

Spis treści

Wstęp.	13
Część 1: Strategia ataku.	15
1.1. Tlen: pierwiastek życia i śmierci.	15
1.1.1. Tlen — pierwiastek życia	15
1.1.2. Tlen — pierwiastek chorób i śmierci	16
1.2. Co to są reaktywne formy tlenu?.	19
1.3. Właściwości reaktywnych form tlenu	30
1.3.1. Nieco o reakcjach wolnorodnikowych w ogólności	30
1.3.1.1. Inicjacja	30
1.3.1.2. Propagacja	32
1.3.1.3. Terminacja	34
1.3.1.4. Powstawanie rodników organicznych	34
1.3.2. Anionorodnik nadadtlenkowy	35
1.3.3. Nadtlenek wodoru	46
1.3.4. Rodnik hydroksylowy	48
1.3.5. Tlen singletowy	51
1.3.6. Ozon	53
1.3.7. Kwas podchlorawy i jego krewniacy	54
1.3.8. Tlenek azotu i nadtlendioazotyn	55
1.3.9. Rodniki organiczne.	57
1.4. Jak powstają reaktywne formy tlenu?	58
1.4.1. Promieniowanie jonizujące	59
1.4.2. Ultradźwięki	61
1.4.3. Promieniowanie nadfioletowe	62
1.4.4. Światło. Fotosensybilizacja. Fotoredukcja.	62
1.4.5. Utlenianie zredukowanych form niskocząsteczkowych składników komórek	64
1.4.6. Utlenianie ksenobiotyków. Cykle redoks	66
1.4.7. Utlenianie białek oddechowych	69
1.4.8. Reakcje enzymatyczne	71
1.4.9. Łańcuch oddechowy	73
1.4.10. Peroksysomy	75

1.4.11. Inne łańcuchy transportu elektronów	76
1.4.12. W jakich okolicznościach powstaje tlen singletowy?	78
1.4.13. Narodziny dalszych krewnych	79
1.4.14. Jakie jest stacjonarne stężenie $O_2^{\bullet}$ i H_2O_2 w komórkach?	81
1.4.15. Stykamy się z reaktywnymi formami tlenu częściej, niż podejrzewamy	82
1.5. Biologiczne znaczenie reakcji RFT	84
1.5.1. Oskarżenie: reaktywne formy tlenu uszkadzają komórki	84
1.5.2. Kto jest zabójcą? Podejrzany: rodnik hydroksylowy	86
1.5.3. Skąd się bierze rodnik hydroksylowy <i>in vivo</i> ? Domniemana droga: reakcja Habera–Weissa.	87
1.5.4. Lepsza hipoteza: reakcja Fentona	88
1.5.5. Podejrzany utrudnia zbieranie dowodów: regiospecyficzna reakcja Fentona	90
1.5.6. Inni podejrzani	91
1.6. Niebezpieczne jony metali	91
1.6.1. Czy jony metali przejściowych są wolnymi rodnikami?	91
1.6.2. Jony metali przejściowych: nieproszeni goście	94
1.6.3. Dobre i złe chelatory jonów metali	95
1.6.4. Czy <i>in vivo</i> dostępne są jony metali katalizujące reakcję Habera–Weissa?	97
1.7. Uszkodzanie składników komórek przez reaktywne formy tlenu	99
1.7.1. Peroksydacja lipidów	99
1.7.2. Co to jest peroksydacja enzymatyczna?	105
1.7.3. Produkty końcowe peroksydacji lipidów: wtórne mediatory działania reaktywnych form tlenu	106
1.7.4. Jakie jest biologiczne znaczenie peroksydacji lipidów?	107
1.7.5. Peroksydacja lipidów a starczy barwnik (lipofuscyna).	109
1.7.6. Uszkodzanie białek przez reaktywne formy tlenu	110
1.7.7. Nie tylko lipidy ulegają peroksydacji!	115
1.7.8. Gromadzenie się białek uszkodzonych przez reaktywne formy tlenu w starych komórkach	116
1.7.9. Uszkodzanie kwasów nukleinowych	117
1.7.10. Ile uszkodzeń DNA powstaje w komórce?	119
1.7.11. Cukrowce też są uszkodzane	119
1.8. Tlen a promieniowanie jonizujące	120
1.9. Jak się to robi? Najczęściej stosowane metody wykrywania reaktywnych form tlenu i wywoływanych przez nie uszkodzeń.	120
1.9.1. Przegląd metod	121
1.9.1.1. Spektrometria elektronowego rezonansu paramagnetycznego	121
1.9.1.2. Pułapkowanie spinów	122
1.9.1.3. Chemiluminescencja	124
1.9.1.4. Reakcje dające specyficzne, łatwo wykrywalne produkty	125
1.9.2. Detekcja anionorodnika ponadtlenkowego	127
1.9.3. Detekcja nadtlenu wodoru.	131
1.9.4. Detekcja rodnika hydroksylowego	132
1.9.5. Jak można wyznaczyć stałe szybkości reakcji reaktywnych form tlenu?	136
1.9.6. Badanie peroksydacji lipidów	138
1.9.6.1. Reakcja z kwasem tiobarbiturowym	138
1.9.6.2. Pomiar stężenia nadtlenu lipidów	139
1.9.6.3. Pomiar stężenia sprzężonych dienów	140
1.9.6.4. Pomiar uwalniania alkanów	140
1.9.6.5. Chemiluminescencja	140
1.9.6.6. Inne metody	141
1.9.7. Badanie produktów utlenienia białek	142

Część 2: Mechanizmy obrony	144
2.1. Ochrona osobista komórek: mechanizmy obrony przed reaktywnymi formami tlenu	144
2.2. Białka chroniące przed reaktywnymi formami tlenu	145
2.2.1. Służby wysoce specjalne: enzymy rozkładające reaktywne formy tlenu	145
2.2.2. Inne enzymy obronne	149
2.2.3. Jony metali pod ścisłą strażą	152
2.2.4. Podwójna rola peroksydazy glutationowej	156
2.2.5. Wywiad z agentką SOD-1	159
2.2.6. Dysmutazy z epoki przedmiedziowej	166
2.2.7. Nieco rozważań o ewolucji dysmutaz ponadtlenkowych	168
2.2.8. Dysmutazy a endosymbiotyczna teoria pochodzenia mitochondriów i chloroplastów	169
2.2.9. Występowanie dysmutaz. Prawidłowości i zagadki	169
2.2.10. Pozakomórkowa dysmutaza ponadtlenkowa	171
2.2.11. Zapoznajmy się nieco bliżej: katalaza	173
2.2.12. Zapoznajmy się nieco bliżej: peroksydaza glutationowa	174
2.2.13. Bakteryjni krewniacy katalaz i peroksydaz	175
2.2.14. Układ tioredoksyny	176
2.2.15. Jeszcze jedno białko obronne: metalotioneina	177
2.2.16. Białka — kamikadze	179
2.3. Mali obrońcy	179
2.3.1. Pionki gry obronnej komórek: antyoksydanty niskocząsteczkowe	179
2.3.2. Nowa rola końcowych produktów metabolizmu?	184
2.3.3. Osobliwy tripeptyd: glutation	186
2.3.4. Askorbinian: antyoksydant trochę podejrzany	189
2.3.5. Główne antyoksydanty hydrofobowe: tokoferole	192
2.3.6. Kolejne antyoksydanty hydrofobowe: karotenoidy i ksantofile	194
2.3.7. Budująca współpraca antyoksydantów	196
2.3.8. Czy metale mogą być antyoksydantami?	198
2.3.9. Sztuczne antyoksydanty i niby-enzymy	199
2.3.10. Dla każdego coś miłego	201
2.4. Powrót anionorodnika ponadtlenkowego. Zlew wolnorodnikowy	203
2.5. Askorbinianowy zlew wolnorodnikowy	204
2.6. Co chroni płyny pozakomórkowe przed reaktywnymi formami tlenu?	205
2.7. Całkowita zdolność antyoksydacyjna	208
2.8. Czarna teczka na Antyoksydanty (podsluchane w Urzędzie Ochrony Komórki)	215
2.9. Trzecia linia obrony	218
2.9.1. Uszkodzenia DNA są naprawiane	218
2.9.2. Uszkodzone białka są trawione szybciej	220
2.10. Jak to się robi? Oznaczanie aktywności głównych enzymów chroniących przed reaktywnymi formami tlenu	222
2.10.1. Dysmutaza ponadtlenkowa	222
2.10.2. Katalaza	225
2.10.3. Peroksydaza glutationowa	225
Część 3: Obrazki z pola bitwy	227
3.1. Koncepcja stresu oksydacyjnego	227
3.2. Metaboliczne efekty stresu oksydacyjnego	228
3.3. Mutagenne działanie reaktywnych form tlenu	231
3.4. Adaptacje komórek	232

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

3.11.2. Co jest w dymku z papierosa?	296
3.12. Reaktywne formy tlenu a rośliny	298
3.12.1. Glon trujący ryby i inni truciele	298
3.12.2. Pomidory: SOD zamiast okularów słonecznych	298
3.12.3. Dysmutaza na straży wiązania azotu	299
3.12.4. SOD jako wyłącznik światła?	299
3.12.5. Rośliny adaptują się do parakwatu	299
3.12.6. Szok tlenowy po niedotlenieniu — również u roślin	300
3.12.7. Reaktywne formy tlenu bronią rośliny	300
3.13. Pochwała równowagi	301
3.14. Szukamy okoliczności łagodzących: w jaki jeszcze sposób reaktywne formy tlenu mogą być pożyteczne?	304
3.14.1. Reaktywne formy tlenu jako substraty reakcji enzymatycznych	304
3.14.2. Anionorodnik ponadtlenkowy jako patron ojcostwa?	306
3.14.3. Wybuch na początku nowego życia	307
3.14.4. Nadtlenki takie, że do rany przylóż.	307
3.14.5. Bez reaktywnych form tlenu nie byłoby czerwonych jabłuszek	308
3.14.6. Czy stres oksydacyjny może być korzystny dla organizmu?	308
3.15. Reaktywne formy tlenu indukują biosyntezę białek	309
3.15.1. Szoki indukują syntezę białek chroniących przed reaktywnymi formami tlenu.	309
3.15.2. Reaktywne formy tlenu indukują biosyntezę białek w komórkach bakteryjnych	310
3.15.3. Jak to wygląda w komórkach ssaków?	312
3.16. Reaktywne formy tlenu jako mediatory i regulatory metabolizmu.	315
3.16.1. Reaktywne formy tlenu indukują różnicowanie?	316
3.16.2. Nadtlenek wodoru jako mediator działania insuliny — i nie tylko.	318
3.16.3. Reaktywne formy tlenu stymulują transport	319
3.16.4. Reaktywne formy tlenu wpływają na przekazywanie informacji do komórki i w komórce	321
3.16.5. Nadtlenki regulują syntezę prostanoidów	327
3.16.6. Tlenek azotu: niezwykle pośrednik.	328
3.16.7. Główny komórkowy bufor redoks	333
3.16.8. Reaktywne formy tlenu a apoptoza.	336
3.17. Czy powinniśmy jeść więcej antyoksydantów?	337
3.18. Smutne dziedzictwo	339
3.19. Czego możemy oczekiwać?	342

Część 4: Książka kucharska dla początkujących badaczy reaktywnych form tlenu

4.1. Detekcja anionorodnika ponadtlenkowego	343
4.1.1. Detekcja wytwarzania $O_2^{\bullet -}$ przez zaktywowane granulocyty w pełnej krwi na podstawie redukcji cytochromu c	343
4.1.2. Detekcja wytwarzania $O_2^{\bullet -}$ na podstawie redukcji błękitu nitrotetrazoliowego (NBT)	344
4.1.3. Detekcja wytwarzania $O_2^{\bullet -}$ na podstawie utleniania hydroetydyny	345
4.2. Detekcja nadtlenu wodoru.	346
4.2.1. Detekcja wytwarzania H_2O_2 na podstawie utleniania czerwieni fenolowej	346
4.2.2. Detekcja wytwarzania H_2O_2 na podstawie utleniania skopoletyny	347
4.2.3. Detekcja wytwarzania H_2O_2 na podstawie utleniania dihydrorodaminy 123	347
4.2.4. Detekcja wytwarzania H_2O_2 na podstawie utleniania 2',7'-dichlorofluorescyny.	348
4.3. Detekcja rodnika hydroksylowego	349
4.3.1. Detekcja wytwarzania rodnika hydroksylowego poprzez pomiar degradacji deoksyrobozy.	349
4.3.2. Detekcja wytwarzania rodnika hydroksylowego poprzez pomiar hydroksylacji salicylanu	350

4.3.3.	Detekcja rodnika hydroksylowego poprzez pomiar hydroksylacji benzoesu	351
4.3.4.	Detekcja rodnika hydroksylowego na podstawie tworzenia metanosulfonianu	352
4.4.	Kompetycyjne wyznaczanie stałych szybkości reakcji rodnika hydroksylowego na podstawie hamowania degradacji deoksyrybozy.	353
4.5.	Detekcja słabo związanych jonów metali.	354
4.5.1.	Oznaczenie stężenia żelaza niehemowego za pomocą ferrozyny	354
4.5.2.	Test utleniania askorbinianu w celu stwierdzenia obecności „katalitycznych jonów metali”	355
4.5.3.	Test uszkodzenia DNA przez bleomycynę do oznaczenia stężenia słabo związanych jonów żelaza	355
4.5.4.	Test uszkodzenia DNA przez fenantrolinę do oznaczenia stężenia słabo związanych jonów miedzi	356
4.5.5.	Spektroskopowa detekcja formy ferrylowej mioglobiny	357
4.6.	Badanie peroksydacji lipidów	358
4.6.1.	Oznaczenie stężenia produktów peroksydacji lipidów z kwasem tiobarbiturowym	358
4.6.1.1.	Oznaczenie spektrofotometryczne bez ekstrakcji chromogenu	359
4.6.1.2.	Oznaczenie spektrofotometryczne z ekstrakcją chromogenu.	359
4.6.1.3.	Oznaczenie fluorymetryczne	360
4.6.2.	Spektrofotometryczna detekcja sprzężonych dienów	360
4.6.3.	Jodometryczny pomiar stężenia nadtlenu	361
4.6.4.	Oznaczenie stężenia nadtlenu z oranżem ksylolowym	363
4.7.	Badanie uszkodzeń białek przez reaktywne formy tlenu	364
4.7.1.	Oznaczenie zawartości grup aminowych w białkach za pomocą fluoreskaminy.	364
4.7.2.	Oznaczenie zawartości grup tiolowych w białkach i w błonach	365
4.7.2.1.	Oznaczenie zawartości grup tiolowych za pomocą odczynnika Ellmana	365
4.7.2.2.	Oznaczenie zawartości grup tiolowych za pomocą ditiopirydyny	366
4.7.3.	Spektrofluorymetryczna detekcja aromatycznych reszt aminokwasowych i produktów ich modyfikacji w białkach	366
4.7.4.	Oznaczanie zawartości grup karbonylowych w białkach na podstawie reakcji z dinitrofenylohydrazyną	367
4.8.	Oznaczanie aktywności dysmutazy ponadtlenkowej	368
4.8.1.	Metoda redukcji NBT za pomocą ksantyny i oksydazy ksantynowej.	368
4.8.2.	Metoda cytochromowa	370
4.8.3.	Metoda adrenalinowa	371
4.8.4.	Metoda pirogallolowa.	372
4.8.5.	Metoda 6-hydroksydopaminowa	373
4.8.6.	Metoda z zastosowaniem zasadowego roztworu DMSO.	373
4.8.7.	Bezpośrednia metoda spektrofotometryczna	374
4.8.8.	Usuwanie hemoglobiny przed oznaczeniem aktywności SOD w krwinkach czerwonych.	375
4.9.	Oznaczanie aktywności katalazy	376
4.10.	Oznaczanie aktywności peroksydazy glutationowej	376
4.10.1.	Metoda bezpośrednia	376
4.10.2.	Metoda pośrednia	377
4.11.	Oznaczanie aktywności transferazy glutationowej	378
4.12.	Barwienie żeli na aktywność dysmutazy ponadtlenkowej i katalazy po rozdzielu elektroforetycznym	379
4.12.1.	Barwienie żeli na aktywność SOD	380
4.12.1.1.	Barwienie negatywowe	380
4.12.1.2.	Barwienie pozytywowe	380
4.12.2.	Barwienie żeli na aktywność katalazy	380
4.12.2.1.	Barwienie za pomocą żelazicyjanku	381
4.12.2.2.	Barwienie za pomocą peroksydazy i diaminobenzydyny	381
4.13.	Oznaczanie stężenia glutationu	382
4.13.1.	Oznaczenie całkowitego stężenia glutationu (GSH+GSSG)	382

4.13.2. Oznaczenie stężenia GSH	383
4.13.2.1. Oznaczenie za pomocą aldehydu <i>o</i> -ftalowego	383
4.13.2.2. Oznaczenie za pomocą glioksalazy I	384
4.13.3. Oznaczanie stężenia disulfidu glutationu	384
4.13.4. Oznaczanie mieszanych disulfidów białkowo-glutationowych	386
4.14. Oznaczanie stężenia askorbinianu	387
4.14.1. Oznaczenie za pomocą 2,6-dichlorofenyloindofenolu	387
4.14.2. Oznaczenie za pomocą α, α' -bipirydyli	388
4.15. Oznaczanie całkowitej zdolności antyoksydacyjnej płynów biogennych	389
4.15.1. Oznaczanie całkowitej zdolności antyoksydacyjnej na zasadzie hamowania utleniania ABTS	389
4.15.2. Oznaczanie całkowitej zdolności antyoksydacyjnej na zasadzie hamowania utleniania 2',7'-dichlorofluorescyny	391
4.15.3. Oznaczanie całkowitej zdolności antyoksydacyjnej na zasadzie redukcji jonów żelaza (III)	392
4.15.4. Oznaczanie całkowitej zdolności antyoksydacyjnej na zasadzie redukcji kationorodnika ABTS ^{•+}	393
Literatura	395
Skorowidz	436