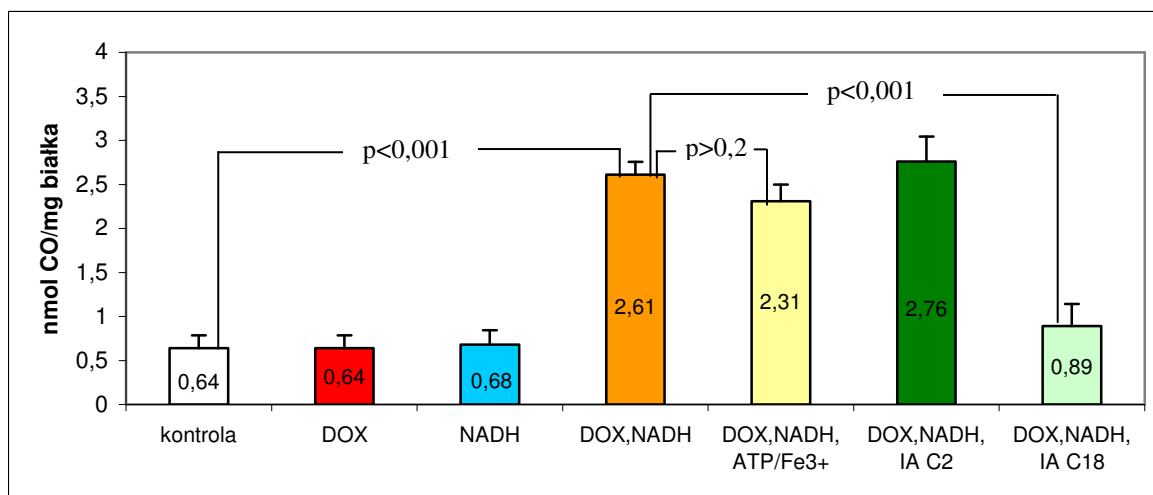


Rycina 19. Zmiany poziomu MDA+4-HNE w mitochondriach i mikrosomach izolowanych z serc chomików po dożylnym podaniu dokсорubicyny w dawce 5 mg/kg m.c. Pobranie serc do oznaczeń biochemicznych po 10 minutach od podania leku. Wartości podano w przeliczeniu na 1 mg białka mitochondriów i mikrosomów (śr. \pm SD, * $p > 0,15$ i ** $p > 0,1$ w porównaniu do kontroli).

Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w poziomie MDA+4-HNE oznaczonym w mitochondriach i mikrosomach izolowanych z serc chomików pobranych po 10 minutach od dożylnego podania dokсорubicyny w dawce 5 mg/kg m.c. w porównaniu z odpowiednimi grupami kontrolnymi (Rycina 19).

6.2. Badania *in vitro* na frakcjach subkomórkowych izolowanych z serc chomików

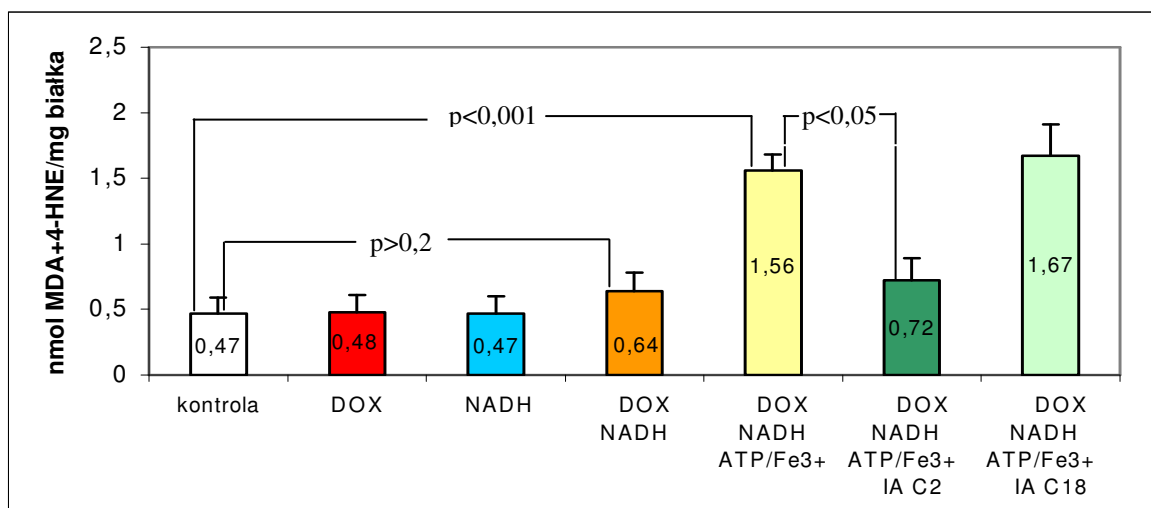
6.2.1. Poziom grup karbonylowych i MDA+4-HNE w mitochondriach



Rycina 20. Wpływ doksorubicyny, jonów żelaza oraz antyoksydantów na poziom grup karbonylowych oznaczony w mitochondriach izolowanych z serc chomików (śr. \pm SEM, stężenie poszczególnych odczynników: DOX - 0,1 mM, NADH - 1 mM, ATP/Fe³⁺ - 1 mM/10 μ M, IA C2 - 25 μ M, IA C18 - 25 μ M).

Stwierdzono statystycznie istotne różnice zarówno w poziomie grup CO (Rycina 20) jak i MDA+4-HNE (Rycina 21) oznaczonych w izolowanych mitochondriach inkubowanych z doksorubicyną. Zanotowano znaczny wzrost poziomu grup CO w próbie inkubacyjnej zawierającej mitochondria, doksorubicynę oraz NADH do wartości $2,61 \pm 0,14$ nmol CO/mg białka w porównaniu z kontrolą, czyli próbą zawierającą tylko mitochondria $0,64 \pm 0,14$ nmol CO/mg białka. Obecność jonów żelaza nie wpłynęła statystycznie istotnie ($p > 0,2$) na poziom grup karbonylowych oznaczony w próbie zawierającej mitochondria, DOX, NADH oraz Fe³⁺.

Aromatyczny aminooksył indolinowy z 18-węglowym łańcuchem bocznym, 1,2-dihydro-2-oktadecyl-2-fenyl-3H-indol-3-fenylimino-1-oksyl, (IA C18) hamował wzrost poziomu grup karbonylowych indukowany doksorubicyną w obecności NADH. Aminooksył IA C2, z dwuwęglowym łańcuchem bocznym, nie wpływał statystycznie istotnie na wartość poziomu grup CO w porównaniu z kontrolą.

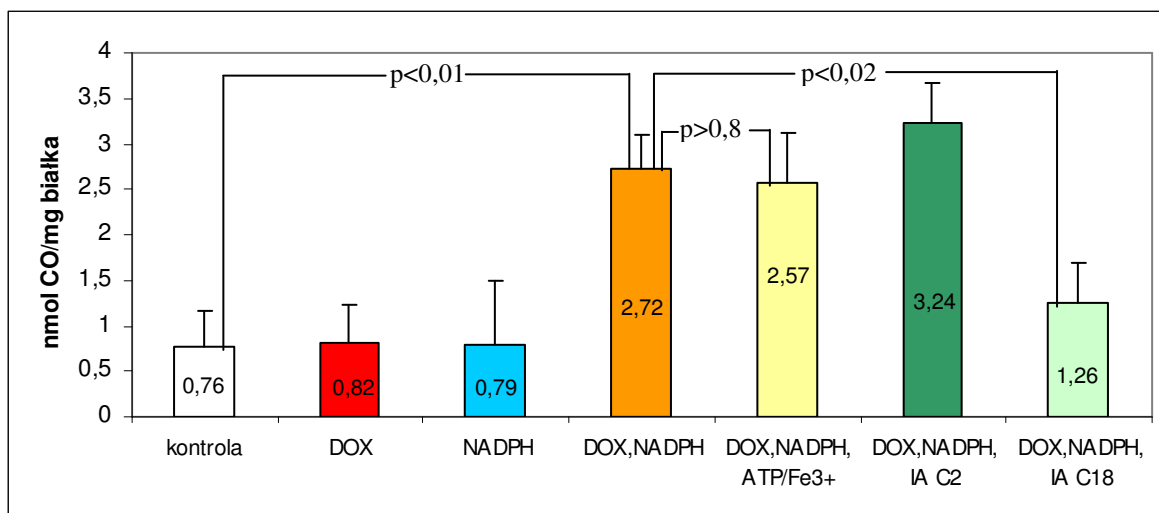


Rycina 21. Wpływ doksorubicyny, jonów żelaza oraz antyoksydantów na poziom MDA+4-HNE oznaczony w mitochondriach izolowanych z serc chomików (śr. \pm SEM, stężenie poszczególnych odczynników w próbach: DOX - 0,1 mM, NADH – 1 mM, ATP/Fe³⁺ - 1 mM/10 μ M, IA C2 - 25 μ M, IA C18 - 25 μ M).

Nie wykazano wzrostu poziomu MDA+4-HNE (Rycina 21) oznaczonych w następujących próbach inkubacyjnych: zawierającej mitochondria i doksorubicynę, zawierającej mitochondria i NADH oraz w próbie, w której mitochondria inkubowane były jednocześnie z doksorubicyną oraz NADH. Wzrost poziomu MDA+4-HNE okazał się zależny od obecności jonów żelaza, i tak, w próbie inkubacyjnej zawierającej: mitochondria, doksorubicynę, NADH oraz Fe³⁺ wynosił $1,56 \pm 0,12$ nmol MDA+4-HNE/mg białka w porównaniu z kontrolą $0,47 \pm 0,12$ nmol MDA+4-HNE/mg białka.

Aromatyczny aminooksyl indolinowy z dwuwęglowym łańcuchem bocznym (IA C2) hamował wzrost poziomu MDA+4-HNE indukowany obecnością doksorubicyny, NADH i jonów żelaza. Aminooksyl IA C18 nie wpływał statystycznie istotnie na poziom MDA+4-HNE w analogicznych warunkach.

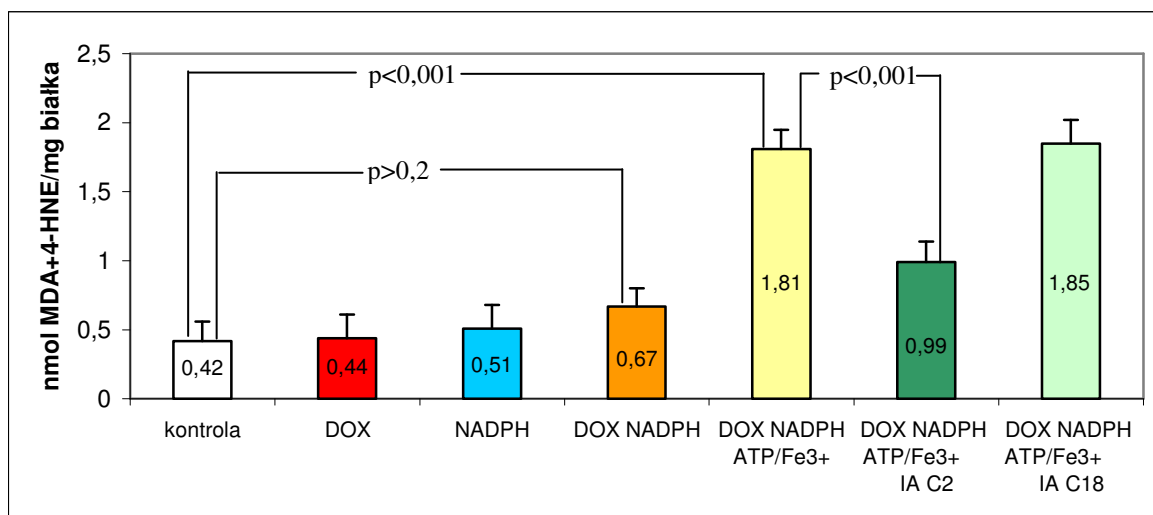
6.2.2. Poziom grup karbonylowych i MDA+4-HNE w mikrosomach



Rycina 22. Wpływ doksorubicyny, jonów żelaza oraz antyoksydantów na poziom grup karbonylowych oznaczony w mikrosomach izolowanych z serca chomików (śr. \pm SEM, stężenie poszczególnych odczynników: DOX - 0,1 mM, NADPH – 1 mM, ATP/Fe³⁺ - 1 mM/10 μ M, IA C2 - 25 μ M, IA C18 - 25 μ M).

Stwierdzono statystycznie istotne różnice zarówno w poziomie grup CO (Rycina 22) jak i MDA+4-HNE (Rycina 23) oznaczonych w mikrosomach izolowanych z mięśnia serca chomika.

Poziom grup karbonylowych w próbie inkubacyjnej mikrosomów w obecności doksorubicyny i NADPH wzrastał do wartości $2,72 \pm 0,37$ nmol CO/mg białka w porównaniu z kontrolą $0,76 \pm 0,36$ nmol CO/mg białka. Dodane do próby inkubacyjnej jony żelaza Fe³⁺ nie wpłynęły statystycznie istotnie na wartość grup karbonylowych. Aromatyczny aminooksyl IA C18 hamował wzrost poziomu grup karbonylowych indukowany doksorubicyną i NADPH, natomiast IA C2 pozostawał bez wpływu na poziom grup karbonylowych w analogicznych warunkach.



Rycina 23. Wpływ dokсорубicyny, jonów żelaza oraz antyoksydantów na poziom MDA+4-HNE oznaczony w mikrosomach izolowanych z serc chomików (śr. \pm SEM, stężenie poszczególnych odczynników: DOX - 0,1 mM, NADPH – 1 mM, ATP/Fe³⁺ - 1 mM/10 μ M, IA C2 - 25 μ M, IA C18 - 25 μ M).

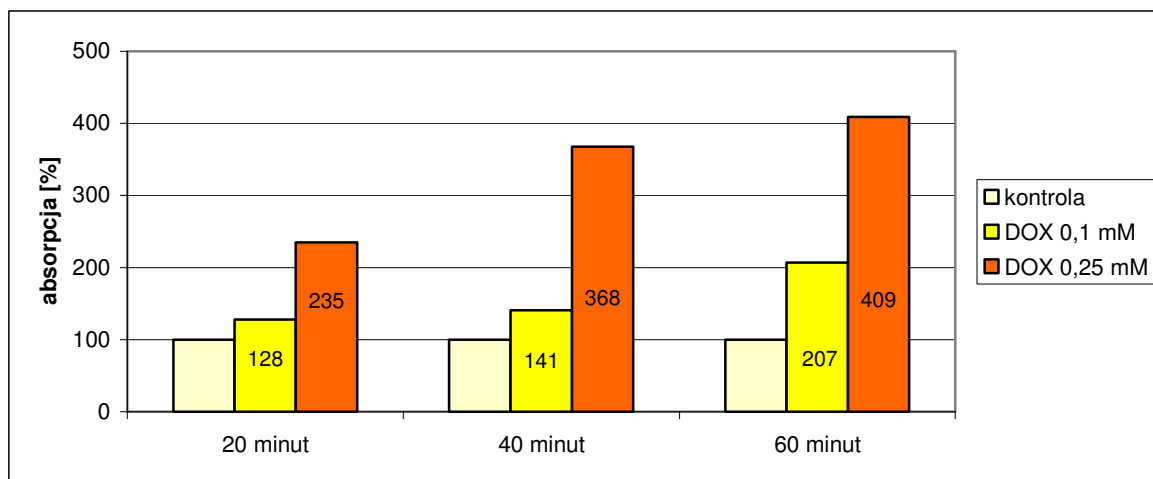
Poziom MDA+4-HNE oznaczony w mikrosomach izolowanych z serc chomików wzrastał w obecności dokсорубicyny, NADPH oraz jonów żelaza Fe³⁺ do wartości 1,81 \pm 0,14 nmol MDA+4-HNE/mg białka w porównaniu z kontrolą 0,42 \pm 0,14 nmol MDA+4-HNE/mg białka. W przypadku braku jonów żelaza w analogicznych warunkach nie zanotowano statystycznie istotnych zmian ($p > 0,2$) poziomu grup karbonylowych w porównaniu z grupą kontrolną.

Aminooksyl IA C2 hamował wzrost poziomu MDA+4-HNE indukowany dokсорубicyną zarówno w mitochondriach (Rycina 21) jak i mikrosomach (Rycina 23).

Aminooksyl IA C18 nie wykazywał wpływu na poziom MDA+4-HNE indukowany dokсорубicyną w mitochondriach (Rycina 21) ani w mikrosomach (Rycina 23), hamował natomiast wzrost poziomu grup CO zarówno w mitochondriach (Rycina 20) jak i w mikrosomach (Rycina 22).

6.3. Badania na bakteriach *E. coli* B178

6.3.1. Indukcja syntezy białka HtrA pod wpływem dokсорubicyny

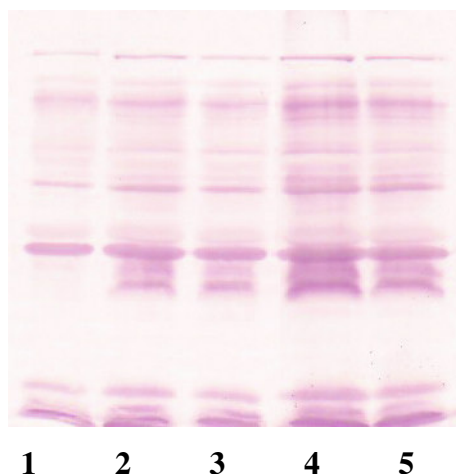


Rycina 24. Poziom białka HtrA w komórkach bakterii *E. coli* traktowanych dokсорubicyną.

Poziom białka HtrA w komórkach bakteryjnych oznaczono z zastosowaniem metody Western blotting stosując analizę densytometryczną immunoblotów. Poziom białka HtrA (Rycina 24) przedstawiono jako procentową wartość absorpcji każdego z prążków odpowiadających białku HtrA. Jako 100 % przedstawiono absorpcję prążka odpowiadającego poziomowi białka w komórkach nietraktowanych dokсорubicyną.

Dokсорubicyna spowodowała indukcję syntezy białka szoku termicznego, HtrA, już po 20 minutach, zarówno w stężeniu 0,25 mM jak i 0,1 mM, przy czym indukcja pod wpływem wyższego stężenia leku była większa, dwukrotna w porównaniu z kontrolą. Największą indukcję syntezy białka HtrA, obserwowano po 60 minutach traktowania bakterii dokсорubicyną w stężeniu 0,25 mM. Poziom białka wzrósł czterokrotnie w stosunku do kontroli.

6.3.2. Utlenianie białek błon bakteryjnych pod wpływem dokсорubicyny



Nr próby	
1	błony bakteryjne
2	błony bakteryjne + DOX (0,1 mM) + NADPH (1 mM)
3	błony bakteryjne + DOX (0,1 mM) + NADPH (1 mM) + IA C18 (25 μM)
4	błony bakteryjne + DOX (0,25 mM) + NADPH (1 mM)
5	błony bakteryjne + DOX (0,25 mM) + NADPH (1 mM) + IA C18 (25 μM)

Rycina 25. Poziom grup karbonylowych w białkach błon bakteryjnych izolowanych z komórek *E. coli* inkubowanych z dokсорubicyną.

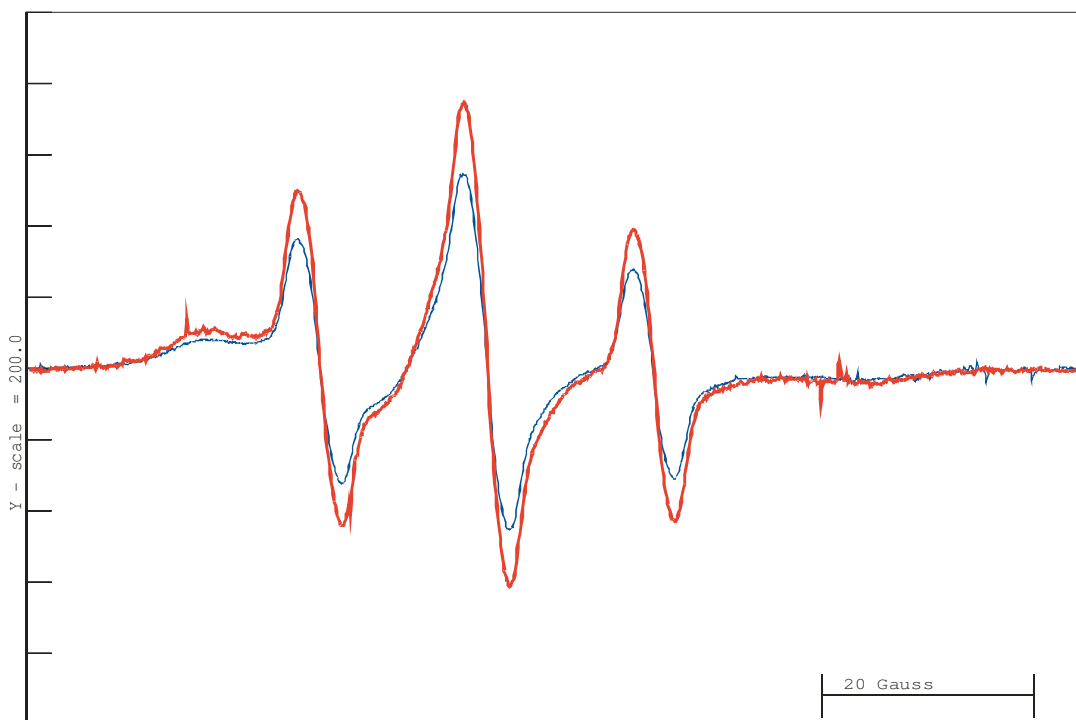
Fotografia przedstawia wyniki immunoblotingu z użyciem przeciwciał anti-DNP. Numerowi ścieżki odpowiada numer próby inkubacyjnej zgodnie z zamieszczoną tabelą. Każda ścieżka zawiera jednakową ilość białka a większa intensywność zabarwienia prążków oznacza wyższy poziom grup karbonylowych w odpowiedniej próbie inkubacyjnej.

Poziomy grup karbonylowych w próbach zawierających dokсорubicynę w stężeniach 0,25 mM (nr próby 4) jak i 0,1 mM (nr próby 2) w układzie NADPH-zależnym są wyższe w porównaniu z próbą kontrolną (nr próby 1). Wykazano również hamujący wpływ aminooksyła IA C18 na białka błon bakteryjnych przed zmianami oksydacyjnymi wywołanymi działaniem dokсорubicyny w przypadku obu zastosowanych stężeń: 0,1 mM w próbie nr 3 i 0,25 mM w próbie nr 5.

6.4. Analiza widm EPR w badaniach *in vitro*

Wyizolowane z serc chomików mitochondria (Rycina 26), mikrosomy (Rycina 27) oraz błony bakteryjne (Rycina 28) inkubowano w warunkach *in vitro* z doksorubicyną, a następnie znakowano znacznikiem spinowym, 3-MSL.

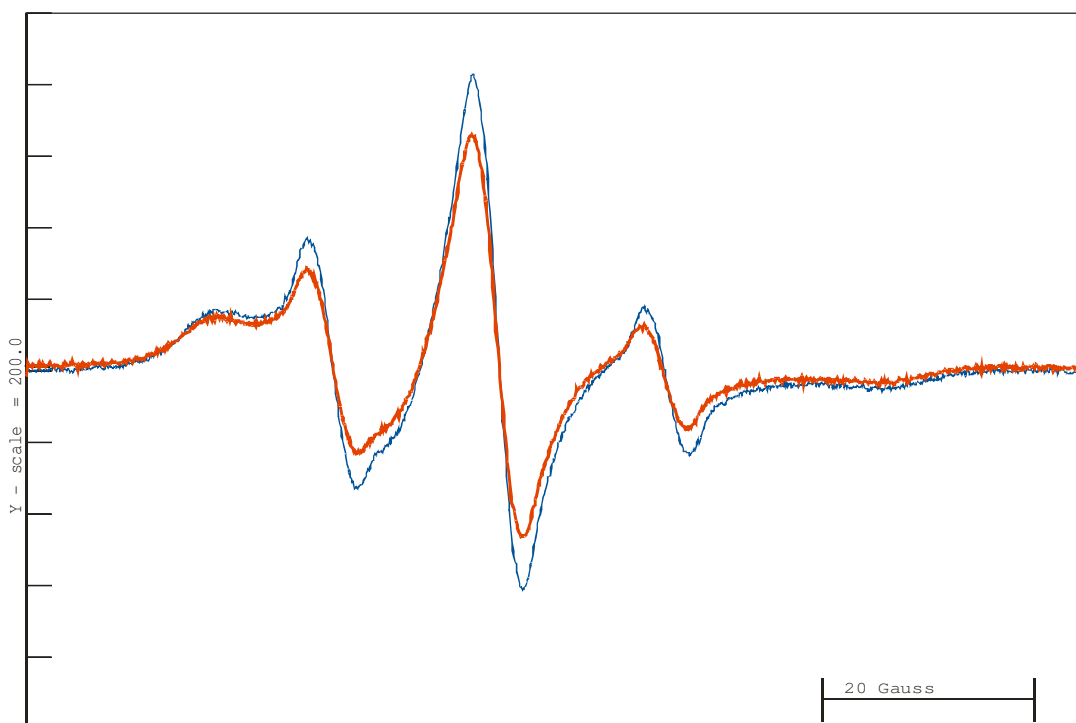
6.4.1. Widmo EPR znacznika spinowego związanego z białkami mitochondriów



— mitochondria - kontrola	$h_s/h_w=0,116$	$\tau_c=2,362 \times 10^{-8}s$
— mitochondria + DOX + NADH	$h_s/h_w=0,121$	$\tau_c=2,844 \times 10^{-8}s$

Rycina 26. Widmo EPR znacznika spinowego 3-MSL związanego z białkami mitochondriów inkubowanych z doksorubicyną (stężenia odczynników: DOX-0,1 mM, NADH-1 mM, warunki pomiaru: szerokość skanu: 100 Gaussów, centrum skanu 3376 G, modulacja 5 G, czas 2 min, stała czasowa 0,1 s.).

6.4.2. Widmo EPR znacznika spinowego związanego z białkami mikrosomów

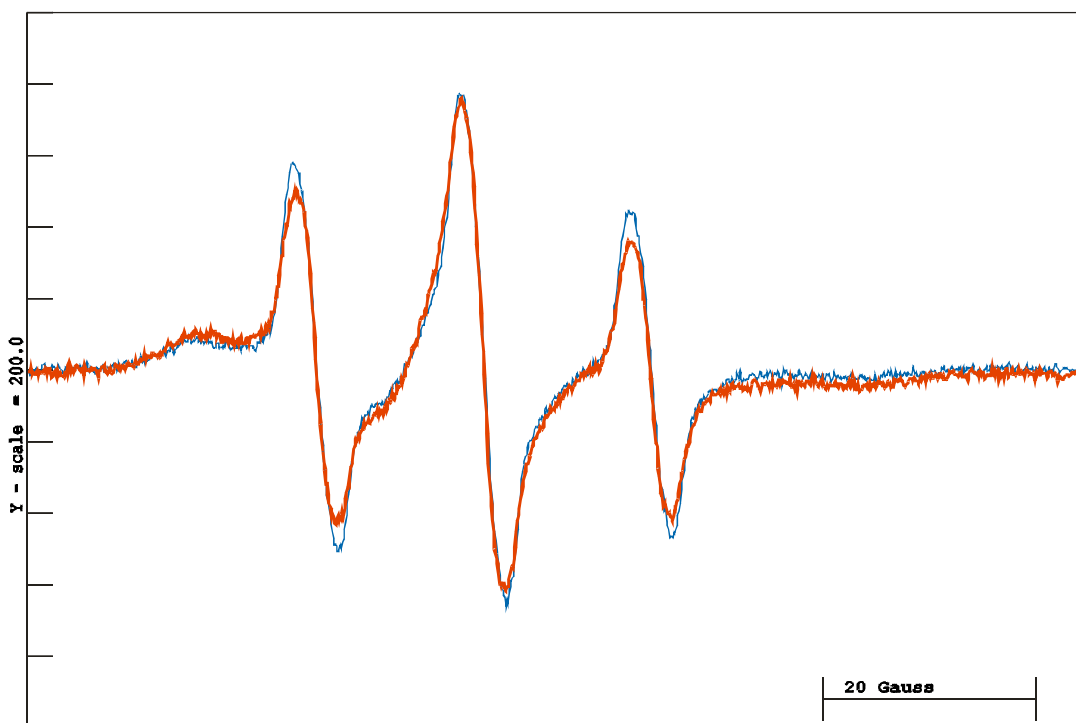


— mikrosomy - kontrola	$h_s/h_w=0,240$	$\tau_c=1,285 \times 10^{-9}s$
— mikrosomy + DOX + NADPH	$h_s/h_w=0,260$	$\tau_c=1,359 \times 10^{-9}s$

Rycina 27. Widmo EPR znacznika spinowego 3-MSL związanego z białkami mikrosomów inkubowanych z doksorubicyną (stężenia odczynników: DOX-0,1 mM, NADPH-1 mM, warunki pomiaru: szerokość skanu: 100 Gaussów, centrum skanu 3376 G, modulacja 5 G, czas 2 min, stała czasowa 0,1 s.).

Analiza widm znacznika spinowego związanego z białkami mitochondriów oraz mikrosomów (Rycina 26 i Rycina 27) wykazała różnice rozszczepionej składowej wysokopolowej prób kontrolnych w porównaniu z próbami badanymi. Interpretacja matematyczna parametru h_s/h_w przedstawiona na Rycinie 12, wykazała, że parametr h_s/h_w widma znacznika związanego z białkami mitochondriów inkubowanych z doksorubicyną i NADH wzrastał w porównaniu z kontrolą (Rycina 26) jak również wzrastał w przypadku mikrosomów inkubowanych z doksorubicyną i NADPH (Rycina 27). W obu przypadkach wzrastał również czas korelacji rotacyjnej τ_c .

6.4.3. Widmo EPR znacznika spinowego związanego z białkami błon bakteryjnych

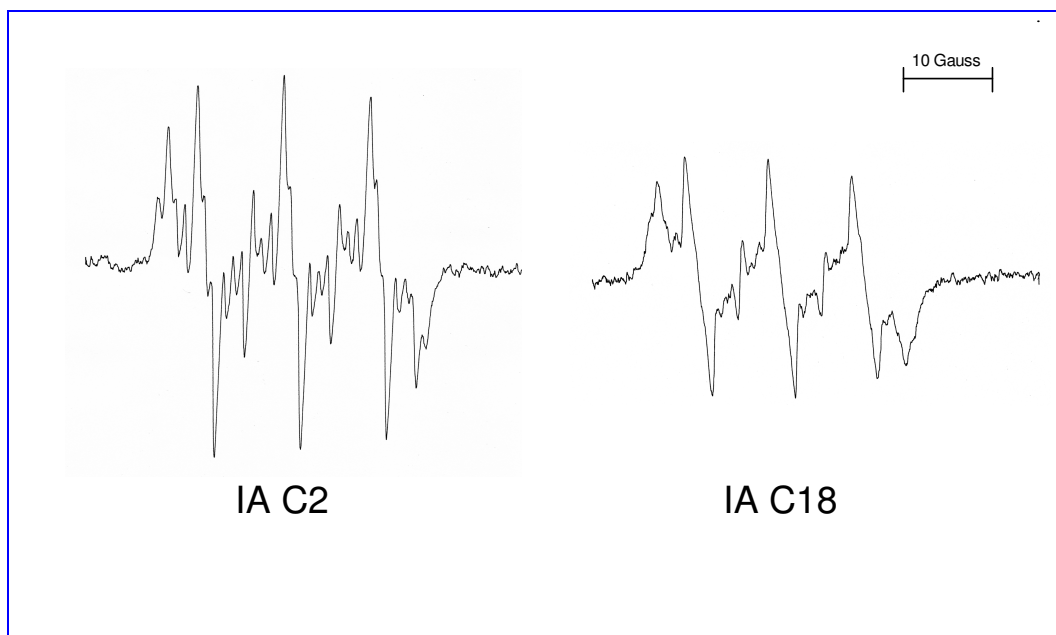


— błony bakteryjne - kontrolna	$h_s/h_w=0,079$	$\tau_c=3,904 \times 10^{-8}s$
— błony bakteryjne + DOX + NADPH	$h_s/h_w=0,127$	$\tau_c=4,204 \times 10^{-8}s$

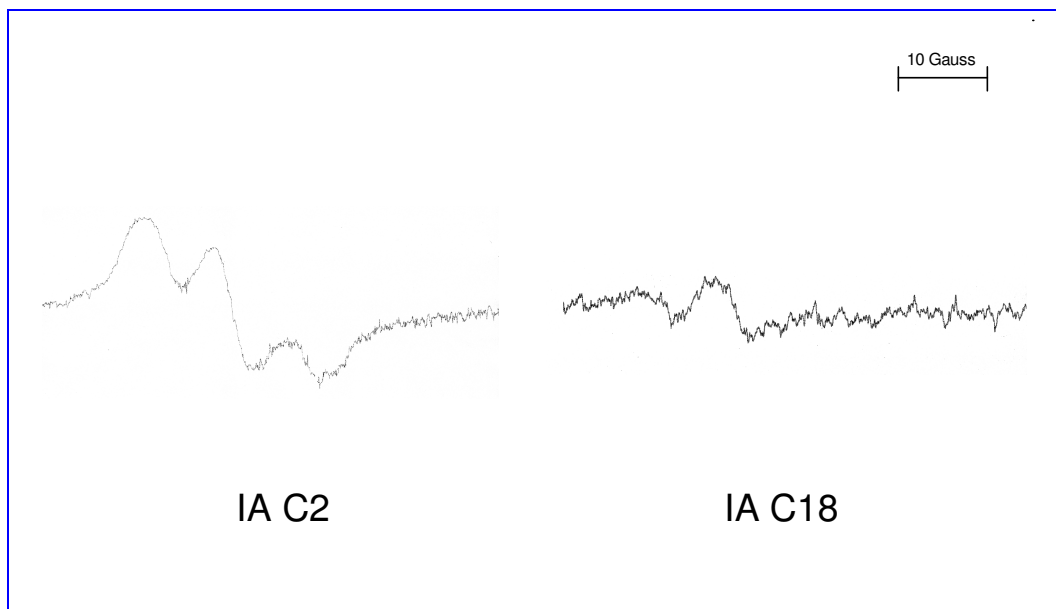
Rycina 28. Widmo EPR znacznika spinowego 3-MSL związanego z białkami błon bakteryjnych inkubowanych z dokсорubicyną, warunki pomiaru: szerokość skanu: 100 Gaussów, centrum skanu 3376 G, modulacja 5 G, czas 2 min, stała czasowa 0,1 s.).

Analiza widm znacznika spinowego związanego z białkami błon bakteryjnych wyizolowanych z bakterii *E. coli* inkubowanych z dokсорubicyną (Rycina 28) wykazała różnice rozszczepionej składowej wysokopolowej h_s/h_w . Wartość ta była wyższa w grupie badanej (0,127) w porównaniu z grupą kontrolną (0,079), wzrastał również czas korelacji rotacyjnej τ_c .

6.5. Analiza widm EPR aromatycznych aminooksylii IA C2 i IA C18



Rycina 29. Widma EPR aromatycznych aminooksylii IA C2 i IA C18 w etanolu.



Rycina 30. Widma EPR aromatycznych aminooksylii IA C2 i IA C18 w próbach zawierających wyizolowane mikrosomy.

Analiza widm EPR aminooksylii IA C2 i IA C18 w roztworach etanolowych (Rycina 29) wykazała, iż ich widma wykazują pełną strukturę nadsubtelną. Wynika to z

dużej dynamiki ruchu molekularnego oraz jego pełnej swobody przestrzennej. Mniej widoczna struktura nadsubtelna aminooksyla IA C18 wynika ze struktury cząsteczki (obecności 18-węglowego łańcucha bocznego) ograniczającej swobodę rotacji. Imobilizacja cząsteczki aminooksyla IA C18 i wymuszona anizotropia powoduje poszerzenie głównych składowych widma EPR co wiąże się z zanikiem większości składowych struktur nadsubtelnych.

Zmiana charakteru widm EPR IA C2 i IA C18 w próbach zawierających izolowane mikrosomy (Rycina 30) świadczy o wnikaniu tych cząsteczek w strukturę dwuwarstwy błony i imobilizowaniu cząsteczek. Imobilizacja IA C18 jest większa niż IA C2, ponieważ jest to cząsteczka o większej masie cząsteczkowej z 18-węglowym łańcuchem bocznym, który ogranicza swobodę rotacji i dyfuzję lateralną w błonie.

7. Dyskusja

Jednym z bardzo ważnych efektów ubocznych działania dokсорubicyny (DOX) jest szkodliwy wpływ na serce, a więc kardiotoksyczność limitująca jej zastosowanie. Stosowane są leki, które z mniejszym lub większym skutkiem hamują uboczne skutki DOX, jednakże do tej pory nie udało się znaleźć jednego skutecznego środka, który całkowicie hamowałby te efekty i skutecznie ochraniał mięsień serca, pozostając bez wpływu na aktywność przeciwnowotworową dokсорubicyny.

Aby skutecznie chronić mięsień serca przed dokсорubicyną należy najpierw dokładnie poznać mechanizm jej działania, stąd inspiracja do wykonanych przez mnie doświadczeń. Wielu autorów z różnych ośrodków naukowych na całym świecie, wciąż pracuje nad tym zagadnieniem, a wyniki ich prac publikowane są w licznych czasopismach naukowych. Patogeneza indukowanej dokсорubicyną kardiotoksyczności pozostaje jednak niejasna. Dotychczas nie udało się jednoznacznie określić mechanizmu działania DOX na mięsień serca, który tłumaczyłby przyczyny selektywnej kardiotoksyczności. Kardiotoksyczność nie jest wynikiem efektu przeciwnowotworowego dokсорubicyny¹⁸² i wiązania z kwasem DNA, ponieważ proliferacja komórek serca ulega zahamowaniu już w 2 miesiącu życia²⁹.

Istnieje wiele hipotez dotyczących kardiotoksyczności DOX, większość z nich opiera się na działaniu RFT, głównie wolnych rodników, powstających w konsekwencji reakcji jednoelektronowej redukcji dokсорubicyny i udziale jonów żelaza w reakcjach wolnorodnikowych^{190, 191}. Wolne rodniki i RFT są przyczyną niewydolności serca^{72, 192, 193}, a dokсорubicyna jest jednym z leków, obok np. bleomycyny¹⁹⁴, mogących generować wolne rodniki w warunkach *in vivo*⁶⁷ i *in vitro*¹⁹⁵. Szczególna podatność mięśnia serca na uszkodzenie dokсорubicyną może wynikać ze szczególnych własności bariery antyoksydacyjnej kardiomiocyta. Aktywności enzymów bariery antyoksydacyjnej serca są znacznie niższe w porównaniu z innymi narządami, np. wątrobą^{7, 166, 167}, czym można tłumaczyć większą podatność mięśnia serca na uszkodzenia wolnorodnikowe, w tym indukowane dokсорubicyną. W warunkach stresu oksydacyjnego dochodzi do uszkodzenia struktury i funkcji mięśnia serca^{96, 196}, co znajduje odzwierciedlenie również w badaniach biochemicznych¹⁹⁷.

Wykazano doświadczalnie na modelu zwierzęcym, że wolne rodniki i RFT^{198, 199, 200, 201} jak i DOX^{53, 202} są przyczyną niewydolności serca.

Model zwierzęcy jest powszechnie stosowany w badaniach nad uszkodzeniem mięśnia serca wywołanym doksorubicyną. Zastosowany został przez wielu autorów a zmiany hemodynamiczne²⁰³ i ultrastrukturalne²⁰⁴ zachodzące w sercu zwierząt laboratoryjnych (szczur, chomik, królik) pod wpływem działania DOX porównywalne były ze zmianami stwierdzanymi w sercu człowieka, co potwierdzono na podstawie biopłatów fragmentów serca pobranych od człowieka i zwierząt laboratoryjnych²⁰⁵.

Doksorubicyna jest przyczyną stresu oksydacyjnego w sercu i jak dowiedziono powoduje znaczący wzrost produkcji wolnych rodników niemal we wszystkich frakcjach subkomórkowych (mitochondriach, mikrosomach i cytozolu) izolowanych z mięśnia serca^{67, 206, 207} oraz nadekspresję białka, tioredoksyny, chroniącego przed stresem oksydacyjnym²⁰⁸.

Ocenę intensywności oksydacji białek i peroksydacji lipidów błonowych oparto odpowiednio na pomiarze poziomu grup karbonylowych (CO) oksydacyjnie zmodyfikowanych białek oraz poziomu dialdehydu malonowego i 4-hydroksy-2-nonenalu (MDA+4-HNE), końcowych produktów peroksydacji lipidów. Wartości oznaczonych poziomów grup karbonylowych i MDA+4-HNE porównywano z odpowiednimi grupami kontrolnymi.

Przydatność oznaczeń poziomu grup karbonylowych jako markera oksydacji białek jako pierwszy zaproponował Earl Stadtman¹⁴⁰. Wielu autorów^{209, 210, 211, 212} wykazało, że poziom białkowych grup karbonylowych rośnie w wyniku oksydacyjnych uszkodzeń białek i ma miejsce w przebiegu wielu chorób, m.in. młodzieńczego zapalenia stawów⁹¹.

Białka są celem ataku wolnych rodników i RFT. Mogą być uszkodzane przez czynniki zewnątrzkomórkowe (zewnątrkomórkowe źródła wolnych rodników) jak i wewnątrzkomórkowe (wewnątrzkomórkowe źródła RFT jakimi są, m.in. mikrosomalny i mitochondrialny układ transportu elektronów). Mitochondria są organellami ważnymi dla komórki i jako fizjologiczne centra energetyczne dostarczają energii potrzebnej do ich prawidłowego funkcjonowania. Tak więc, z jednej strony komórki zaopatrywane są w życiodajną energię, z drugiej jednak strony narażone są na atak wolnorodnikowy.

W wyniku oksydacji białek na skutek działania RFT następuje utlenianie grup aminowych reszt aminokwasowych do grup karbonylowych^{135, 137} (Rycina 32, str.77). Powstawanie grup karbonylowych w białkach oksydacyjnie zmodyfikowanych jest jednym z markerów oksydacji białek a ich obecność oraz ilość można oznaczyć na podstawie reakcji z 2,4-dinitrofenylohydrazyną^{186, 213}.

Peroksydacja lipidów jest procesem wolnorodnikowym polegającym na utlenianiu i degradacji nienasyconych kwasów tłuszczowych wchodzących w skład lipidów, m.in.

lipidów błonowych. Peroksydacja lipidów jest przyczyną wielu chorób, takich jak: miażdżyca, cukrzyca, ischemia i choroby neurodegeneracyjne²¹⁴.

Pomiar poziomu końcowych produktów peroksydacji lipidów, takich jak dialdehyd malonowy i 4-hydrokso-2-nonenal (MDA+4-HNE) jest ogólnie przyjętą i szeroko stosowaną metodą monitorowania stresu oksydacyjnego w tkankach²¹⁵. Zastosowana w części eksperymentalnej pracy metoda oznaczania poziomu MDA i 4-HNE, reagujących z N-metylo-2-fenylindolem, jest metodą swoistą i wyklucza reakcje z innymi związkami, np. cukrami, bilirubiną, jak to ma miejsce w przypadku oznaczeń w metodzie opierającej się na reakcji z kwasem tiobarbiturowym²¹⁶.

Powszechnie wiadomo, że celem ataku wolnych rodników są błony komórkowe, a największym efektem ich działania są zmiany właściwości błon indukowane peroksydacją lipidów i oksydacją białek. Spadek płynności błon w następstwie stresu oksydacyjnego wykazano na wielu liniach komórkowych i organellach komórkowych. Doksorubicyna wiąże się zarówno do lipidów błonowych²¹⁷ jak i białek błonowych²¹⁸.

W ramach niniejszej rozprawy poddano ocenie wpływ doksorubicyny na lipidy i białka błonowe organelli komórkowych izolowanych z mięśnia serca chomika oraz wpływ doksorubicyny na bakterie *Escherichia coli* B178, pomijając jej wpływ na kwasy nukleinowe. Wielu autorów neguje bowiem wpływ DOX na inne organelle komórkowe poza jądrem komórkowym. Andrew H-J Wang²¹⁹ podkreśla, że DOX wnikając do komórki przez błonę komórkową, dociera i wnika do jądra komórkowego, gdzie interkaluje z DNA, co potwierdza Chen²²⁰. Ażeby zbadać hipotezę o uszkodzeniu organelli kardiomiocyta wywołanym doksorubicyną część doświadczalna rozprawy została wykonana na mitochondriach i mikrosomach wyizolowanych z mięśnia serca, ze szczególnym uwzględnieniem zmian zachodzących w białkach. Niewiele jest prac na temat wpływu doksorubicyny na białka błonowe, większość dotyczy zmian na poziomie lipidów błonowych oraz lipoprotein osocza³⁹. Jeszcze mniej jest doniesień literaturowych opisujących wpływ doksorubicyny w układach *in vivo* i *in vitro* na błony izolowanych z mięśnia serca mitochondriów i mikrosomów.

Istotne z punktu widzenia energetyki każdej komórki, a w szczególności komórki mięśnia serca, jest prawidłowe funkcjonowanie mitochondriów, których objętość stanowi około 40 %²²¹ objętości komórki mięśnia serca. Mitochondria mogą być celem działania różnych leków, które mogą specyficznie wpływać na funkcjonowanie mitochondriów, lub takie, które działają w innym miejscu komórki, a na mitochondria mają wpływ pośredni, jak np. doksorubicyna²²².

Doświadczenia *in vivo* przeprowadzone na chomikach wykazały wpływ DOX na frakcję białkową błon komórkowych, oceniany na podstawie poziomu grup karbonylowych (Rycina 16 i Rycina 18). Nie wykazano natomiast zmian pod wpływem działania dokсорubicyny na frakcję lipidową błon organelli subkomórkowych izolowanych z mięśnia serca a ocenianych na podstawie poziomu MDA+4-HNE (Rycina 17 i Rycina 19).

Poziom grup karbonylowych oznaczony we frakcji postjądrowej izolowanej z serc zwierząt, które otrzymały jednorazową dawkę DOX, 5 mg/kg m.c., wzrastał już po 10 minutach od podania leku (grupa II) a wartość ta nie zmieniała się w czasie do 30 minut od podania leku, tj w przedziale czasowym, w którym prowadzono eksperyment. Wartości poziomu grup CO w grupie II (oznaczenie po 10 minutach), w grupie III (oznaczenie po 20 minutach) i w grupie IV (oznaczenie po 30 minutach) nie różniły się istotnie statystycznie ($p>0,5$).

W mitochondriach i mikrosomach izolowanych z serc pobranych od chomików, po 10 minutach od podania jednorazowej dawki dokсорubicyny, 5 mg/kg m.c. również zanotowano podwyższony poziom grup karbonylowych (Rycina18). Wzrost poziomu grup CO w mitochondriach porównywalny był ze wzrostem poziomu grup CO w mikrosomach w odniesieniu do wartości oznaczonych w odpowiednich grupach kontrolnych.

Nie wykazano natomiast statystycznie istotnych różnic w poziomie MDA+4-HNE oznaczonych we frakcji postjądrowej (Rycina17) ani w mitochondrialnej i mikrosomalnej (Rycina 19) izolowanych z serc chomików, po jednorazowym podaniu dokсорubicyny w dawce 5 mg/kg m.c.

W przypadku oznaczeń biochemicznych we frakcji postjądrowej, materiałem badanym była frakcja postjądrowa uzyskana z preparatyki mięśnia serca pobranego od jednego chomika. W przypadku oznaczeń biochemicznych we frakcjach mitochondrialnej i mikrosomalnej preparatyce poddano serca pobrane od kilku chomików z grupy badanej i analogicznie z grupy kontrolnej. Metodę taką zastosowano, ponieważ uzyskanie wystarczającej ilości mitochondriów i mikrosomów z preparatyki jednego serca chomika, ważącego około 300 mg, jest wysoce problematyczne w sensie technicznym, w ilości wystarczającej do oznaczeń biochemicznych metodami, którymi się posłużyłam. Wydaje się jednak, że wyniki uzyskane na takim materiale są wiarygodne, ponieważ analogiczne oznaczenia przeprowadzono każdorazowo w obu grupach, tj. kontrolnej i badanej.

Najkrótszy czas od podania leku, po jakim inni autorzy pobierali tkanki i rejestrowali zmiany w poziomie MDA, wynosił 5 godzin²²³. Większość autorów oznaczenia biochemiczne wykonywała po 24 godzinach od podania dokсорubicyny¹⁵⁵. Ponadto

większość doniesień z piśmiennictwa skupia się jedynie na wpływie dokсорubicyny na lipidy błonowe, pomijając wpływ dokсорubicyny na białka błonowe. Trudno więc odnieść uzyskane wyniki do danych literaturowych. Niemniej zarejestrowane zmiany w poziomie grup karbonylowych, po tak krótkim czasie, po podaniu jednorazowej dawki leku mogą być istotnym wkładem w wyjaśnienie patomechanizmu kardiotoxyczności DOX, tym bardziej, że zmiany uzyskano we frakcjach: postjadrowej, mitochondrialnej i mikrosomalnej.

Wzrost poziomu grup karbonylowych w przeprowadzonych przeze mnie doświadczeniach *in vivo* świadczy o zmianach oksydacyjnych zachodzących we frakcji białkowej błon biologicznych organelli komórkowych izolowanych z mięśnia serca a indukowanych dokсорubicyną. A bardzo krótki czas, 10 minut, od podania leku, po jakim pojawia się wzrost poziomu grup karbonylowych, świadczy o wolnorodnikowym mechanizmie toksycznego działania dokсорubicyny na serce.

Jednoczesny brak zmian w poziomie MDA+4-HNE wskazuje na brak wpływu dokсорubicyny na lipidy błonowe w czasie do 30 minut od podania leku, tj. do czasu, w którym prowadzono oznaczenia. Nie wyklucza to jednak wpływu dokсорubicyny na lipidy błonowe, ponieważ zmiany na poziomie lipidów zachodzą, co potwierdzają dane literaturowe^{155, 224}. Wyniki wykonanych przeze mnie doświadczeń *in vivo* wskazywać mogą na białka błonowe jako pierwszy cel ataku dokсорubicyny. Zaprzeczają również hipotezom, mówiącym, że oksydacja białek indukowana dokсорubicyną jest głównie następstwem peroksydacji lipidów²²⁵. W rozważaniach nad selektywnym, kardiotoxycznym, działaniem dokсорubicyny uwzględnia się działanie metabolitów tego leku na mięsień serca. Główny metabolit dokсорubicyny, dokсорubicynol, ma własności kardiotoxyczne i może powstawać w komórkach serca³². Serce nie jest głównym narządem odgrywającym rolę w metabolizmie dokсорubicyny, chociaż obecność dokсорubicynolu w komórkach serca może mieć znaczenie dla kardiotoxyczności DOX. Dokсорubicynol podobnie jak dokсорubicyna bierze udział w reakcjach, w których powstają wolne rodniki ale jego efektywność jest niższa. Brak zmian poziomu MDA+4-HNE do 30 minut od podania leku z dużym prawdopodobieństwem wyklucza zasadniczą rolę metabolitów dokсорubicyny w indukcji wczesnej kardiotoxyczności tj w przedziale czasu, w którym prowadzono eksperyment. Natomiast wzrost poziomu grup CO po tak krótkim czasie od podania DOX wskazuje na destrukcyjny charakter leku w stosunku do białek błonowych, co może odbywać się przy udziale rodnika semichinonowego dokсорubicyny (DOX^{\bullet}), powstającego w reakcji katalizowanej przez dehydrogenazę NADH- czy NADPH-zależną (Rycina 2, str. 7). Mitochondria serca w odróżnieniu do mitochondriów innych tkanek, posiadają enzym tzw.

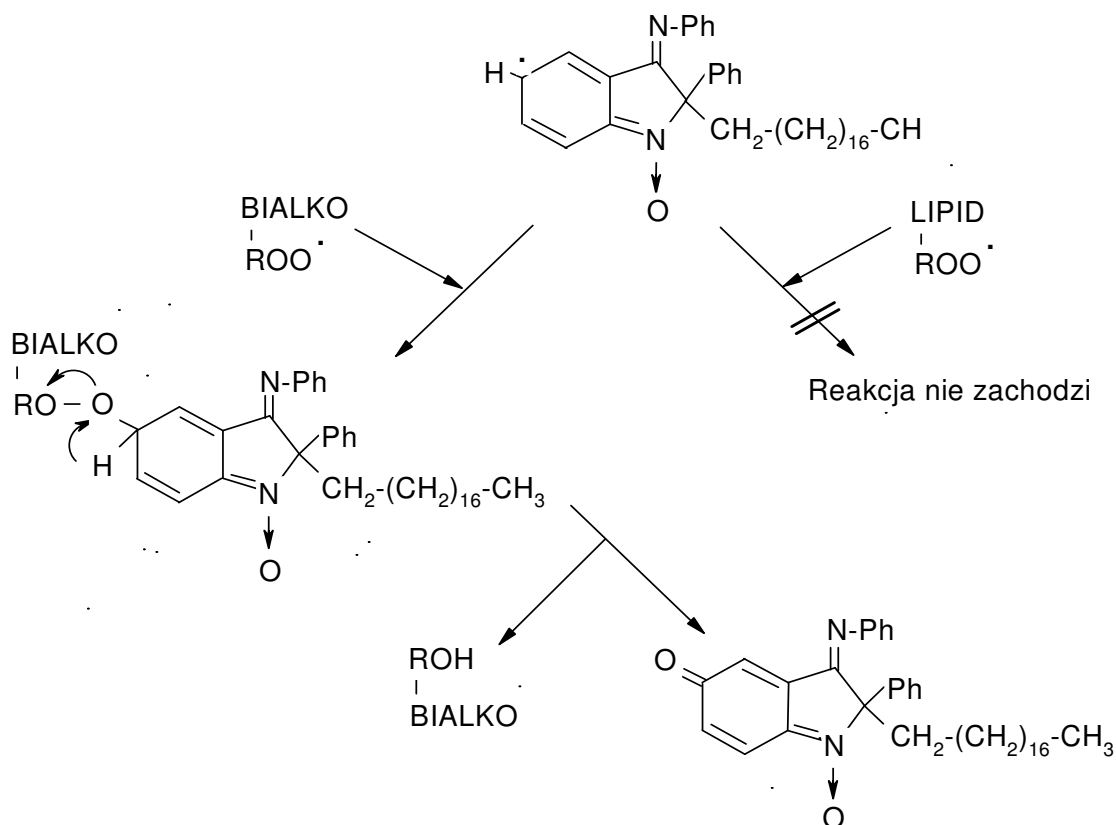
dehydrogenazę egzogenego NADH (z ang. exogenous NADH dehydrogenase), zlokalizowany w wewnętrznej błonie mitochondrialnej od strony przestrzeni międzybłonowej. Enzym ten przenosi elektrony z cytoplazmatycznego NADH na łańcuch oddechowy, może więc katalizować reakcję jednoelektronowej redukcji cząsteczki doksorubicyny (Rycina 2), co zwiększa ilość powstającego rodnika semichinonowego doksorubicyny w sercu. Odkrycie tego enzymu przez Hansa Nohla²²⁶ podkreśla znaczenie rodnika DOX[•] w kardiotoxyczności doksorubicyny.

Za bezpośrednim udziałem DOX[•] przemawiają również wyniki wykonanych doświadczeń w układzie *in vitro*, na wyizolowanych z mięśnia serca mitochondriach i mikrosomach. Doświadczenia *in vitro* eliminują w znaczącym stopniu możliwość konwersji doksorubicyny do jej metabolitów. W układzie *in vitro* rejestrowano wzrost poziomu grup karbonylowych w obecności DOX i NADH w mitochondriach (Rycina 20) jak i w obecności DOX i NADPH w mikrosomach (Rycina 22). Wzrost poziomu MDA+4-HNE (Rycina 21 i Rycina 23) miał miejsce w analogicznych warunkach z tą różnicą, że jony żelaza, okazały się niezbędne do katalizy procesu peroksydacji lipidów. Powyższe wyniki wskazują na inny patomechanizm uszkodzeń komponenty białkowej i lipidowej błon biologicznych indukowanych działaniem doksorubicyny.

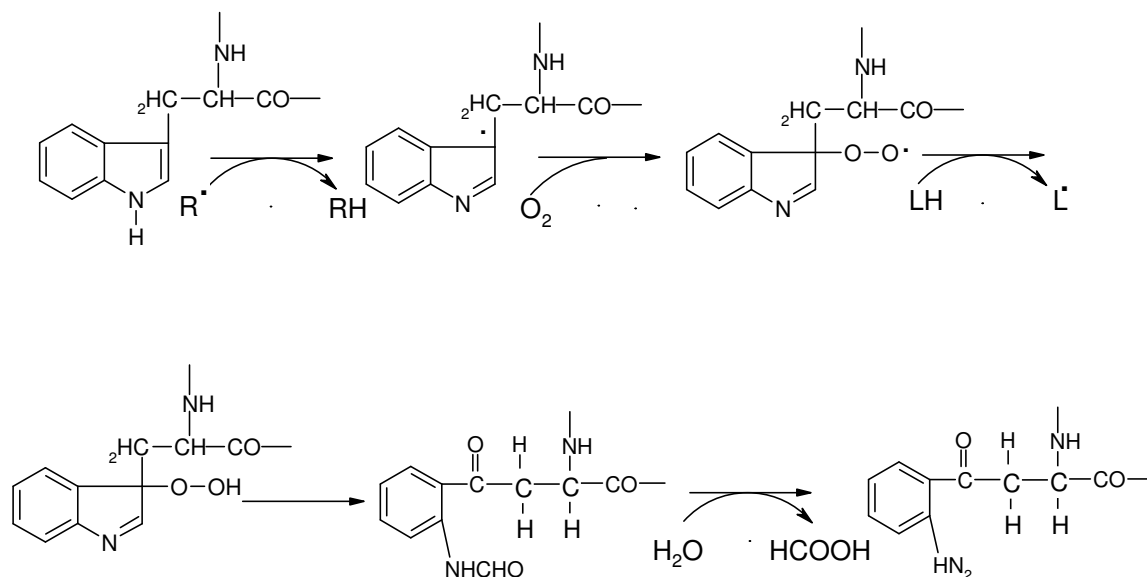
Zastosowany model doświadczalny błon bakteryjnych, miał na celu teoretyczne wyeliminowanie przebiegu procesu peroksydacji lipidów indukowanego doksorubicyną na proces oksydacji białek błonowych. Kardiolipina, fosfolipid błon komórek bakteryjnych, zawiera znikomą ilość nienasyconych kwasów tłuszczowych, w porównaniu do kardiolipiny błon mitochondriów oraz mikrosomów izolowanych z serca (Rycina 11), która zawiera około 90 %²²⁷ nienasyconych kwasów tłuszczowych. Na tak przygotowanym modelu doświadczalnym wykazano, że doksorubicyna prowadzi do wzrostu poziomu grup karbonylowych, markera oksydacji białek (Rycina 25) oraz zmian konformacyjnych białek błon bakteryjnych (Rycina 28). Wykazanie oksydacyjnych zmian komponenty białkowej błon bakteryjnych, indukowanych doksorubicyną, może wskazywać na niezależność procesu oksydacji białek od procesu peroksydacji lipidów. Białka najprawdopodobniej uszkodzane są przez rodnik semichinonowy doksorubicyny, natomiast potrzeba jonów żelaza do przebiegu peroksydacji lipidów (Rycina 21 i Rycina 23) wskazuje na udział innych czynników niż rodnik DOX[•], prawdopodobnie rodników będących pochodnymi tlenu, powstających w reakcjach wolnorodnikowych przebiegających z udziałem żelaza. W przypadku doświadczeń *in vivo* tak krótki czas jak 10 minut czy nawet 30 minut nie wystarczył na delokalizację żelaza z ferrytyny czy transferyny²²⁸, stąd przypuszczalnie brak

oznaczanych markerów peroksydacji lipidów. Nie można jednak wykluczyć udziału żelaza w procesie peroksydacji lipidów indukowanym dokсорubicyną. Dane literaturowe potwierdzają niezbędnosć jonów żelaza do przebiegu procesu peroksydacji lipidów^{229, 230} również indukowanego dokсорubicyną²³¹. Fakt, iż użycie związków kompleksujących jony żelaza^{232, 233} nie wpływa na obniżenie kardiotoksyczności dokсорubicyny może świadczyć o innym patomechanizmie toksyczności niż tylko peroksydacja lipidów. Udział peroksydacji lipidów w patomechanizmie kardiotoksyczności dokсорubicyny negują również wyniki badań biochemicznych wykonanych u pacjentów, którym podano dokсорubicynę i stwierdzono w sercu niższy poziom końcowych produktów peroksydacji lipidów w porównaniu z poziomem oznaczonym przed podaniem leku²³⁴.

W doświadczeniach *in vitro* użyto aromatycznych aminooksyli indolinowych IA C2 i IA C18 o udokumentowanych własnościach antyoksydacyjnych¹⁸⁸, jako narzędzia badawczego w procesie oksydacji białek i lipidów błonowych indukowanych dokсорubicyną. IA C2 wykazał efekt hamujący proces peroksydacji lipidów błonowych izolowanych mitochondriów oraz mikrosomów (Rycina 21 i Rycina 23) pozostając bez wpływu na oksydację białek błonowych. Natomiast związek IA C18, o dłuższym łańcuchu wodorowęglowym niż łańcuch IA C2, hamował oksydację białek błonowych (Rycina 20 i Rycina 22). Długość łańcucha wodorowęglowego wpływa na własności cząsteczki aminooksylii indolinowych. Analiza widm EPR IA C2 i IA C18 w błonach biologicznych (Rozdział Wyniki) wykazała większą immobilizację w strukturze dwuwarstwy błony mikrosomów, cząsteczki o dłuższym bocznym łańcuchu wodorowęglanowym (IA C18) w porównaniu z IA C2 o krótszym, dwuwęglowym łańcuchu bocznym. Zdolność IA C18 do wnikania w część hydrofobową (białkową) dwuwarstwy błony, umożliwia wykazanie się własnościami antyoksydacyjnymi w stosunku do białek błonowych. Hydrofobowe wnętrze białek błonowych tworzy domeny, bogate w reszty tryptofanu, aminokwasu szczególnie podatnego na wolnorodnikowe uszkodzenia²³⁵, w które to domeny może wnikać IA C18 i zapobiegać oksydacyjnym modyfikacjom aminokwasów wchodzących w skład białek błonowych (Rycina 31). Dokсорubicyna również wykazuje zdolność wnikania w strukturę błony²³⁶, a jak wynika z własności IA C18 rodnik dokсорubicyny (DOX[•]) preferencyjnie lokalizuje się we wnętrzu błony. Użycie IA C18 i jego działanie ochronne w przypadku oksydacji białek błonowych indukowanych DOX jest dowodem na toksyczne działanie DOX w stosunku do białek błonowych kardiomiocyta. Wydłużenie bocznego łańcucha wodorowęglowego ogranicza również skuteczność antyoksydacyjną na peroksydację lipidów (Rycina 31).



Rycina 31. Neutralizacja rodników białkowych przez długołańcuchową pochodną aromatycznego rodnika indolinowego.



Rycina 32. Schemat wolnorodnikowej konwersji tryptofanu do formy karbonylowej.

Do chwili obecnej nie rozstrzygnięto czy uszkodzenie białek w przypadku działania DOX jest konsekwencją procesów zachodzących na poziomie lipidów, czy też odwrotnie, uszkodzenie lipidów jest konsekwencją zmian na poziomie białek. W przypadku ischemii

mięśnia serca uszkodzenie białek może być wynikiem działania wodoronadtlenków lipidów powstających w przebiegu peroksydacji lipidów²³⁷.

Wykonane przez mnie doświadczenia wskazują raczej na niezależny patomechanizm uszkodzeń frakcji białkowej i lipidowej błon w obecności doksorubicyny.

Zastosowana w pracy technika spektroskopii elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR) z użyciem znaczników spinowych wprowadzona przez Ohnishi i McConnella w roku 1965²³⁸,²³⁹ służy do badań makrocząsteczek oraz struktur komórkowych. Technika ta, (ang. spin labeling), polega na wprowadzeniu do badanej struktury znacznika spinowego, związku posiadającego niesparowany elektron, a więc rodnika. Znaczniki spinowe stosowane w tej technice są związkami stabilnymi i mają charakterystyczne widmo EPR w roztworach wodnych lub alkoholowych. W zależności od ich budowy, część znaczników wbudowuje się w badaną strukturę, dzięki różnicy polarności, inne wiążą się kowalencyjnie do grup –SH białek, (nie wyklucza się również wiązania do grup -NH₂ białek), jak w przypadku zastosowanego w pracy znacznika spinowego, 3-MSL. Znaczniki spinowe nie wprowadzają żadnych zmian w badanej strukturze lub też zmiany te są na tyle niewielkie, że nie wpływają na interpretację wyników. Metoda EPR jest jedną z metod doświadczalnych, o bardzo wysokiej czułości, stosowanych w badaniach dynamiki białek, zmianach typu konformacyjnego²⁴⁰, oraz płynności błon komórkowych.

Zmiany typu konformacyjnego białek błonowych pod wpływem działania doksorubicyny oceniano na podstawie analizy widm EPR znacznika spinowego, 3-maleimidoproksylu, a analizie poddano parametr spektralny h_s/h_w , który jest bardzo czułym parametrem zmian typu konformacyjnego. Przyjmuje się, że amplituda linii h_s widma jest proporcjonalna do liczby molekuł znacznika, które w wyniku wiązania z białkiem uległy silnej immobilizacji, natomiast amplituda linii h_w widma jest proporcjonalna do ilości znacznika, który mimo wiązania zachował swobodę rotacji.

Zarejestrowane zmiany konformacyjne białek błon mitochondriów i mikrosomów oraz błon bakteryjnych pod wpływem działania doksorubicyny w układzie *in vitro*, a rejestrowane techniką EPR, korelowały ze zmianami w poziomie grup karbonylowych. Wartość parametru h_s/h_w wzrastała w błonach mitochondriów (Rycina 26), błonach mikrosomów (Rycina 27) oraz błonach bakteryjnych (Rycina 28) po inkubacji z doksorubicyną, jak również wzrastał poziom grup karbonylowych w badanych błonach w analogicznych warunkach (Rycina 20, Rycina 22 i Rycina 25). Iloraz h_s/h_w jest parametrem elektronowego rezonansu paramagnetycznego, odzwierciedlającym zmiany konformacyjne

białek błonowych indukowane stresem oksydacyjnym, korelujące ze zmianami poziomu grup karbonylowych, będącego wskaźnikiem, oksydacji białek^{241, 242}. Z prac Daviesa^{139, 144}, wynika, że wolne rodniki wpływają na zmianę struktury II i III rzędowej białka, a jest to konsekwencją modyfikacji oksydacyjnych struktury I rzędowej. Tak więc pośrednio można wnioskować na podstawie wyników doświadczeń, że dokсорubicyna modyfikuje białka, w tym białka błonowe. Można nawet wysunąć wniosek, że dokсорubicyna wpływa na strukturę III rzędową białek z izolowanych błon.

Interpretacji poddano również czas korelacji rotacyjnej (τ_c) znacznika spinowego, którego wartość wzrastała w błonach mitochondriów i mikrosomów oraz bakteryjnych w układzie *in vitro*. Wg niektórych autorów czas τ_c nie powinien być porównywany z tego względu, że jest to wartość wyliczona (uśredniona) wynikająca z czasu τ_c frakcji znacznika ściśle związanego z białkami i τ_c frakcji znacznika słabo związanego z białkami, nie jest więc wartością zmierzoną. Stąd lepszym parametrem porównań zmian wydaje się być parametr h_s/h_w , który zastosowano w pracy.

Dokсорubicyna wywołuje oksydację białek błon bakteryjnych izolowanych z bakterii *Escherichia coli*, co w konsekwencji powoduje zmiany konformacyjne białek. Podobny efekt zmian konformacyjnych białek obserwuje się w białkach błonowych mitochondriów i mikrosomów izolowanych z mięśnia serca.

Stosowane do tej pory zarówno klicznie jak i doświadczalnie kardiocytoprotektanty takie jak m. in.: kardioksan²³³, karwedilol²⁴³, probukol²⁴⁴, amboksol²⁴⁵, melatonina²⁴⁶, N-acetylocysteina²⁴⁷ nie całkowicie ochraniają komórki serca przed działaniem dokсорubicyny. Może wynikać to z mechanizmu działania tych związków, który polega raczej na hamowaniu procesu peroksydacji lipidów i braku większego wpływu na oksydację białka, zwłaszcza, jeżeli założymy, że uszkodzenie białek jest procesem niezależnym od peroksydacji lipidów, a tym bardziej jonów żelaza.

Praca miała na celu przybliżenie informacji na temat mechanizmu kardiotoxyczności dokсорubicyny, leku, który jest powszechnie stosowany w terapii przeciwnowotworowej. Doświadczenia zaprojektowano w taki sposób, aby wykazać, iż DOX wywołuje uszkodzenie błon biologicznych, przy czym komponenta białkowa jest głównym celem ataku dokсорubicyny. W tym celu w doświadczeniach *in vitro* posłużono się izolowanymi z mięśnia serca mitochondriami i mikrosomami, organellami subkomórkowymi zawierającymi w strukturze błony, oraz błonami bakteryjnymi, jako modelem błon subkomórkowych serca, ze względu na znaczna zawartość kardiolipiny. Kardiolipina błon komórek bakteryjnych, zawiera znikomą ilość nienasyconych kwasów

tłuszczowych, co w znacznym stopniu eliminuje możliwość przebiegu procesu peroksydacji lipidów, indukowanego doksorubicyną, nie eliminuje natomiast wiązania doksorubicyny do błon. Wykazanie zmian oksydacyjnych komponenty białkowej błon bakteryjnych, indukowanych doksorubicyną, może wskazywać na niezależność procesu oksydacji białek od procesu peroksydacji lipidów i prawdopodobny udział rodnika semichinonowego doksorubicyny w procesie oksydacji białek błonowych. Wykazanie z kolei zmian oksydacyjnych na poziomie białek już po 10 minutach od zakończenia podawania leku jest po pierwsze dowodem na wolnorodnikowy charakter uszkodzenia komponenty białkowej błon mitochondriów i mikrosomów izolowanych z mięśnia serca i jednym z pierwszych o ile nie pierwszym dowodem na potwierdzenie zmian zachodzących w sercu po tak krótkim czasie ekspozycji w warunkach *in vivo*. Zmiany na poziomie ultrastrukturalnym w sercu zwierząt laboratoryjnych również rejestrowano 10 minutach od podania leku (Rycina 12-materiał własny) co zgodne jest z danymi literaturowymi²⁴⁸.

8. Wnioski

1. Efekt działania utleniającego doksorubicyny na frakcję białek błonowych w układzie *in vivo* widoczny jest już po 10 minutach od dożylnego podania leku. W czasie do 30 minut od dożylnego podania doksorubicyny nie obserwuje się utleniającego działania leku na frakcję lipidów błonowych.
2. Wykonane doświadczenia wskazują, że procesy oksydacji białek i peroksydacji lipidów błon mitochondriów i mikrosomów izolowanych z mięśnia serca indukowane doksorubicyną w układzie *in vitro* są procesami niezależnymi. Użycie przeciwutleniaczy, aromatycznych aminooksylii indolinowych (IA C2 i IA C18) o selektywnych własnościach antyoksydacyjnych, potwierdza niezależność w/w procesów.
3. W układzie *in vitro* proces oksydacji białek mitochondriów i mikrosomów izolowanych z mięśnia serca jest niezależny od obecności jonów żelaza, wskazując na istotny udział rodnika semichinonowego doksorubicyny w indukowaniu stresu oksydacyjnego na poziomie frakcji białek błonowych.
4. Doksorubicyna wywołuje peroksydację lipidów mitochondriów i mikrosomów izolowanych z mięśnia serca w obecności jonów Fe^{3+} . Efekty te mogą być odpowiedzialne za kardiotoxyczość w warunkach przedłużonej ekspozycji na doksorubicynę.
5. Doksorubicyna wywołuje oksydację białek błon bakteryjnych izolowanych z bakterii *Escherichia coli*, co w konsekwencji powoduje zmiany konformacyjne białek. Podobny efekt zmian konformacyjnych białek obserwuje się w białkach mitochondriów i mikrosomów izolowanych z mięśnia serca.
6. W komórkach *Escherichia coli*, doksorubicyna indukuje syntezę białka szoku termicznego, HtrA, które odpowiedzialne jest za proteolizę oksydacyjnie zmienionych białek powstających w wyniku stresu oksydacyjnego.

7. Na podstawie wyników przeprowadzonych doświadczeń można wysunąć hipotezę, że przyczyną kardiotoksyczności dokсорubicyny jest bezpośredni, niezależny, wpływ rodnika semichinonowego dokсорubicyny na białka błon organelli subkomórkowych kariomiocytów.

9. Streszczenie

Doksorubicyna jest lekiem stosowanym w terapii przeciwnowotworowej mimo jej kardiotoksycznego działania. Stosowana jest od początku lat 70-tych i do tej pory nie udało się określić jednoznacznie mechanizmu toksycznego działania na serce, mimo iż istnieje wiele hipotez na ten temat. Wiele prac doświadczalnych i klinicznych wskazuje na istotny udział reakcji wolnorodnikowych w uszkodzeniu lipidów błonowych, mniej uwagi przywiązuje się do znaczenia uszkodzeń białek błonowych.

Celem pracy było wykazanie, iż doksorubicyna jest przyczyną peroksydacji lipidów i oksydacji białek błonowych, a procesy te przebiegają niezależnie, ze wskazaniem na bezpośrednią rolę rodnika semichinonowego doksorubicyny w uszkodzeniu, oraz uzyskanie efektu destrukcyjnego działania na komponentę białkową błon w jak najkrótszym czasie od podania doksorubicyny *in vivo*.

Doświadczenia *in vivo* wykonano na zwierzętach, którym podano doksorubicynę, a następnie pobierano serca, z których izolowano frakcję postjądrową, mitochondrialną i mikrosomalną.

W doświadczeniach przeprowadzonych *in vitro* inkubowano z doksorubicyną wyizolowane z serc zwierząt mitochondria i mikrosomy oraz wyizolowane z bakterii *E. coli* błony bakteryjne.

W doświadczeniach mierzono markery stresu oksydacyjnego, grupy karbonylowe (marker oksydacji białek) i MDA+4-HNE (marker peroksydacji lipidów).

Zarówno w doświadczeniach *in vitro* jak i *in vivo* uzyskano efekt stresu oksydacyjnego wywołany działaniem doksorubicyny. W układzie *in vivo* poziom grup karbonylowych wzrastał istotnie statystycznie już po 10 minutach od podania doksorubicyny w dawce 5 mg/kg m.c., natomiast poziom MDA+4-HNE pozostawał bez zmian.

W doświadczeniach *in vitro* wykonanych na wyizolowanych mitochondriach i mikrosomach inkubowanych z doksorubicyną wykazano niezbędność jonów żelaza do przebiegu procesu peroksydacji lipidów, podczas gdy oksydacja białek okazała się procesem niezależnym od obecności żelaza.

Doświadczenia wykonano również na komórkach *Escherichia coli* B178 *in vivo* oraz wyizolowanych błonach bakteryjnych *in vitro* jako układzie biologicznym, charakteryzującym się obecnością proteaz homologicznych do proteaz znajdujących się w komórkach człowieka oraz znaczną ilością kardiolipiny.

Na podstawie wyników doświadczeń można wysunąć przypuszczenie, iż białka uszkodzane są bezpośrednio przez rodnik semichinonowy doksorubicyny, natomiast niezbędność jonów żelaza w inicjowaniu procesów utlenienia lipidów błon wskazuje na udział innych RFT.

Na podstawie zmian widma EPR znacznika spinowego, 3-MSL, wykazano zmiany konformacyjne białek błonowych po działaniu doksorubicyny.

Zastosowane syntetyczne aminooksyle indolinowe o udokumentowanych właściwościach antyoksydacyjnych skutecznie hamowały oksydację białek i peroksydację lipidów wywołane doksorubicyną, aminooksyl IA C2 działał selektywnie protekcyjnie w stosunku do lipidów, IA C18 zaś selektywnie hamował oksydację białek.

Na podstawie wyników przeprowadzonych doświadczeń można wysunąć hipotezę, że przyczyną kardiotoxyczności doksorubicyny jest bezpośredni, niezależny, wpływ rodnika semichinonowego doksorubicyny na białka błon organelli subkomórkowych kariomiocytów.

10. Piśmiennictwo

- 1 Al-Harbi A.M., Al-Gharably N.M., Al-Shabanah O.A., Al-Bekairi A.M., Osman A.M., Tawfik H. N. (1992) Prevention of doxorubicin-induced myocardial and hematological toxicities in rats by the iron chelator desferrioxamine, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 31, 200-204
- 2 Ewer M.S., Ali M.K., Mackay B., Wallance S., Valdivieso M., Legha S.S., Benjamin R.S., Haynie T.P. (1984) A comparison of cardiac biopsy grades and ejection fraction estimations in patients receiving adriamycin, *J. Clin. Oncol.* 2, 112-117
- 3 Wallace K.B. (2003) Doxorubicin-induced cardiac mitochondriopathy, *Pharmacology & Toxicology* 93, 105-115
- 4 Wiess Raymond B. (1992) The anthracyclines: will we ever find a better doxorubicin? *Seminars in Oncology* 19, 670-686
- 5 Turrens J.F., Alexandre A., Lehninger A.L. (1985) Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria, *Archiv. Biochem. Biophys.* 237, 408-414
- 6 Doroshow J.H. (1981) Mitomycin C-enhanced superoxide and hydrogen peroxide, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 218, 206-211
- 7 Thayer W.S. (1977) Adriamycin stimulated superoxide formation in submitochondrial particles, *Chem. Biol. Interact.* 19, 265-278
- 8 Vasquez-Vivar J., Martasek P., Hogg N., Silver Master B.S., Pritchard K.A., Kalyanaraman B. (1997) Sarcothelial nitric oxide synthase-dependent superoxide generation from adriamycin, *Biochemistry* 36, 11293-11297
- 9 Griffith O.W., Stuehr D.J. (1995) Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism, *Annu. Rev. Physiol.* 57, 707-737
- 10 Davies K.J.A., Doroshow J.H. (1986) Redox cycling of anthracyclines by cardiac mitochondria. I. Anthracycline radical formation by NADH dehydrogenase, *J. Biol. Chem.* 261, 3060-3067
- 11 Doroshow J.H., Davies K.J.A. (1986) Redox cycling of anthracyclines by cardiac mitochondria, II. Formation of superoxide anion, hydrogen peroxide and hydroxyl radical, *J. Biol. Chem.* 261, 3068-3074
- 12 Ebewe Pharmaceutical LTD., Doxorubicin-Ebewe, informacja naukowa o leku
- 13 Krischer J.P., Epstein S., Cuthbertson D.D., Goorin A.M., Epstein M.L., Lipshultz S.E. (1997) Clinical cardiotoxicity following anthracycline treatment for childhood cancer: the pediatric oncology group experience, *J. Clin. Oncol.* 15, 1544-1552

-
- 14 Burgert E.O., Nesbit M.E., Garsney L.A., Ghan E.A., Herrmann J., Vietti T.J., Cangir A., Tefft M., Evans R., Thomas P., Askin F.B., Kissane J.M., Pritchard D.J., Neff J., Makley J.T., Gilula L. (1990) Multimodal therapy for the management of nonpelvic, localized Ewing's sarcoma of bone: intergroup study IESS-II, *J. Clin. Oncol.* 8, 1514-1524
 - 15 Pieńkowski T., Jaśkiewicz J., Wronkowski Z., Zwierno M., Załucki W. (2000) Leczenie raka piersi, *Śłużba zdrowia*, 24-26, 2917-2919
 - 16 Tewey K.M., Rowe T.C., Yang L., Halligan B.D., Liu L.F. (1984) Adriamycin-induced DNA damage mediated by mammalian DNA topoisomerase II, *Science* 226, 446-468
 - 17 Drlica K., Franco R.J. (1988) Inhibitors of DNA topoisomerases, *Biochemistry* 27, 2253-2259
 - 18 Spadari S., Arcamone F. (1986) DNA polymerase and DNA topoisomerase as a targets for the development of anticancer drugs, *Anticancer Res.* 6, 935-940
 - 19 Booser D.J., Hortobagyi G.N. (1994) Anthracycline antibiotics in cancer therapy, *Drugs* 47, 223-258
 - 20 Potmesil M., Izrael M., Silber R. (1984) Two mechanisms of adriamycin-DNA intercalation in L1210 cells, *Biochem. Pharmacol.* 33, 3137-3142
 - 21 Traganos F., Kapuscinski J., Darzynkiewicz Z. (1991) Caffeine modulates the effects of DNA-intercalating drugs in vitro: a flow cytometric and spectrophotometric analysis of caffeine interaction with novantrone, doxorubicin, ellipticine and the doxorubicin analogue AD198, *Cancer Research* 51, 3682-3689
 - 22 Lee Y-T.N., Chan K.K., Harris P.A., et al. (1980) Distribution of adriamycin in cancer patients: tissues uptakes, plasma concentration after i.v. and hepatic i.a. administration, *Cancer Res.* 45, 2231-2239
 - 23 Polskie Towarzystwo Urologiczne (2002), *Zasady postępowania u chorych na raka pęcherza moczowego*, Warszawa 2002
 - 24 Ozols RF. (1982) Phase I and pharmacological studies of adriamycin administered intraperitoneally to patients with ovarian cancer, *Cancer Res.* 42, 4265-4269
 - 25 Matzel W., Buchel O. (1987) Diffuse malignant mesothelioma of the pleura: intrapleural treatment with doxorubicin, *Arch. Geschwulstforsch* 57, 209-218- abstrakt
 - 26 Tarasiuk J., Frezard F., Garnier-Suillerot A., Gattegno L. (1989) Anthracycline incorporation in human lymphocytes. Kinetics of uptake and nuclear concentration, *Biochim. Biophys. Acta* 1013,109-117
 - 27 Müller I., Jenner A., Bruchelt G., Niethammer D, Halliwell B. (1997) Effect of concentration on the cytotoxic mechanism of doxorubicin - apoptosis and oxidative DNA damage, *BBRC* 230, 254-257

-
- 28 Peters J.H., Gordon G.R., Kashiwase D., Acton E.M. (1981) Tissue distribution of doxorubicin and doxorubicinol in rats receiving multiple doses of doxorubicin, *Cancer. Chemother. Pharmacol.* 7, 65
- 29 De Beer E.L., Bottone A.E., Voest E.E. (2001) Doxorubicin and mechanical performance of cardiac trabeculae after acute and chronic treatment: a review, *European Journal of Pharmacology* 415, 1-11
- 30 Figueiredo-Pereira M.E., Chen W.E., Li J., Johdo O. (1996) The antitumor drug aclacinomycin A, which inhibits the degradation of ubiquitinated proteins, shows selectivity for the chymotrypsin-like activity of the bovine pituitary 20S proteasome, *J. Biol. Chem.*, 28, 16455-16459
- 31 Kiyomiya K., Matsuo S., Kurebe M. (2001) Mechanism of specific nuclear transport of adriamycin: the mode of nuclear translocation of adriamycin-proteasome complex, *Cancer Research* 61, 2467-2471
- 32 Mordente A., Minotti G., Martorana G.E., Silvestrini A., Giardina B., Meucci E. (2003) Anthracycline secondary alcohol metabolite formation in human or rabbit heart: biochemical aspects and pharmacologic implications, *Biochemical Pharmacology*, 66, 989-998
- 33 Speth P.A.J., van Hoesel Q.G.C.M., Haanen C. (1988) Clinical pharmacokinetics of doxorubicin, *Clinical Pharmacokinetics* 15, 15-31
- 34 Sacco G., Giampietro R., Salvatorelli E., Menna P., Bertani N., Graiani G., Animati F., Goso C., Maggi C.A., Manzini S., Minotti G. (2003) Chronic cardiotoxicity of anticancer anthracyclines in the rat: role of secondary metabolites and reduced toxicity by novel anthracycline with impaired metabolite formation and reactivity, *Br. J. Pharmacol.* 139, 641-651
- 35 Iliskovic N., Singal P.K. (1997) Lipid lowering: an important factor in preventing adriamycin-induced heart failure, *Am. J. of Path.* 150, 727-734
- 36 Washio M., Nanishi f., Okuda S., Onoyama K., Fujishima M. (1994) Alpha tocopherol improves ocal glomerulosclerosis in rats with adriamycin-induced progressive renal failure, *Nephron* 68, 347-352
- 37 Mimnaugh E.G., Trush M.A. Gram T.E. (1986) A possible role for membrane lipid peroxidation in anthracycline nephrotoxicity, *Biochemical Pharmacology* 35, 4327-4335
- 38 Görgün M., Erdogan D., Abban G., Türközkan N., Elbeg S. (1999) Effect of vitamin E on adriamycin-induced nephrotoxicity at the ultrastructural level in guinea pigs, *Nephron* 82, 155-163
- 39 Joles A., van Tol A., Jansen .H.J.M., Koomans H.A., Rabelink T.J., Grond J., van Goor H. (1993) Plasma lipoproteins and renal apolipoproteins in rats with chronic adriamycin nephrosis, *Nephrology Dialysis Transplantation* 8, 831-838

-
- 40 Schinetti M.L., Rossini D., Bertelli A. (1987) Interaction of anthracycline antibiotics with human neutrophils: superoxide production, free radical formation and intracellular penetration, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 113, 15-19
- 41 Shan K., Lincoff M., Young J.B. (1996) Anthracycline-induced cardiotoxicity, *Ann. Intern. Med.* 126, 47-58
- 42 Diwakar J. (2000) Cardiotoxicity of doxorubicin and other anthracycline derivatives, *J. Nucl. Cardiol.* 7, 53-62
- 43 Birtle A.J. (2000) Anthracyclines and cardiotoxicity, *Clinical Oncology* 12, 146-152
- 44 Wortman J.E., Virgil S.L., Pharm B.S., Schuster E., Thiele D., Logue G.L (1979) Sudden death during doxorubicin administration, *Cancer* 44, 1588-1591
- 45 Nousiainen T., Vanninen E., Jantunen E., Remes J., Kuikka J., Hartikainen J. (2001) Anthracycline-induced cardiomyopathy: long-term effects on myocardial cell integrity, cardiac adrenergic innervation and fatty acid uptake, *Clinical Physiology* 21, 1, 123-128
- 46 Steinhertz L.J., Steinherz P.G., Tan Ch.T., Heller G., Murphy M.L. (1991) Cardiac toxicity 4 to 20 years after completing anthracycline therapy, *JAMA* 266, 1672-1677
- 47 Ward K.M., Canter C.E., Webber S.A., Chin C., Pahl E. (2002) Anthracycline cardiomyopathy and pediatric heart transplantation, *The Journal of Heart and Lung Transplantation* 21, 64-65
- 48 Bristow M.R., Thompson P.D., Martin R.P., Mason J.W., Billingham M.E., Harrison D.C. (1978) Early anthracycline cardiotoxicity, *Am. J. Med.* 65, 823-832
- 49 Minow R.A., Benjamin R.S., Lee E.T., Gottlieb J.A. (1977) Adriamycin cardiomyopathy-risk factor, *Cancer* 39, 1397-1402
- 50 Gottlieb J.A., Lefrak E.A.P.M., Burgess M.A. (1973) Fatal adriamycin cardiomyopathy. Prevention by dose limitation, *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* 14, 88
- 51 Lefrak E.A., Pitha J., Rosenhein S., Gottlieb J.A. (1973) A clinical pathological analysis of adriamycin cardiotoxicity, *Cancer* 32, 302-314
- 52 Von Hoff DD., Layard M.W., Basa P., Davis H.L., von Hoff A.L., Rozenzweig M., Muggia F.M. (1979) Risk factors for doxorubicin-induced congestive heart failure, *Ann. Intern. Med.* 91, 710-717
- 53 Singal P.K., Iliskovic N. (1998) Doxorubicin-induced cardiomyopathy, *The New England Journal of Medicine* 339, 900-905
- 54 Wassmuth R., Lentzsch S., Erdbruegger U., Schulz-Menger J., Doerken B., Dietz R., Friedrich M.G. (2001) Subclinical cardiotoxic effects of anthracyclines as assessed by magnetic resonance imaging-a pilot study, *Am. Heart J.* 141, 1007-10013

-
- 55 Liczmański (1988) Toksyczność tlenu. I. Uszkodzenia żywych komórek, *Post. Biochemii* 34, 273-291
- 56 Liczmański (1988) Toksyczność tlenu. II. Mechanizmy ochronne, *Post. Biochemii* 34, 293-310
- 57 Di Piero V., Cappagli M., Pastena L., Faralli F., Mainardi G., Di Stani F., Bruti G., Coli A., Lenzi G.L., Gagliardi R. (2002) Cerebral effects of hyperbaric oxygen breathing: a CBF SPECT study on professional divers, *European Journal of Neurology* 9, 419-421
- 58 Neuzil J., Rayner B.S., Lowe H.C., Witting P.K. (2005) Oxidative stress in myocardial ischemia reperfusion injury: a renewed focus on a long-standing area of heart research, *Redox Rep.* 10, 187-194
- 59 McCord J.M (1985) Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury, *The New England Journal of Medicine* 312, 159-163
- 60 Gerschman R., Gilbert D.L., Nye S.W., Dwyer P., Fenn W.O. (1954) Oxygen poisoning and X-irradiation: a mechanism in common, *Science* 119, 623-626
- 61 Fridovich Irvin (1975) Superoxide dismutases, *Ann. Rev. Biochem.* 44, 147-159
- 62 Fridovich Irvin (1978) The biology of oxygen radicals, *Science*, 201, 875-880
- 63 Jakubaszko J., Niewińska K. (2002) Wstępne leczenie ostrych zatruc na oddziale ratunkowym, 2002 Urban&Partner
- 64 <http://www.hiperbaria.gdynia.pl/Oxynet-PL.htm>
- 65 Sullivan (1988) Iron, plane? Antioxidant and oxygen radical disease of premature?, *Am. J. Dis. Child*, 142, 1341,
- 66 Goodman J., Hochstein P. (1977) Generation of free radicals and lipid peroxidation by redox cycling of adriamycin and daunomycin, *BBRC* 77,797
- 67 Doroshov J.H. (1983) Effect of anthracycline antibiotics on oxygen radical formation in rat heart, *Cancer Res.* 43, 460
- 68 Bachur N.R., Malcolm V.G., Friedman R.D. (1982) Nuclear catalyzed antibiotic free radical formation, *Cancer Res.* 42, 1078-1081
- 69 Minimaugh E.G., Gram T.E., Trush M.A. (1983) Stimulation of mouse heart and liver microsomal lipid peroxidation by anthracycline anticancer drug: characterization and effects of reactive oxygen scavengers, *J. Pharmacol. Experim. Therapeutics* 226, 806-816
- 70 Altuntas I., Aksoy H., Coskun I., Caykoylu A., Ackay F. (2000) Erythrocyte superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities, and malondialdehyde and reduced glutathione levels in schizophrenic patients, *Clin. Chem. Lab. Med.* 38, 1277-81

-
- 71 Pawlak Czesław (1999) Reakcje wolnorodnikowe i peroksydacja lipidów we krwi chorych na łagodny rozrost stercza leczonych elektroresekcją przezcewkową (TURP) i przezcewkową termoterapią radiofalową (TURF) – rozprawa habilitacyjna, *Przegląd Wojskowo-Medyczny* supl.3
- 72 Singal P.K., Khaper N., Palace V., Kumar D. (1998) The role of oxidative stress in the genesis of heart disease, *Cardiovascular Research* 40, 426-432
- 73 Raha S., Robinson B.H. (2000) Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing, *TIBS* 25, 502-508
- 74 Halliwell B, Gutteridge J.M.C (2000) Free radicals in biology and medicine, Oxford, University Press 2000
- 75 Szarka A., Stadler K., Jenei V., Argittai E., Jakus J., Mandl J., Banhegyi G. (2002) Ascorbyl free radical and dehydroascorbate formation in rat liver endoplasmic reticulum, *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 34, 317-323
- 76 Singal P.K., Beamish R.E., Dhalla N.S. (1983) Potential oxidative pathways of catecholamines in the formation of lipid peroxides and genesis of heart disease, *Adv. Exp. Med. Biol.* 161, 391-401
- 77 Kalyanaraman B., Felix Ch.C., Sealy R.C. (1984) Peroxidatic oxidation of catecholamines, *J. Biol. Chem.* 259, 7584-7589
- 78 Cancio I., Cajaraville M.P. (1997) Histochemistry of oxidases in several tissues of bivalve mollusks, *Cell Biology International* 21, 575-584
- 79 Schrader M., Fahimi H.D. (2004) Mammalian peroxisomes and reactive oxygen species, *Histochem. Cell Biol.* 122, 383-393
- 80 Corpas F.J., Barroso J.B., del Rio L.A. (2001) Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells, *Trends in Plant Science* 6, 145-150
- 81 Paradies G., Petrosillo G., Pistolese M., Di Venosa N., Serena D., Ruggiero F.M. (1999) Lipid peroxidation and alteration to oxidative metabolism in mitochondria isolated from rat heart subjected to ischemia and reperfusion, *Free Rad. Biol. Med.* 27, 42-50
- 82 Ames B.N., Shigenaga M.K., Hagen T.M. (1993) Oxidants, antioxidants, and degenerative diseases of aging, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 90, 7915-7922
- 83 Boveris A., Oshino N., Chance B. (1972) The cellular production of hydrogen peroxide, *Biochem J.* 128, 617-630
- 84 Kuthan H., Ullrich V., Estabrook R.W. (1982) A quantitative test for superoxide radicals produced in biological systems, *Biochem. J.* 203, 551-558
- 85 Patton S.E., Rosen G.M., Rauckman E. (1980) Superoxide production by purified hamster hepatic nuclei, *Mol. Pharmacol.* 18, 588-593

-
- 86 Halliwell B., Clement M.V., Long L.H. (2000) Hydrogen peroxide in the human body, *FEBS Letters*, 486, 10-13
- 87 Denu J.M., Tanner K.G. (1998) Specific and reversible inactivation of protein tyrosine phosphatases by hydrogen peroxide: evidence for a sulfenic acid intermediate and implication for redox regulation, *Biochemistry* 37, 5633-5642
- 88 Kalyankar M., Zilbering A., Zhu L., Goldstein B.J. (2001) Insulin-stimulated hydrogen peroxide reversibly inhibits protein-tyrosine phosphatase 1B *in vivo* and enhances the early insulin action cascade, *J. Biol. Chem.* 276, 21938-21942
- 89 Hensley K., Hall N., Sburamaniam R., Cole P., Harris M., Aksenov M., Aksenova M., Gabbita S.P., Wu J.F., Carney J.M. Lovell M., Markesbery W.R., Butterfield D.A. (1995) Brain regional correspondence between Alzheimers disease histopathology and biomarkers of protein oxidation, *J. Neurochem.* 65, 2146-2156
- 90 Jankowski Kamil (2001) Prooksydacyjne działanie nadkwasu octowego w eksperymentalnym modelu ostrego zapalenia trzustki, praca doktorska AMG
- 91 Renke J., Popadiuk S., Korzon M., Bugajczyk B., Woźniak M. (2000) Protein carbonyl groups` content as a useful clinical marker of antioxidant barrier impairment in plasma of children with juvenile chronic arthritis, *Free Rad. Biol. Med.* 29, 101-104
- 92 Popadiuk S., Landowski P., Korzon M., Renke J., Woźniak M. (2001) Grupy karbonylowe w białkach osocza u dzieci z przewlekłym nieswoistym zapaleniem jelit, *Pediatrics Współczesna*, 3/3, 195-198
- 93 Dhalla N.S., Temsah R.M., Netticadan T. (2000) Role oxidative stress in cardiovascular disease, *Journal of Hypertension* 18(6), 655-673
- 94 Klauning J.E., Xu Y., Isenberg J.S., Bachowski S., Kolaja K.L., Jiang J., Stevenson D.E., Walborg E.F. (1998) The role of oxidative stress in chemical carcinogenesis, *Environmental Health Perspectives* 106, supl.1, 289-295
- 95 Drzewowski J., Kasznicki J. (1992) Kardiotoxyczność leków przeciwnowotworowych, *Acta Haematologica Polonica* 23, 79-86
- 96 Kaul N., Siveski-Iliskovic N., Hill M., Slezak J., Singal P.K. (1993) Free radicals and the heart, *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 30, 55-67
- 97 Skórko-Glonek J., Żurawa D., Kuczvara E., Woźniak M., Wypych Z., Lipińska B. (1999) The Escherichia coli heat shock protease HtrA participates in defense against oxidative stress, *Mol. Gen. Genet.* 262, 342-350
- 98 Skórko-Glonek J., Lipińska B., Krzewski K., Zolese G., Certoli E., Tanfani F. (1997) HtrA heat shock protease interacts with phospholipid membranes and undergoes conformational changes, *J. Biol. Chem.* 272, 8974-8982

-
- 99 Fuqua S.A.W., Oesterreich S., Hilsenbeck S.G., Von Hoff D.D., Eckardt J., Osborne K. (1994) Heat shock proteins and drug resistance, *Breast Cancer Res. Treat.* 32, 67-71
- 100 Takahashi S., Mikami T., Watanabe Y., Okazaki M., Okazaki Y., Okazaki A., Sato T., Asaishi K., Hirata K., Narimatsu E., Mori M., Sato N., Kikuchi K. (1994) Correlation of heat shock protein 70 expression with estrogen receptor levels in invasive human breast cancer, *Am. J. Clin. Pathol.* 101, 519-525
- 101 Karlseder J., Wissing D., Holzer G, Orel L. Sliutz G., Auer H., Jaattela M., Simon M.M. (1996) Hsp70 overexpression mediates the escape of a doxorubicin-induced G2 cell cycle arrest, *BBRC* 220, 153-159
- 102 Danielli J.F., Davson H. (1935) A contribution of the theory of permeability of thin films, *J. Cell. Comp. Physiol.* 5, 495-508
- 103 Robertson R. N. (1983) The livery membranes. Cambridge University Press.
- 104 Harrison R., Lunt G.G. (1980) Błony biologiczne, struktura i funkcje, PWN Warszawa 1980, str. 91-115
- 105 Singer S.J., Nicolson G. L. (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes, *Science* 175, 720-731
- 106 Dąbrowska G., Głowacka B. (2005) Błona plazmatyczna – porządek czy chaos? *Post. Biochemii* 51, 414-420
- 107 Pizzo P., Viola A. (2003) Lymphocyte lipid rafts: structure and function, *Current Opinion in Immunology* 15, 255-260
- 108 Jung K., Reszka R. (2001) Mitochondria as subcellular targets for clinically useful anthracyclines, *Advanced Drug Delivery Review*, 49, 87-105
- 109 Cheneval D., Muller M., Toni R., Ruetz S., Carafoli E. (1985) Adriamycin as a probe for transversal distribution of cardiolipin in the inner mitochondrial membrane, *J. Biol. Chem.*, 260, 13003-13007
- 110 Comte J., Maisterrena B., Gautheron D. (1976) Lipid composition and protein profiles of outer and inner membranes from pig heart mitochondria comparison with microsomes, *Biochim. Biophys. Acta* 419, 271-284
- 111 Nichols-Smith S., Teh S., Kuhl T.L. (2004) Thermodynamic and mechanical properties of model mitochondrial membranes, *Biochim. Biophys. Acta* 1663, 82-88
- 112 Mutter T., Dolinsky V.W., William B.J., Taylor W.A., Hatch G.M. (2000) Thyroxine regulation of monolysocardiolipin acyltransferase activity in rat heart, *Biochem. J.* 346, 403-406
- 113 Schlame M., Rua D., Greenberg M.L. (2000) The biosynthesis and functional role of cardiolipin, *Progress in Lipid Research* 39, 257-288

-
- 114 Gomez B, Robinson B., Neal C. (1999) Quantitative determination of cardiolipin in mitochondrial electron transferring complexes by silic acid high-performance liquid chromatography *Analytical Biochemistry* 267, 212-216
- 115 Hatch Grant M. (2004) Cell biology of cardiac mitochondrial phospholipids, *Biochem. Cell Biol.* 82, 99-112
- 116 Vik S.B., Georgevich G., Capaldi R.A. (1981) Diphosphatidylglycerol is required for optimal activity of beef heart cytochrome c oxidase, *Proc. Natl.Acad Sci USA* 78, 1456-1460
- 117 Fry M., Blondyn G.A., Gree D.E. (1980) The localization of tightly bound cardiolipin in cytochrome oxidase, *J. Biol. Chem.* 225, 9967-9970
- 118 Paradies G., Ruggiero F.M., Petrosillo G., Quagliariello E. (1998) Peroxidative damage to cardiac mitochondria: cytochrome oxidase and cardiolipin alteration, *FEBS Letters* 424, 155-158
- 119 Parker M.A., King V., Howard K.P. (2001) Nuclear magnetic resonance study of doxorubicin binding to cardiolipin containing magnetically oriented phospholipids bilayers, *Biochim. Biophys. Acta* 1514, 206-216
- 120 Duarte-Kerim M., Ruyschaert J.M., Hildebrand J. (1976) Affinity of adriamycin to phospholipids a possible explanation for cardiac mitochondrial lesions *BBRC* 71, 658-663
- 121 Markiewicz Zdzisław (1993) *Struktura i funkcje osłon bakteryjnych*, Wydawnictwo Naukowe PWN Warszawa 1993
- 122 Mansilla M.C., Cybulski L.E., Albanesi D., Mendoga D (2004) Control of membrane lipid fluidity by molecular thermosensors, *Journal of Bacteriology* 186, 6681-6688
- 123 Yankovskaya V., Horsefield R., Tornroth S., Luna-Chaves C., Miyoshi H., Leger Ch., Byrne B., Cecchini G., Iwata S. (2003) Architecture of succinate dehydrogenase and reactive oxygen species generation, *Science* 299, 700-704
- 124 Pebay-Peyroula E., Dahout-Gonzalez C., Kahn R., Trezeguet V., Lauquin G., Brandolin G. (2003) Structure of mitochondrial ADP/ATP carrier in complex with carboxyatractyloside, *Nature* 426, 39-44
- 125 Sekimizu K., Kornberg A. (1988) Cardiolipin activation of dnaA protein, the initiation protein of replication in *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.* 263, 7131-7153
- 126 Martinez-Sanchez G., Giuliani A., Perez-Davison G., Leon-Fernandez O.S. (2005) Oxidized proteins and their contribution to redox homeostasis, *Redox Rep.* 10, 175-185
- 127 Neuzil J., Gebicki J.M., Stocker R. (1993) Radical-induced chain oxidation of proteins and its inhibition by chain-breaking antioxidants, *Biochem. J.* 293, 601-606

-
- 128 Beal F.M. (2002) Oxidatively modified proteins in aging and disease, *Free Rad. Biol. Med.* 32, 797-803
- 129 Holbrook Nikki J. (1996) Protein damage and oxidative stress, *Cellular aging and cell death*, Wiley-Liss, 35-49
- 130 Kohen R., Nyska A. (2002) Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification, *Toxicologic Pathology*, 30, 620-650
- 131 Marcillat O., Zhang Y., Lin S.W., Davies K.J.A. (1988) Mitochondria contain a proteolytic system and degrade oxidatively-denatured proteins, *Biochem. J.* 254, 677-683
- 132 Ciolino H.P., Levine R.L. (1997) Modification of proteins in sarcothelial cell death during oxidative stress, *Free Rad. Biol. Med.* 22, 1277-1282
- 133 Dean R.T., Fu S., Stocker R., Davies M.J. (1997) Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation, *Biochem. J.* 324, 1-18
- 134 Berlett B.S., Stadtman E.R. (1997) Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress, *J. Biol. Chem.* 272, 20313-20316
- 135 Shacter E. (2000) Quantification and significance of protein oxidation in biological samples, *Drug Metabolism Rreviews*, 32, 307-326
- 136 Levine R.L. (2002) Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease, *Free Rad. Biol. Med.* 32, 790-796
- 137 Dalle-Donne I., Rossi R., Giustarini D., Milzani A., Colombo R. (2003) Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress, *Clinica Chimica Acta*, 329, 23-38
- 138 Pantke U., Volk T., Schmutzler, Kox W.J., Sitte N., Grune T. (1999) Oxidized proteins as a marker of oxidative stress during coronary heart surgery, *Free Rad. Biol. Med.* 27, 1080-1086
- 139 Davies K.J.A., Sharon W.L., Pacifici R.E. (1987) Protein damage and degradation by oxygen radicals. IV. Degradation of denatured protein, *J. Biol. Chem.* 262, 9914-9920
- 140 Stadtman E.R. (1988) Protein modification in aging, *J. Gerontol.* 43, B112-B120
- 141 Fagan J.M., Slecicka B.G., Sohar I. (1999) Quantitation of oxidative damage to tissue proteins, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 31, 751-757
- 142 Davies K.J.A. (1987) Protein damage and degradation by oxygen radicals, I. General aspects, *J. Biol.Chem.* 262, 9895-9901
- 143 Davies K.J.A. (1987) Protein damage and degradation by oxygen radicals, II. Modification of amino acids, *J. Biol.Chem.* 262, 9902-9907

-
- 144 Davies K.J., Delsignore M.E. (1987) Protein damage and degradation by oxygen radicals. III. Modification of secondary and tertiary structure, *J. Biol. Chem.* 262, 9908-9913
- 145 Grune T., Reinheckel T., Davies K.J.A. (1997) Degradation of oxidized proteins in mammalian cells, *FASEB J.* 11, 526-534
- 146 Shringarpure R., Grune T., Mehlhase J., Davies K.J.A. (2003) Ubiquitin conjugation is not required for the degradation of oxidized proteins by proteasomes, *J. Biol. Chem.* 278, 311-318
- 147 Kiffin R., Christian Ch., Knecht E., Cuervo A.M. (2004) Activation of chaperone-mediated autophagy during oxidative stress, *Mol. Biol. Cell* 15, 4829-4840
- 148 Verhagen A.M., Silke J., P.G., Pakusch M., Kaufmann H., Connolly L.M., Day C.L., Tikoo A., Burke R., Wrobel C., Moritz R.L., Simpson R.J., Vaux D.L. (2002) HtrA promotes cell death through its serine protease activity and its ability to antagonize inhibitor of apoptosis proteins, *J. Biol. Chem.* 277, 445-454
- 149 Faccio L., Fusco C., Chen A., Martinotti St., Bonventre J.V., Zervos A.S. (2000) Characterization of a novel human serine protease that has extensive homology to bacterial heat shock sarcoprotease HtrA and is regulated by kidney ischemia, *J. Biol. Chem.* 275, 2581-2588
- 150 Clausen T., Southan C., Ehrmann M. (2002) The HtrA family of proteases: implications for protein composition and cell fate, *Mol. Cell* 10, 443-455
- 151 Koster J.F., Slee R.G. (1980) Lipid peroxidation of rat liver microsomes, *Biochim. Biophys. Acta*, 620, 489-499
- 152 Spiteller G. (2003) The relationship between changes in the cell wall, lipid peroxidation, proliferation, senescence and cell death, *Physiologia Plantarum* 119, 5-18
- 153 Halliwell B. (2000) Lipid peroxidation, antioxidants and cardiovascular disease: how should we move forward?, *Cardiovascular Res.* 47, 410-418
- 154 Facchinetti T., Muh-Zange M., Salmons M., Carini M., Remmer H. (1982) Further studies on adriamycin induced in vitro lipid peroxidation, *Chem. Biol. Interactions* 38, 357-367
- 155 Bagchi D., Bagchi M., Hassoun E.A., Kelly J., Stohs S.J. (1995) Adriamycin-induced hepatic and myocardial lipid peroxidation and DNA damage, and enhanced excretion of urinary lipid metabolites in rats, *Toxicology* 95, 1-9
- 156 Angielski ST, Rogulski J. (1991) *Biochemia kliniczna*, PZWL, Warszawa 1991, 773-775
- 157 Powell L.W., Alpert E., Isselbacher K.J., Drysdale J.W. (1975) Human isoferritins: organ specific iron and apoferritin distribution, *Br. J. Haematology* 30, 47-55

-
- 158 Okada Sigeru (1996) Iron-induced tissue damage and cancer: the role of reactive oxygen species-free radicals, *Pathology International* 46, 311-332
- 159 Beraldo H., Garnier-Suillerot A., Tosi L., Lavelle F. (1985) Iron(III)-adriamycin and iron(III)-daunorubicin complexes: physicochemical characteristics, interaction with DNA, and antitumor activity, *Biochemistry* 24, 284-289
- 160 Gianni L., Zweier J.L., Levy A., Myers Ch.E. (1985) Characterization of the cycle of iron-mediated electron transfer from adriamycin to molecular oxygen, *J. Biol. Chem.* 260, 6820-6826
- 161 Ball Stefan (2001) Antyoksydanty w medycynie i zdrowiu człowieka, Medyk, Warszawa 2001
- 162 McCord J.M., Fridovich I. (1969) Superoxide dismutase. An enzymatic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein) *J. Biol. Chem.* 244, 6049
- 163 Kwiatkowski J.M. (1988) Dismutaza ponadtlenkowa - struktura, funkcja i filogeneza, *Post. Biochem.* 34, 311-333
- 164 Skrzycki M., Czeczot H. (2004) Zewnątrzkomórkowa dysmutaza ponadtlenkowa (EC-SOD) – budowa, właściwości i funkcje, *Postępy Hig. Med. Dośw.* 58, 301-311
- 165 Chen Y., Saari J.T., Kang Y.J. (1994) Weak antioxidant defenses make the heart a target for damage copper-deficient rats, *Free Rad. Biol. Med.* 17, 529-536
- 166 Doroshov J. H., Cocker G.Y., Myers C.E. (1980) Enzymatic defenses of the mouse heart against reactive oxygen metabolites, *J. Clin. Invest.* 65, 128-135
- 167 Kang Y.J. (1999) The antioxidant function of metallothionein in the heart, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 222, 263-273
- 168 Moran M., Delgado J., Gonzalez B., Mansa R., Megias A. (2004) Responses of rat myocardial antioxidant defences and heat shock protein Hsp72 induced by 12 and 24-week treadmill training, *Acta Physiol. Scan.* 180, 157-166
- 169 Tanfani F., Carloni P., Damiani E., Greci L., Woźniak M., Kulawiak D., Jankowski K., Kaczor J., Matuszkiewicz A. Quinolinic aminoxyl protects albumin against peroxy radical mediated damage (1994) *Free Rad. Res.* 21, 309-315
- 170 Falcioni G., Gabbianelli R., Damiani E., Santroni A.M., Fedeli D., Woźniak M., Greci L. (1997) The effect of indolinic and quinolinic nitroxide radicals on trout erythrocytes exposed to oxidative stress, *Free Rad. Res.* 28, 507-516
- 171 Damiani E., Astolfi P., Benaglia M., Alberti A., Greci L. (2004) Hydrogen abstraction ability of different aromatic nitroxides, *Free Rad. Res.* 38, 67-72

-
- 172 Antosiewicz J., Popinigis J., Woźniak M., Damiani E., Carloni P, Greci L. (1995) Effects of indolinic and quinolinic aminoxylys on protein and lipid peroxidation of rat liver microsomes, *Free Rad. Biol. Med.* 18, 913-917
- 173 Szwarocka A., Robak T., Krykowski E., Józwiak Z. (1996) Interaction of anthracyclines with human erythrocytes at hypertermic temperature, *Int. J. Pharm.* 135, 167-176
- 174 Griffin E.A., Vanderkooi J.M., Maniara G., Erecińska M. (1986) Anthracycline binding to synthetic and natural membranes. A study using resonance energy transfer, *Biochemistry* 25, 7875-7880
- 175 Goormaghtigh E., Huart P., Brasseur R., Ruyschaert J.M. (1986) Mechanism of inhibition of mitochondrial enzymatic complex I-III by adriamycin derivatives, *Biochim. Biophys. Acta* 861, 83-94
- 176 Koceva-Chyła A., Sokal A., Kania K., Gwoździński K., Józwiak Z. (2003) The nitroxides pirolin and pirolid protect the plasma membranes of rat cardiomyocytes against damage induced by anthracyclines, *Cell. Molec. Biol. Letters* 8, 171-177
- 177 Koyama T., Zhu M.Y., Shong L.Q., Nakabayashi T., Keatisuwan W., Kinjo M., Araiso T. (1990) Dynamic microstructure and hydration of peroxidized membrane of rat cardiac mitochondria and effects of adriamycin, *Jpn. J. Physiol.* 40, 635-649-abstract
- 178 Ogura R., Sugiyama M., Haramaki N., Hidaka T. (1991) Electron spin resonance studies on the mechanism of adriamycin-induced heart mitochondrial damages, *Cancer Res.* 51, 3555-3558
- 179 Nohl H., Gille L., Staniek K. (1998) The exogenous NADH dehydrogenase of heart mitochondria is the key enzyme responsible for selective cardiotoxicity of anthracyclines, *Z. Naturforsch* 53c, 279-285
- 180 Demant Erland J.F. (1983) NADH oxidation in submitochondrial particles protects respiratory chain activity against damage by adriamycin-Fe³⁺, *Eur. J. Biochem.* 137, 113-118
- 181 Hsiu-Chuan Y., Oberley T.D., Vichitbandha S., Ye-Shih H., Clair D.K. (1996) The protective role of manganese superoxide dismutase against adriamycin-induced acute cardiac toxicity in transgenic mice, *J. Clin. Invest.* 98, 1253-1260
- 182 Siveski-Iliskovic N., Hill M., Chow D.A., Singal P.K. (1995) Probucol protects against adriamycin cardiomyopathy without interfering with its antitumor effect, *Circulation* 91, 10-15
- 183 Sambrook I., Fritsch E.F., Maniatis T. (2002) Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- 184 Idell-Wenger J.A. (1982) An improved method for isolation of mitochondria in high yields from normal, ischemic, and autolyzed rat hearts, *Analytical Biochemistry* 125, 269-276

-
- 185 Futterman S., Rollins H.H. (1973) A simple biuret method for the estimation of protein in samples containing detergents, *Anal. Biochem.* 51, 443-447
- 186 Levine R.L., Garland D., Oliver C.N., Amici A., Climet I., Lenz A., Ahn B., Shaltiel S., Stadtman E.R. (1990) Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins, *Meth. in Enzym.*, 186, 464-478
- 187 Berti C., Colonna M., Greci L., Marchetti L. (1975) Stable nitroxide radicals from phenyl-isatogen and arylimino derivatives with organometallic compound, *Tetrahedron* 31, 1745-1753
- 188 Kulawiak-Gałąska D., Woźniak M., Greci L. (2002) Aromatic indolinic aminoxylys as antioxidants in cardiac sarcoplasmic reticulum lipid and protein oxidation, *Acta Biochimica Polonica* 49, 43-49
- 189 Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227, 680-685
- 190 Minotti G., Cairo G., Monti E. (1999) Role of iron in anthracycline cardiotoxicity: new tunes for and old song?, *FASEB J.* 13, 199-212
- 191 Kotamraju S., Chitambar Ch.R., Kalivendi S.V., Joseph J., Kalyanaraman B. (2002) Transferrin receptor-dependent iron uptake is responsible for doxorubicin-mediated apoptosis in sarcothelial cells: role of oxidant-induced iron signaling in apoptosis, *J. Biol. Chem.* 277, 17179-87
- 192 Keith M., Geranmayegan A., Sole M.J., Kurian R., Robinson A., Omran A.S., Jeejeebhoy K.N. (1998) Increased oxidative stress in patients with congestive heart failure *JACC*, 31, 1352-1356
- 193 Tsutsui H., Ide T., Hayashidani S., Suematsu N., Utsumi H., Nakamura R., Egashirak K., Takeshita A. (2001) Greater susceptibility of failing cardiac myocytes to oxygen free radical-mediated injury, *Cardiovascular Research* 49, 103-109
- 194 Chakrabarti S., Makrigiorgos G.M., O'Brien K., Bump E., Kassis A.I. (1996) Measurement of hydroxyl radicals catalyzed in the immediate vicinity of DNA by metal-bleomycin complexes, *Free Rad. Biol. Med.* 20, 777-783
- 195 Nohl H., Jordan W. (1983) $\bullet\text{OH}$ – generation by adriamycin semiquinone and H_2O_2 ; an explanation for the cardiotoxicity of anthracycline antibiotics, *BBRC* 114, 197-205
- 196 Singal (1996) Role of oxidative stress in heart failure subsequent to myocardial infraction, *Information cardiologique* 20, 343-362
- 197 El-Habit O.H.M., Sayed-Ahmed M.M., Gabry M.S., Khalil M.F.K., Osman A.M.M. (2000) Modulation of induced cardiotoxicity and genotoxicity of doxorubicin in rat by L-carnitine, *Journal of the Egyptian Nat. Cancer Inst.* 12, 267-274

-
- 198 Weinstein D.M., Mim M.J., Bauer J.A. (2000) Cardiac peroxynitrite and left ventricular dysfunction following doxorubicin treatment in mice, *J. Pharmacol Exp. Ther.* 294, 396-401
- 199 Mihm M.J., Yu F., Weinstein D.M., Reiser P.J., Bauer J.A. (2002) Intracellular distribution of peroxynitrite during doxorubicin cardiomyopathy; evidence for selective impairment of myofibrillar creatine kinase, *Br J. Pharmacol* 135, 581-588
- 200 Mihm MJ, Coyle Ch.M., Schanbacher B.M., Weinstein D.M., Bauer J.A. (2001) Peroxynitrite induced nitration and inactivation of myofibrillar creatine kinase in experimental heart failure, *Cardiovascular Res.* 49, 798-807
- 201 Pacher P., Liaudet L., Mabley J., Komjati K., Szabo C. (2002) Pharmacological inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase may represent a novel therapeutic approach in chronic failure, *J. Am. Coll. Mariol.* 40, 1006-1016
- 202 Mettler F.P., Young D.M., Ward J.M. (1977) Adriamycin-induced cardiotoxicity (cardiomyopathy and congestive heart failure) in rats, *Cancer Res.* 37, 2705-2713
- 203 Drzewowski Józef (1986) Wpływ doksorubicyny (adriamycyny) na parametry hemodynamiczne u królików oraz jej interakcja z digoksyną, propranololem i koenzymem Q10 - rozprawa habilitacyjna AM w Łodzi
- 204 Jaenke R.S. (1974) An anthracycline antibiotic-induced cardiomyopathy in rabbits, *Lab. Invest.* 30, 292-304
- 205 Iliskovic N., Panagia V., Szelak J., Kumar D., Li T, Singal P.K. (1997) Adriamycin depresses *in vivo* and *in vitro* phosphatidylethanolamine N-methylation in rat heart sarcolemma, *Molec. Cell. Biochem.* 176, 235-240
- 206 Davies K.J.A., Doroshov J.H. (1983) Mitochondrial NADH dehydrogenase-catalyzed oxygen radical production by adriamycin, and the relative inactivity of 5-iminodaunorubicin, *FEBS Letters* 153, 227-230
- 207 Doroshov J.H. (1983) Anthracycline antibiotic-stimulated superoxide, hydrogen peroxide, and hydroxyl radical by NADH dehydrogenase, *Cancer Research* 43, 4543-4551
- 208 Shioji K., Kishimoto Ch., Nakamura H., Masutani H., Yuan Z., Oka S., Yodoi J. (2002) Overexpression of thioredoxin-1 in transgenic mice attenuates adriamycin-induced cardiotoxicity, *Circulation* 106, 1403-1409
- 209 Olivier C.N., Ahn B.W., Moerman E.J., Goldstein S., Stadtman E.R. (1987) Age-related changes in oxidized proteins, *J. Biol. Chem.* 262, 5488-5491
- 210 Carney J.M., Carney A.M. (1994) Role of protein oxidation in aging and in age-associated neurodegenerative diseases, *Life Sci.* 55, 2097-2103

-
- 211 Smith C.D., Carney J.M., Tatsumo T., Stadtman E.R., Floyd A., Markesbery W.R. (1992) Protein oxidation in aging brain, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 663, 110-119
- 212 Starke-Reed P., Oliver C.N. (1989) Protein oxidation and proteolysis during aging and oxidative stress, *Arch. Biochem. Biophys.* 275, 559-567
- 213 Levine R.L., Williams J.A., Stadtman E.R., Shacter E. (1994) Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins, *Meth. in Enzym.* 233, 346-357
- 214 Takekoshi S., Nagata H., Matsuzaki K., Osamura R.Y. (2003) Involvement of lipid peroxidation in the alteration of protein kinase C signaling, *Acta Histochem. Cytochem.* 36, 281-285
- 215 Janero D.R. (1990) Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury, *Free Rad. Biol. Med.* 9, 515-540
- 216 Gutteridge J.M., Halliwell B. (1990) The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems, *TIBS* 15, 129-135
- 217 Szwarocka A., Robak T., Krykowski E., Józwiak Z. (1996) Interaction of anthracyclines with human erythrocytes at hypertermic temperature, *International Journal of Pharmaceutics* 135, 167-176
- 218 Scheulen M.E., Kappus H., Nienhaus A., Schmidt C.G. (1982) Covalent protein binding of reactive adriamycin metabolites in rat liver and heart microsomes, *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 103, 39-48
- 219 Wang A.H., Ughetto G., Quigley G.J., Rich A. (1987) Interaction between an anthracycline antibiotic and DNA: molecular structure of daunomycine complexed to d(CpGpTpApCpG)at 1,2-.ANG. resolution, *Biochemistry* 26, 1152-1163
- 220 Chen K., Gresh N., Pullman B. (1982) A theoretical investigation on the sequence selective binding of adriamycin to double-stranded polynucleotides, *Nucleic Acids Res.* 14, 2251-2267
- 221 Kanai A.J., Parce L.L., Klemens P.R., Bieder L.A., VanBibber M.M., Choi S., de Groat W.C., Peterson J. (2001) Identification of neuronal nitric oxide synthase in isolated cardiac mitochondria using electrochemical detection, *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 98, 14126-14131
- 222 Szewczyk A., Wojtczak L. (2002) Mitochondria as a pharmacological target, *Pharmacol. Rev.* 54, 101-127
- 223 Pierściński G., Drzewowski J., Nowak D. (1994) The influence of doxorubicin and 4'-epi-doxorubicin on lipid peroxidation in mouse heart, lungs and liver. Part II, *Pol. J. Pharmacol.* 46, 55-59

-
- 224 Iliskovic N., Singal P.K. (1997) Lipid lowering: an important factor in preventing adriamycin-induced heart failure, *Am. J. of Path.* 150, 727-734
- 225 Miura T., Muraoka S., Ogiso T. (1995) Adriamycin-Fe³⁺-induced mitochondrial protein damage with lipid peroxidation, *Biol. Pharm. Bull.* 18, 514-517
- 226 Gille L., Nohl H. (1997) Analyses of the molecular mechanism of adriamycin-induced cardiotoxicity, *Free Rad. Biol. Med.*, 23, 775-782
- 227 Mutter T., Dolinsky V.W., William B.J., Taylor W.A., Hatch G.M. (2000) Thyroxine regulation of monolysocardiolipin acyltransferase activity in rat heart, *Biochem. J.* 346, 403-406
- 228 Gille L., Kleiter M., Nohl H. (2002) Paramagnetic species in the plasma of dogs with lymphoma prior to and after treatment with doxorubicin an ESR study, *Biochem. Pharm.* 64, 1737-1744
- 229 Minotti G., Aust S.D. (1987) The requirement for iron(III) in the initiation of lipid peroxidation by iron(II) and hydrogen peroxide, *J. Biol. Chem.* 262, 1098-1104
- 230 Koster J.F., Slee R.G. (1986) Ferritin, a physiological iron donor for microsomal lipid peroxidation, *FEBS Letters* 199, 85-88
- 231 Demant Erland J.F. (1983) NADH oxidation in submitochondrial particles protects respiratory chain activity against damage by adriamycin-Fe³⁺, *Eur. J. Biochem.* 137, 113-118
- 232 Saad S.Y., Najjar T.A., Al-Rikabi A.C. (2001) The preventive role of deferoxamine against acute doxorubicin-induced cardiac, renal and hepatic toxicity in rats, *Pharmacol. Res.* 43, 211-218
- 233 Cvetkovic R.S., Scott L.J. (2005) Dexrazoxane, a review of its use for cardioprotection during anthracycline chemotherapy, *Drugs* 65, 1005-1024
- 234 Minotti G., Mancuso C., Frustaci A., Mordente A., Santini S.A., Calafiore A.M. (1996) Paradoxical inhibition of cardiac lipid peroxidation in cancer patients treated with doxorubicin, *J. Clin. Invest.* 98, 650-661
- 235 Dean R.T., Fu S., Stocker R., Davies M.J. (1997) Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation, *Biochem. J.* 324, 1-18
- 236 Alegria A.E., Rodrigues M.S., Hernandez J. (1990) Semiquinone derived from anthraquinone-containing antitumor drugs can partition into lecithin bilayers, *Biochim. Biophys. Acta* 1035, 51-55
- 237 Eaton P., Hearse D.J., Shattock M.J. (2001) Lipid hydroperoxide modification of proteins during myocardial ischaemia, *Cardiovascular Res.* 51, 294-303
- 238 Sawaryn A. (1974) Znaczniki spinowe i ich zastosowanie w badaniach biochemicznych, *Post. Biochemii* 21, 21-56

-
- 239 Ohnishi S., McConnell H.M. (1965) Interaction of the free ion of chlorpromazine with deoxyribonucleic acid, *J. Am. Chem. Soc.* 87, 2293-2294
- 240 Cieplak M., Sienkiewicz A., (2004) Encyklopedia Fizyki Współczesnej, PWN, Warszawa 2004
- 241 Hensley K., Carney J., Hall N., Shaw W, Butterfield D. A. (1994) Electron paramagnetic resonance investigations of free radical-induced alterations in neocortical synaptosomal membrane protein infrastructure, *Free Rad. Biol. Med.* 17, 321-331
- 242 Butterfield D.A., Stadtman E.R. (1997) Protein oxidation processes in aging brain, *Adv. Cell Aging Gerontol* 2, 161-191
- 243 Santos D.L., Moreno A.J.M., Leino R.L., Froberg M.K., Wallace K.B. (2002) Carvedilol protects against doxorubicin-induced mitochondrial cardiomyopathy, *Toxicology and Applied Pharamcology* 185, 218-227
- 244 Illiskovic N., Singal P.K. (1997) Lipid lowering: an important factor in preventing adriamycin-induced heart failure, *The American Journal of Pathology* 150, 2, 727-734
- 245 Nowak D., Pierscinski G., Dzrewoski J. (1995) Ambroxol inhibits doxorubicin-induced lipid peroxidation in heart of mice, *Free Rad. Biol. Med.* 19, 659-663
- 246 Xu M.F, Ho S, Qian Z.M., Tang P.L. (2001) Melatonin protects against cardiac toxicity of doxorubicin, *J. Pineal Res.* 31, 301-307
- 247 Park E., Kim S., Lee M., Lee H., Lee I., Sung I., Yoon Y. (2003) Protective effects of N-acetylcysteine and selenium against doxorubicin toxicity in rats, *J. Vet. Sci.* 4, 129-136
- 248 Wakabayashi T., Oki T., Tone H., Hirano S., Omori K. (1980) A comparative electronmicroscopic study of aclacinomycin and adriamycin cardiotoxicities in rabbits and hamster, *J. Electron. Microsc.* 29, 106-118