

Received: 2016.01.28
Accepted: 2016.05.28
Published: 2016.06.14.

Właściwości fotoochronne i radioochronne nitroksydów oraz ich zastosowanie w obrazowaniu techniką magnetycznego rezonansu jądrowego

Photoprotective and radioprotective properties of nitroxides and their application in magnetic resonance imaging

Marcin Lewandowski, Krzysztof Gwoździński

Katedra Biofizyki Molekularnej Uniwersytetu Łódzkiego

Streszczenie

Nitroksydy są grupą stabilnych rodników organicznych o małej masie cząsteczkowej zawierających grupę nitroksylową $>N-O$, w której znajduje się niesparowany elektron. Jej obecność umożliwia nitroksydom udział w reakcjach redoks. Pełnią funkcję mimetyków dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) oraz stymulują aktywność katalazową hemoprotein. Utleniają jony Fe(II) do Fe(III) nie dopuszczając do reakcji Fentona i Habera-Weissa. Jako rodniki są również zdolne do zmiatania innych wolnych rodników. Nitroksydy nie są immunogenne i mutagenne oraz nie wykazują toksyczności dla organizmu człowieka.

W pracy omówiono zastosowanie nitroksydów w ochronie komórek i tkanek przed działaniem promieniowania UVA. Wstępne badania wskazują, że są bardziej skuteczne niż standardowo stosowane witaminy (C i E) oraz filtry UV. Chronią również materiał biologiczny przed działaniem promieniowania jonizującego. Zapewniają ochronę komórkom prawidłowym, ale nie chronią komórek nowotworu. Różnice w odmiennym działaniu nitroksydów są związane z warunkami utleniającymi panującymi w środowisku nowotworu, w odróżnieniu od warunków redukujących w komórkach prawidłowych.

Nitroksydy mogą mieć zastosowanie jako substancje kontrastowe w obrazowaniu metodą rezonansu magnetycznego (MR). Umożliwiają wykrywanie już nieznacznych zmian równowagi utleniająco-redukującej w obrębie nowotworu w oparciu o różny stan redoks tkanek prawidłowych i nowotworowych. Metoda bezpośredniego obrazowania z zastosowaniem nitroksydów pozwala na odróżnienie stanu prawidłowego od patologicznego. Z powodzeniem badania takie przeprowadzono na myszach zdrowych oraz z nowotworem jelita grubego i mózgu.

Słowa kluczowe:

nitroksydy • stres oksydacyjny • radioochrona • fotoochrona • MR

Summary

Nitroxides are a group of stable organic radicals of low molecular weight having a nitroxyl group $>N-O$, which has an unpaired electron. The presence of this group allows a nitroxide to participate in redox reactions. They serve as mimics of superoxide dismutase (SOD) and have stimulative properties towards haemoproteins with catalase-like activity. Nitroxides oxidize Fe (II) to Fe (III) preventing the Fenton and Haber-Weiss reactions. As the radicals have the

	<p>ability to scavenge other free radicals. Nitroxides are not immunogenic, and mutagenic and do not show toxicity to the human cells.</p> <p>The review discusses the use of nitroxide in protecting cells and tissues from the effects of UVA radiation. Preliminary studies indicate that they are more effective than conventionally used vitamins C and E and UV filters. They also protect the biological material from the effects of ionizing radiation. Nitroxides protect healthy cells and simultaneously they do not protect cancer cells from ionizing radiation. The differences in the nitroxide activity are associated with conditions prevailing in the oxidizing environment of the tumor as opposed to reducing conditions in normal cells.</p> <p>Nitroxides can be used as contrast agents in the magnetic resonance imaging (MR). They have ability of detection of subtle changes in redox equilibrium in the tumor tissue. Application of nitroxides in MR method allow to distinguish normal and pathological state of tissue. Successful investigations using this technique were conducted in mice with colon and brain cancer.</p>
<p>Keywords:</p>	<p>nitroxides • oxidative stress • radioprotection • photoprotection • MR</p>
<p>Full-text PDF:</p> <p>Word count:</p> <p>Tables:</p> <p>Figures:</p> <p>References:</p>	<p>http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1222099</p> <p>3693</p> <p>–</p> <p>4</p> <p>62</p>

Adres autora: prof. dr hab. Krzysztof Gwoździński, Katedra Biofizyki Molekularnej Uniwersytetu Łódzkiego, ul. Pomorska 141/13, 90-236 Łódź; e-mail: kgwozd@biol.uni.lodz.pl

Wykaz skrótów: **MMP** – metaloproteinaza macierzowa, **MR** – obrazowanie metodą rezonansu magnetycznego, **RFT** – reaktywne formy tlenu, **SOD** – dysmutaza ponadtlenkowa.

WSTĘP

Nitroksydy należą do grupy syntetycznych, stabilnych rodników organicznych: alifatycznych, aromatycznych, bicyklicznych lub heterocyklicznych, o małej masie cząsteczkowej. Obecność niesparowanego elektronu umiejscowionego w grupie nitroksylowej >N•O umożliwia nitroksydom udział w reakcjach redoks. Związki te pełnią funkcję mimetyków dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), metabolizując anionorodnik ponadtlenkowy do nadtlenku wodoru i tlenu [9,38]. Nitroksydy stymulują aktywność katalazową hemoprotein w neutralizacji nadtlenku wodoru [39,43]. Utleniając jony Fe(II) do Fe(III) nie dopuszczają do reakcji Fentona i Habera-Weissa [24]. Nitroksydy jako rodniki mają również zdolność do zmiany wolnych rodników w reakcjach rekombinacji oraz neutralizacji takich reaktywnych form tlenu (RFT), jak rodniki hydroksylowe, alkoksylowe, nadtlenkowe, anionorodniki ponadtlenkowe, nadtlenek wodoru i tlen singletowy [8,14,38,39,43,56,58]. Zapobiegają nitrowaniu makrocząstek przez nadtlenoazotyn [7] oraz przerywają wolnorodnikowe reakcje łańcuchowe, np. peroksydację lipidów [41,42]. Większość pozbawionych ładunku nitroksydów łatwo przenika przez błony komórkowe

na zasadzie dyfuzji, pozwalając im pełnić funkcję wewnątrzkomórkowych regulatorów poziomu stresu oksydacyjnego [28,30,32,43]. Udział w jednoelektronowych cyklach redoks jest podstawowy dla nitroksydów, jako antyoksydantów. Utlenianie tych cząsteczek doprowadza do powstania jonu oksoamoniowego, a redukcja do hydroksyloaminy, obie reakcje są odwracalne. Katalityczny mechanizm działania oraz zdolność do zmiany wielu rodzajów wolnych rodników i innych RFT odróżnia je od pozostałych przeciwutleniaczy. W określonych warunkach, np. w komórkach nowotworowych lub po zastosowaniu wyższych stężeń, mogą również działać protleniająco, podobnie jak przeciwutleniacze endogenne [17,18,22]. W komórkach, nitroksydy są redukowane do hydroksyloamin głównie z udziałem kwasu askorbinowego, ale powodują również spadek stężenia tioli oraz glutationu [6,21]. Redukcja nitroksydów zależy od wielu czynników, zachodzi szybciej w cząsteczkach nieobdarzonych ładunkiem oraz w warunkach beztlenowych [19,30,31]. Nie bez znaczenia jest również budowa pierścienia heterocyklicznego (np. pochodne piperidyny są redukowane szybciej niż pochodne pirolidyny i pirolidyny) oraz charakter podstawników w pierścieniu [10,19,20,29,30].



Obecnie, zastosowanie praktyczne nitroksydów jest związane z wykorzystaniem ich jako znaczników spinowych w technice elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR) oraz przeciwutleniaczy wspomagających systemy przeciwutleniające w komórkach. Cząsteczki wydają się również obiecującymi lekami przeciwnowotworowymi [15,17,18,25,37,40,45,46], substancjami kontrastowymi w technice rezonansu magnetycznego (MR) oraz związkami o charakterze foto- i radioochronnym.

W pracy przedstawiono właściwości i zastosowanie nitroksydów w ochronie komórek i tkanek przed promieniowaniem UVA i jonizującym, a także ich wykorzystanie jako substancji obrazujących w metodzie MR.

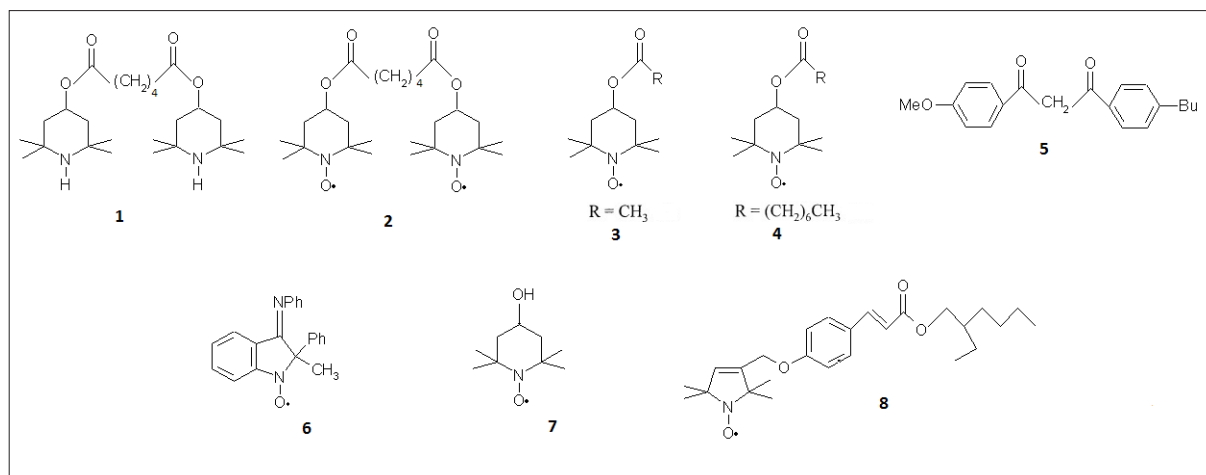
FOTOPROTEKCJA

W ostatnich latach stosowanie przeciwutleniaczy w produktach do opalania spotyka się z coraz większym zainteresowaniem. Wykorzystanie tych cząsteczek jest związane z ograniczeniem wytwarzania RFT, które powstają pod wpływem bezpośredniego działania promieniowania UVA (320-400 nm) lub pośrednio, z udziałem fotouczulaczy endogennych i w stanach zapalnych. Reaktywne formy tlenu powodują oksydacyjne uszkodzenia DNA, białek i lipidów w skórze właściwej. Do dalszych skutków zalicza się degradację tkanki łącznej (zwłaszcza kolagenu typu I oraz III) i fibroblastów oraz indukcję oparzeń słonecznych, a także procesów fotostarzenia (np. powstawanie zmarszczek, szorstkość, obwisłość oraz przebarwienia skóry) [4,5,44]. Aby zapobiec tym zjawiskom, firmy farmaceutyczne pracują nad kosmetykami zawierającymi w składzie witaminy i przeciwutleniacze o małej masie cząsteczkowej, które pełnią rolę zmiataaczy RFT. Prowadzi się intensywne prace nad wykorzystaniem do tego celu witamin C i E będących jednocześnie naturalnymi przeciwutleniaczami skóry, jednak – jak wykazały opisane badania – wydają się znacznie mniej skuteczne niż nitroksydy. Szczególną efektywnością charakteryzuje się Tempol (4-hydroksy-

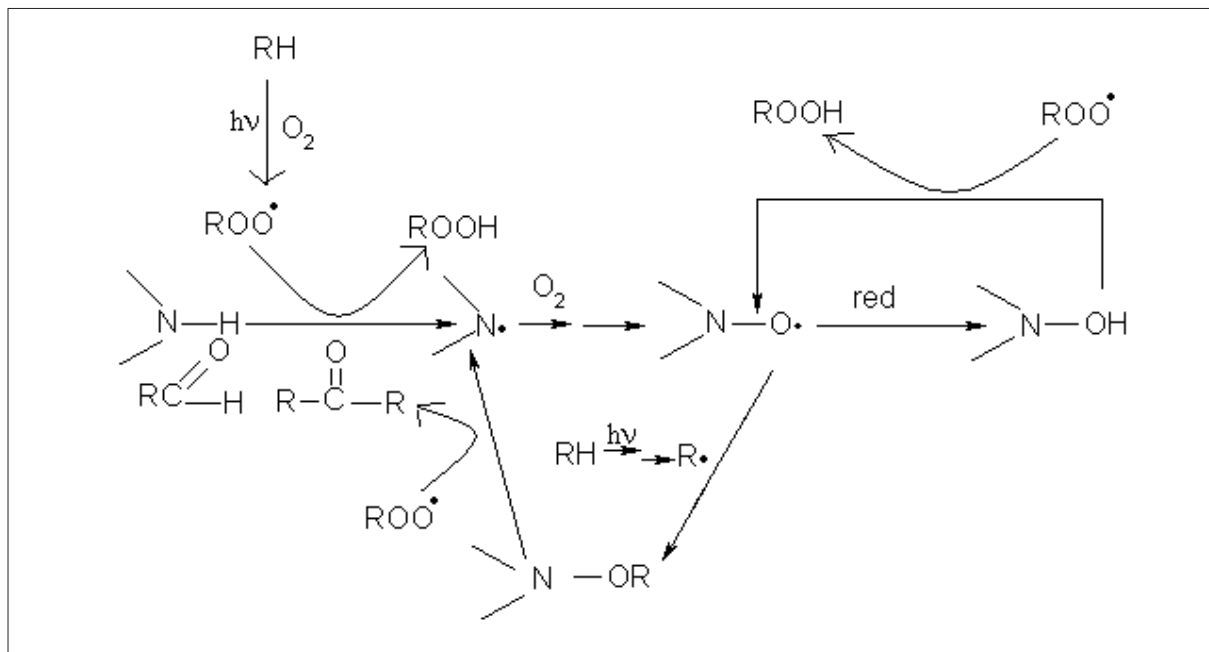
-2,2,6,6-tetrametylopiperydyno-1-oksyl) (7) oraz aromatyczny nitroksyd INDNIT (6) [3,50,51,57].

W pierwszym z opisywanych doświadczeń [11] testowano aktywność fotoochronną diamagnetycznej aminy (1) (HALS-1), estrów Tempolu (birodnik TINO) (2) oraz nitroksydów Temp2 (3) i Temp8 (4). Badania prowadzono w liposomach wielowarstwowych utworzonych z fosfatydylocholiny, poddanych działaniu promieniowania UVA. Jako substancję do porównania używano PARSOL 1789 (5), stosowany w kremach do opalania. Badano inhibicję łańcucha peroksydacji lipidów, indukowanego promieniowaniem UVA, które inicjuje proces zarówno w błonach komórkowych, jak i liposomowych. Podczas peroksydacji lipidów powstają rodniki węglowodorowe (alkilowe), nadtlenkowe, alkoksyłowe, które mogą być zmiatane przez nitroksydy lub ich pochodne, takie jak aminy drugorzędowe i hydroksyloaminy powstające w wyniku dwu- i jednoelektronowej redukcji nitroksydów. Na ryc. 2 przedstawiono inaktywację wolnych rodników powstających podczas utlenienia lipidów przez aminy drugorzędowe, nitroksydy i hydroksyloaminy.

Związek TINO był najskuteczniejszym spośród analizowanych substancji. Hamowanie peroksydacji lipidów w liposomach po 30 min ekspozycji na UVA wynosiło prawie 100% (TINO), 80% (Temp8), 45% (PARSOL 1789) oraz 20% (Temp2 i HALS-1) w 100 μ M stężeniach badanych związków. Określono również poziom związków karbonylowych, jako wskaźnik oksydacyjnego uszkodzenia białek. Ekspozycja albuminy na promieniowanie UVA powodowała 8-krotny wzrost stężenia związków karbonylowych, jednak żadna z testowanych substancji nie wpływała na jego zmniejszenie. Wydaje się więc, że pochodne Tempolu wykazują działanie fotoochronne jedynie w stosunku do lipidów, nie chroniąc białek przed utlenieniem. Jednak, co istotne, niektóre z nich (TINO i Temp8) działały skuteczniej niż PARSOL 1789 używany w kremach z filtrem. Prawdopodobnym mechanizmem aktywności nitroksydów i ich pochodnych jest zmiata-



Ryc. 1. Nitroksydy oraz substancje diamagnetyczne stosowane w ochronie przed promieniowaniem UV. (1) HALS-1, (2) birodnik TINO, (3) Temp2, (4) Temp8, (5) Parsol 1789, (6) INDNIT, (7) Tempol, (8) OC-NO



Ryc. 2. Usuwanie rodników nadtlennokowych przez aminy drugorzędowe, nitroksydy i hydroksyloaminy (na podstawie [11], zmodyfikowano)

nie wolnych rodników, np. alkilowych, nadtlennokowych i alkoksylowych powstających w czasie peroksydacji lipidów. TINO, w przeciwieństwie do PARSOLu, nie absorbował promieniowania w zakresie charakterystycznym dla promieniowania UVA [11].

W innej pracy poświęconej roli fotoochronnej nitroksydów badano ich wpływ na uszkodzenie kolagenu typu III uzyskanego ze skóry cielęcej. Znaczny stopień degradacji tego biopolimeru obserwowano po 40 min ekspozycji na promieniowanie UVA, a bardzo dobre działanie ochronne wykazał INDNIT (6). Jego zastosowanie właściwie całkowicie hamowało degradację kolagenu, która była zbliżona do grupy kontrolnej (nienaświetlanej UVA). Związek był wielokrotnie skuteczniejszy od podobnego nitroksydu indolowego, Tempolu (7) oraz witamin C i E. Sprawdzone również, jak te związki wpływają na hamowanie utleniania kolagenu, określając stężenie związków karbonylowych. Okazało się ponownie, że INDNIT zapewnił prawie całkowitą ochronę przed oksydacyjnym uszkodzeniem kolagenu, natomiast w przypadku witamin C i E ochrona wynosiła około 60%. INDNIT chronił zarówno przed degradacją kolagenu spowodowaną działaniem UVA, jak i przed uszkodzeniem oksydacyjnym tego polimeru [51].

Aktywność fotoochronna nitroksydów była badana również w fibroblastach ludzkich. Venditti i wsp. [50] określili wpływ tych substancji na indukowane przez promieniowanie UVA tworzenie reaktywnych form tlenu oraz ekspresję metaloproteiny macierzowej MMP-1 w komórkach skóry [50]. W badaniach wykorzystano promieniowanie UVA w dawce 18 J/cm², porównywalnej do działania promieniowania słonecznego na skórę człowieka w słoneczny letni dzień przez krótki okres. Dawka powodowała 25% spadek żywotności fibroblastów oraz

ponad 2-krotny wzrost wytwarzania RFT w porównaniu z próbką nienaświetlaną (kontrola). Okazało się, że nitroksydy: Tempol, INDNIT i OC-NO (8) oraz witamina E były równie skuteczne, redukując stężenie RFT do poziomu osiągniętego w nienaświetlanych komórkach kontrolnych. Badano również wpływ tych związków na ekspresję metaloproteiny MMP-1, enzymu odpowiedzialnego za degradację kolagenu w skórze właściwej. Wykazano, że dawka 18 J/cm² powodowała 10-krotny wzrost aktywności MMP-1 w komórkach w porównaniu do nienaświetlanych, a zastosowanie nitroksydów redukowało go o połowę. Popularny składnik kosmetyków do opalania, witamina E, nie miała żadnego wpływu na poziom ekspresji MMP-1, lecz zmiatała wolne rodniki niewiele mniej skutecznie niż nitroksydy [50].

Podobne badania, dotyczące roli fotoochronnej nitroksydów w stosunku do fibroblastów człowieka przeprowadzili wcześniej Yan i wsp. [57]. Wykazali, że promieniowanie ultrafioletowe A1 (340-400 nm) działające na komórki skóry, indukowało w nich znaczące zmiany. Po 24 godzinach obserwowano proporcjonalny do dawki promieniowania spadek żywotności komórek (przy 20 J/cm² żywotność wynosiła około 69%). Wykazano również obniżenie aktywności SOD i spadek wytwarzania kolagenu typu I i III. Obserwowano wzrost ilości uwalnianego dialdehydu malonowego (MDA) oraz ekspresji MMP-1 i MMP-3. Wszystkie opisane zmiany były hamowane w wyniku preinkubacji komórek z Tempolem. Nitroksyd wykazywał najsilniejsze działanie w dawce 0,5 mM, będąc znacznie skuteczniejszym od witaminy C (1 mg/ml). Jego potencjał fotoochronny był związany z aktywnością dysmutazową, utlenianiem zredukowanych jonów metali przejściowych, przerywaniem łańcuchowych reakcji rodnikowych oraz detoksykacją hiperwalentnych jonów metali [57].

Aktywność fotoochronną Tempolu wykazano również w fibroblastach myszy poddanych ekspozycji na promieniowanie UVA i UVB. Fotouszkodzenia fibroblastów były badane pośrednio, przez pomiar aktywności indukowanego promieniowaniem ultrafioletowym promotora genu kodującego elastynę, sprzężonego z genem reporterowym. Nadmierne wytwarzanie zdegenerowanej elastyny prowadzi do elastozy posłonecznej, odpowiedzialnej za fotostarzenie skóry. Tempol zapewniał ochronę przed obydwoma rodzajami promieniowania ultrafioletowego. Obserwowano znaczący spadek ekspresji genu reporterowego w fibroblastach poddanych ekspozycji zarówno na UVA (o ponad 70%), jak i UVB (o ponad 50%). Prawdopodobnym mechanizmem działania nitroksydu była dysmutacja anionorodników ponadtlenkowych (mimetyk SOD) oraz zmiatanie innych wolnych rodników [3].

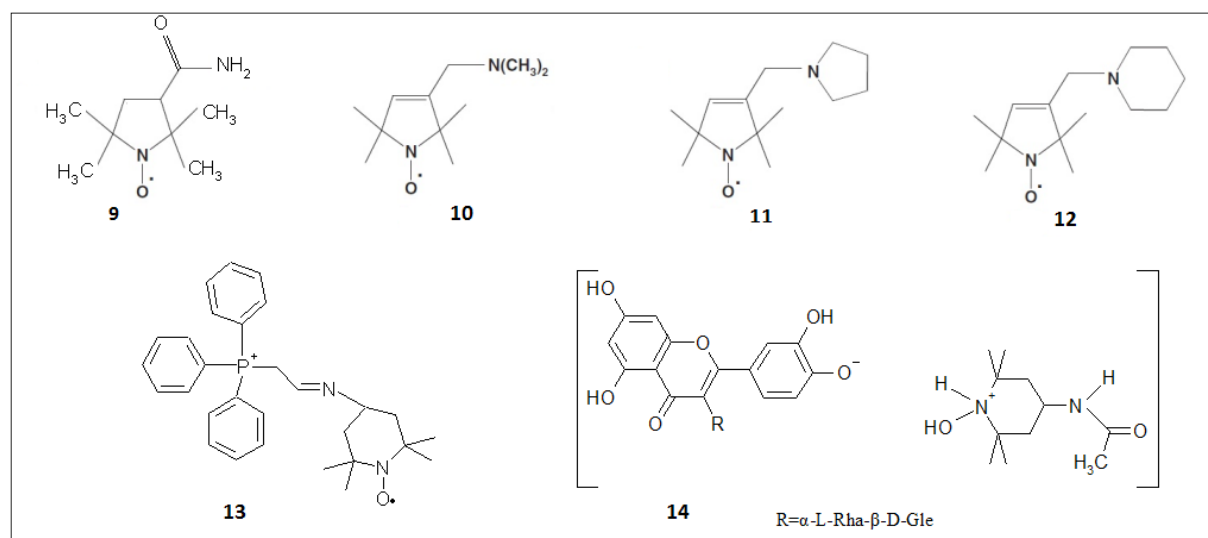
RADIOPROTEKCJA

W terapii chorób nowotworowych często jest stosowane promieniowanie jonizujące, toksyczne zarówno dla komórek zmutowanych, jak i komórek prawidłowych. Rezultatem szkodliwego działania w stosunku do tych ostatnich mogą być np.: stany zapalne błon śluzowych (mucositis), suchość błon śluzowych jamy ustnej (kserostomia), zwłóknienie tkanek oraz indukcja kancerogenezy. Z tymi oraz innymi zjawiskami wiąże się często konieczność obniżenia dawki promieniowania, co zmniejsza skuteczność terapii. Jest to powodem rosnącego zainteresowania w poszukiwaniu nowych, skutecznych radioprotektorów. Taką grupą wydają się nitroksydy, które nie są immunogenne i mutagenne oraz nie wykazują toksyczności dla organizmu człowieka. Zapewniają ochronę zdrowym komórkom, a nie chronią komórek nowotworu przed promieniowaniem jonizującym [1,2,13,23,33,35,36,47,52]. Możliwym wyjaśnieniem

wspomnianego braku protekcji w stosunku do komórek nowotworowych są warunki utleniające panujące w środowisku nowotworu, które hamują cykl redoks nitroksydów.

Badania *in vivo* prowadzone na myszach C3H wykazały skuteczność niektórych nitroksydów w ochronie ich zdrowych komórek. Nitroksydy: Tempol, 3-CP (karbamoiloproksyl) (9), pochodna aminowa (10), pochodna pirolidynowa (11) oraz pochodna piperydynowa (12) w dawkach równych MTD (maksymalna tolerowana dawka) podawane były 5 min przed naświetlaniem ciała zwierząt różnymi dawkami promieniowania. Najskuteczniejszy okazał się nitroksyd (12), dla którego $LD_{50/30}$ wynosiła 11,47 Gy, podczas gdy wartość dla grupy kontrolnej bez radioprotektora wynosiła zaledwie 7,9 Gy. Mniejszą skutecznością charakteryzowały się Tempol i 3-CP, dla których $LD_{50/30}$ wynosiła odpowiednio 9,11 i 9,5 Gy. Przeprowadzone badania wykazały, iż bardzo ważny jest moment podania nitroksydów. Nitroksyd (12) podany nie 5 min przed, ale zaraz po naświetlaniu dawką 11 Gy, nie działał ochronnie. Autorzy sugerują, że rola nitroksydów jest związana z ochroną komórek szpiku kostnego przed promieniowaniem jonizującym [13].

Ślinianki są gruczołami szczególnie wrażliwymi na radioterapię, która prowadzi do kserostomii. Podobnie, jak w poprzednim doświadczeniu, badano wpływ Tempolu na działanie radioochronne u myszy C3H, a konkretnie na ich ślinianki. Związek podawano na 10 min przed naświetlaniem różnymi dawkami promieniowania. Okazało się, że skutecznie chronił ślinianki przed uszkodzeniem, co przekładało się na większe wydzielanie śliny. Przy dawkach 15, 17,5 i 20 Gy spadek w wydzielaniu śliny wynosił odpowiednio około 60, 70 i 80%. Natomiast dla myszy poddanych działaniu Tempolu obserwowano znacznie mniejsze wartości w obniżeniu



Ryc. 3. Nitroksydy i hydroksyloaminy stosowane jako radioprotektory przed promieniowaniem jonizującym. (9) 3-CP, (10) pochodna dimetyloaminy, (11) pochodna pirolidynowa, (12) pochodna piperydynowa, (13) TPEY-Tempo, (14) Rutoksył

wydzielania, tj. 30, 50 i 70%. Zastosowana dawka nitroksydu wynosiła 80% dawki LD₅₀ (275 mg/kg m.c.), a jego aktywność radioochronna prawdopodobnie wiązała się z eliminacją pierwszorzędowych produktów radiolizy wody (np. atomów H i rodników OH) oraz przerwaniu reakcji Fentona w wyniku utlenienia jonów Fe(II) [52].

Okazuje się, że nitroksydy mogą mieć zastosowanie radioochronne nie tylko u myszy, ale również u ludzi, co wykazano w badaniu dotyczącym ochrony zdrowych komórek mózgu w terapii glejaka [33]. Prawdopodobnie główną przyczyną śmierci komórek w wyniku napromieniowania jest apoptoza, indukowana przez szlak mitochondrialny. Dlatego też, przez neutralizację wolnych rodników i innych RFT przez nitroksydy starano się zahamować ten szlak nie dopuszczając do indukcji apoptozy w zdrowych komórkach. W dużym uproszczeniu, założenie to opierało się na tym, iż anionorodnik ponadtlenkowy i nadtlenek wodoru powodują utlenianie kardiolipiny, która wpływa na uwolnienie cytochromu c z mitochondriów i tworzenie przepuszczalnych kanałów w błonie zewnętrznej mitochondrialnej zbudowanych z białka t-Bid. Rolą nitroksydów miałyby być przerwanie szlaku i ochrona zdrowych komórek przed promieniowaniem. Wiedząc, że komórki glejaka (podobnie jak większość komórek nowotworowych) zawierają kilkakrotnie mniejszą liczbę mitochondriów niż zdrowe komórki mózgu, użyto nitroksydu TPEY-Tempo (13) (trifenylfosfoniowa pochodna Tempo). Nitroksyd charakteryzuje się silną kompartmentalizacją w mitochondriach, a więc większą ochroną w stosunku do komórek zdrowych. Badania przeprowadzone z użyciem aneksyny V wykazały, iż półgodzinna preinkubacja zdrowych komórek mózgu BB19 i glejaka T98G z TPEY-Tempo zapewniła silną ochronę tylko tym pierwszym. Procent komórek zdrowych, barwionych aneksyną wynosił: 31,6% dla kontroli i 15,8% w przypadku preinkubacji z 25 μM stężeniem nitroksydu. Odwrotną zależność obserwowano natomiast w komórkach glejaka, dla których zastosowanie 50 μM TPEY-Tempo powodowało, że prawie 100% komórek było aneksynopozytywnych (przy 42,3% dla kontroli). Wynika więc, iż nitroksyd jest skutecznym radioprotektorem w zdrowych komórkach mózgowych i jednocześnie zwiększa wrażliwość na promieniowanie γ w komórkach nowotworowych, co obserwowano również na innej linii komórkowej glejaka U87MG. Powyższe właściwości nitroksydu potwierdzono przez badanie poziomu uwolnionego cytochromu c oraz aktywności kaspaz [33].

Inną substancją, która może mieć potencjalne zastosowanie w radioprotekcji, jest Rutoksyl (14) będący kompleksem hydroksyloaminy z rutyną. Jego aktywność porównywano z rutyną, flawonoidem będącym naturalnym przeciwutleniaczem roślinnym, hamującym peroksydację lipidów. Obecność hydroksyloaminy wpływała na właściwości przeciwutleniające Rutoksylu, zdolność zmiatania anionorodnika ponadtlenkowego wzrastała o 35% w porównaniu z rutyną. Związek wykazywał także wyższy potencjał radioochronny, bowiem powstały

w wyniku działania promieniowania γ rodnik hydroksylowy był skuteczniej zmiatany przez Rutoksyl niż przez rutynę. Różnica była szczególnie widoczna przy wyższych stężeniach związków i wyższych dawkach promieniowania [47].

Jednym z lepiej poznanych nitroksydów o potencjalnym działaniu radioochronnym jest JP4-039, będący koniugatem Tempaminy (4-amino-2,2,6,6-tetrametylo-piperidyno-N-oksyl) z hemigramicydyną S. Jego działanie było badane *in vitro* w komórkach embrjonalnych myszy [35], jak również *in vivo* [1,23,36]. JP4-039 podawany w dawce 20 μM wnikał do mitochondriów komórek embrjonalnych, wykazując aktywność radioochronną. Stosowany zarówno na 10 min przed, jak i godzinę po ekspozycji na promieniowanie γ (10 Gy), skutecznie hamował wytwarzanie anionorodnika ponadtlenkowego i utlenianie kardiolipiny. Inkubacja komórek z nitroksydem powodowała ograniczenie apoptozy: niższą akumulację cytochromu c w cytosolu, zmniejszenie stopnia eksternalizacji fosfatydylseryny w błonach komórkowych oraz zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G2/M [35]. W przeciwieństwie do innych nitroksydów, JP4-039 wykazywał aktywność ochronną będąc podawanym nie tylko przed, ale również po naświetlaniu [35], co wskazuje na inny mechanizm jego aktywności niż usuwanie produktów radiolizy wody. Prawdopodobnie był związany ze zmiataniem RFT wytwarzanych w mitochondriach i/lub zahamowaniem redukcji tlenu cząsteczkowego do anionorodnika ponadtlenkowego przez przyjęcie elektronów przez nitroksyd, w tych organellach. JP4-039 mógł działać jako akceptor elektronów również w błonach komórkowych i jądrowych, mających kompleksy enzymatyczne potencjalnie generujące anionorodniki ponadtlenkowe [35].

Skuteczność nitroksydu została później potwierdzona *in vivo* na myszach [36]. Przeciwdziałał zapaleniu przełyku, jednemu z ważniejszych działań niepożądanych radioterapii raka płuca. Wykazano, że u myszy otrzymujących JP4-039 w postaci liposomalnej przed naświetlaniem klatki piersiowej (29 Gy jednokrotnie lub 11,5 Gy czterokrotnie) nie dochodziło do zapalenia przełyku i przeżywały dłużej od osobników kontrolnych. Nitroksyd chronił nie tylko komórki przełyku, ale lokował się również w krwi, szpiku kostnym i wątrobie, chroniąc je przed szkodliwym działaniem radioterapii. JP4-039 wnikał też do komórek nowotworu płuca, nie wykazując względem nich protekcji [36].

U około 10% pacjentów poddawanych radioterapii obserwuje się poważne działania niepożądane, których nasilenie charakteryzuje się dużą zmiennością w populacji. Jednym z cenniejszych modeli badań nad toksycznością promieniowania jonizującego są linie komórkowe wywodzące się z osobników chorujących na anemię Fanconiego. Choroba charakteryzuje się m.in. dużą podatnością na rozwój nowotworów oraz dużą wrażliwością na promieniowanie γ (spowodowaną upośledzeniem mechanizmów naprawy DNA), co ogranicza stosowa-



nie radioterapii u pacjentów. Badania *in vivo* [1,23] i *in vitro* [2,23] dowiodły, iż zastosowanie nitroksydu JP4-039 przyczyniło się do ochrony zdrowych komórek przed toksycznymi działaniami promieniowania γ . Związek zapobiegał owrzodzeniom błon śluzowych, chronił przed uszkodzeniem komórek zrębowych szpiku kostnego i tkanek jamy ustnej. Aktywność radioochronną JP4-039 wyjaśniono zdolnością do zmiatania RFT obecnych w mitochondriach. Zapobiegał utlenianiu kardiolipiny, dzięki czemu cytochrom *c* nie był uwalniany do cytosolu i nie dochodziło do inicjacji apoptozy. Badania ekspresji genów kodujących białka prozapalne i aktywne w odpowiedzi na stres oksydacyjny oraz uszkodzenie DNA, potwierdziły protekcyjną aktywność JP4-039. Kompleks nitroksydu z hemigramicydyną S może więc znaleźć zastosowanie jako środek radioochronny w radioterapii chorób nowotworowych, szczególnie wśród pacjentów cierpiących dodatkowo na anemię Fanconiego [1,2,23].

ZASTOSOWANIE NITROKSYDÓW W OBRAZOWANIU METODĄ REZONANSU MAGNETYCZNEGO (MR)

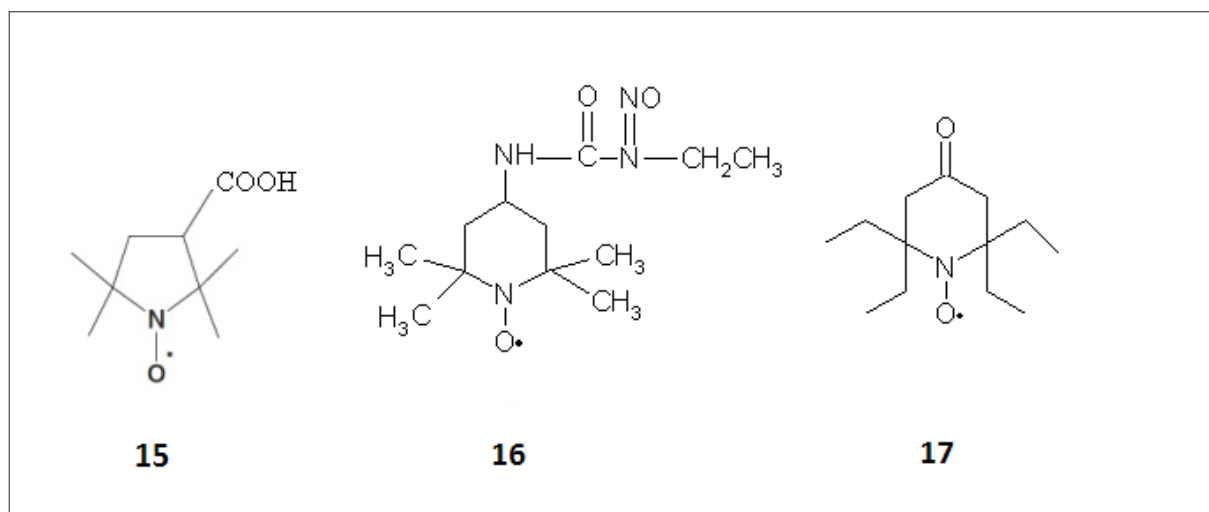
Praktycznym zastosowaniem nitroksydów jest użycie ich jako środków kontrastowych w obrazowaniu metodą rezonansu magnetycznego (MR), a ściślej w obrazowaniu nowotworów opartym o zmiany równowagi redoks [13,16,59]. Ulega ona zachwianiu szczególnie w komórkach nowotworowych, charakteryzujących się intensyfikacją procesów glikolizy i szlaku pentozofosforanowego (efekt Warburga), czego rezultatem jest zwiększone wytwarzanie związków redukujących, takich jak: NADPH, NADH, FADH₂ [53,54,55]. Dla tych komórek typowa jest również nasilona synteza RFT [48], których ilość regulowana jest przez wspomniane reduktory. W komórce nowotworowej utrzymują RFT i inne utleniacze na właściwym poziomie, na tyle niskim, aby nie indukowały apoptozy i jednocześnie na tyle wysokim, aby zapewniały niestabilność genomu [59,62]. Sygnalizacja redoks odgrywa główną rolę w rozwoju nowotwo-

rów. Komórki i tkanki prawidłowe charakteryzują się niskim stężeniem RFT utrzymywanym na stałym poziomie. Wzrost ich stężenia powyżej pewnego poziomu krytycznego, prowadzi do niestabilności genomu.

Związki redukujące i RFT mogą brać udział w konwersji nitroksydu (paramagnetyka, mającego właściwości kontrastowe) do hydroksyloaminy i jonu oksoamoniowego (cząsteczek o charakterze diamagnetycznym, niemających właściwości kontrastowych). Te, reagując m.in. z anionorodnikiem ponadtlenkowym prowadzą do odtworzenia nitroksydu. Przemiany umożliwiają uzyskanie dokładnych obrazów odzwierciedlających stan redoks badanych tkanek i wykrycie nowotworu.

Zaburzenia równowagi redoks w komórkach nowotworowych mogą być też spowodowane nieprawidłowościami w działaniu mitochondriów i kompleksów oksydazy NADPH, prowadzącymi do nadmiernego wytwarzania RFT [26]. Związane są z indukcją stanu hipoksji oraz syntezą tlenu azotu i jego reaktywnych pochodnych. Związki zaangażowane są w komórkowe szlaki sygnałowe powodujące adaptację nowotworu do stresu oksydacyjnego, indukcję niekontrolowanych podziałów i immortalizację. Nasilonemu wytwarzaniu reaktywnych form tlenu i azotu towarzyszy znaczne zapotrzebowanie na związki redukujące i przeciwutleniacze, które często są „wysysane” z sąsiadujących, zdrowych tkanek narażając je na stres oksydacyjny [59].

W MR mogą być wykorzystywane pochodne nitroksydów piperolidynowych (np. karboksyproksyl) i piperidynowych (np. pochodne Tempolu), zależnie od celu ich użycia. Pochodne piperolidynowe wydają się skuteczniejsze w obrazowaniu opartym o równowagę redoks krwi i środowiska komórek, gdyż charakteryzują się dobrą rozpuszczalnością w wodzie i dłuższym czasem „życia”, tj. mniejszą podatnością na redukcję w krwiobiegu oraz wydłużonym czasem redukcji w komórkach [29]. Natomiast pochodne piperidynowe będące bardziej



Ryc. 4. Nitroksydy stosowane jako środki kontrastowe w obrazowaniu metodą MRI. (15) karboksyproksyl, (16) SLENU, (17) Teepon

wrażliwymi na zmiany stężeń utleniaaczy i reduktorów, wydają się bardziej skuteczne w badaniach aktywności stanu redoks tkanek i narządów [12,34]. Ważnym zagadnieniem jest wykorzystanie nitroksydów w rezonansie magnetycznym mózgu, gdyż w przeciwieństwie do powszechnie stosowanych w MR związków gadolinu, nitroksydy piperidynowe mają zdolność przenikania bariery krew-mózg [59].

Pochodne nitroksydów piroolidynowych (karboksyprok-syl (15) i karbamoiloprosyl (9)) oraz piperidynowych [SLENU (16), pochodna nitrozomocznika znakowana TEMPO (2,2,6,6-tetrametylopiperydydo-1-oksylem)] mogą znaleźć zastosowanie w diagnostyce raka mózgu i jelita grubego za pomocą MR. Metoda bezpośredniego obrazowania aktywności redoks tkanek pozwala odróżnić stan prawidłowy od nowotworowego. Przeprowadzono takie badania na myszach zdrowych oraz z nowotworem jelita grubego i mózgu [59]. Aktywność redoks tkanek *in vivo* określono za pomocą nitroksydu metodą obrazowania w rezonansie magnetycznym (MR) uśpionych zwierząt. Metoda jest oparta na cyklu redoks nitroksydu związanym z pojawianiem się lub zanikiem sygnału MR. Markerem diagnostycznym był okres półtrwania nitroksydu w komórkach prawidłowych i nowotworowych tkanek. Przeprowadzone badania dostarczyły bezpośrednich dowodów, że tkanki prawidłowe i nowotworowe ssaków charakteryzują się różnym stanem redoks, co było podstawą do diagnozowania nowotworu. W tkankach prawidłowych charakteryzujących się wysokim potencjałem przeciwutleniającym nitroksyd jest szybko redukowany do hydroksyloaminy. Natomiast w przypadku tkanek nowotworowych proces jest znacząco spowolniony. W związku z tym, tkanki nowotworowe charakteryzowały się długim czasem półtrwania sygnału MR ($T_{1/2} > 14$ min), co wskazuje na dużą aktywność utleniającą, podczas gdy tkanki prawidłowe krótkim sygnałem MR ($T_{1/2} = 1-3$ min), co wskazuje na małą aktywność utleniającą. Wyniki mogą także sugerować, że tkanki prawidłowe organizmu, jeśli są podatne na uszkodzenia oksydacyjne mogą doprowadzić do nowotworzenia [59].

W wyniku zastosowania SLENU, jako środka kontrastowego w rezonansie magnetycznym (podanego 100 s po rozpoczęciu skanowania) otrzymano różne krzywe intensywności sygnału MR. W mózgu myszy zdrowych nitroksyd stopniowo wnikał do badanego narządu, powodując wzrost intensywności sygnału MR, lecz jego nagły spadek w stosunkowo krótkim czasie był spowodowany szybką redukcją nitroksydu do niekontrastowej hydroksyloaminy, co wskazywało na dużą aktywność redukcyjną zdrowych tkanek. W mózgu osobników z nowotworem nie obserwowano spadku intensywności sygnału MR, co dowodzi dużej aktywności utleniającej komórek nowotworowych. W badaniu mózgu skuteczny okazał się opisywany wcześniej nitroksyd hydrofobowy SLENU, dobrze przenikający do tkanek. Natomiast piroolidynowe nitroksydy hydrofilowe: karboksyprok-syl i karbamoiloprosyl zawiodły ze względu na brak

przenikania do komórek, nie wykazano żadnej różnicy sygnału MR między mózgiami kontrolnymi i mózgiami z neuroblastomą. Dowodzi to, że do skutecznego obrazowania stanu redoks tkanek, a szczególnie tkanki mózgu, konieczne jest wykorzystanie nitroksydów o charakterze hydrofobowym [60]. Potwierdzenie tego, można znaleźć w starszej pracy tego zespołu, w której nitroksydy piperidynowe SLENU i Tempol okazały się znacznie skuteczniejsze w obrazowaniu MR niż pochodne piroolidynowe [61]. Potencjalne zastosowanie w rezonansie magnetycznym może mieć również opisany wyżej nitroksyd (12). Jak wykazano, jest odpowiednio wrażliwy na zmiany stanu redoks w mózgu, osiąga w nim duże stężenia oraz przekracza barierę krew-mózg na tyle łatwo, że mógłby być wykorzystywany w technice MR [13].

W innych badaniach przeprowadzonych na modelu mysim choroby Parkinsona udowodniono, iż nitroksydy piperidynowe łatwo wnikają do komórek i charakteryzują się właściwościami kontrastowymi, odzwierciedlającymi zaburzoną równowagę redoks w zmienionych chorobowo obszarach mózgu [60]. Nitroksydy mogą znaleźć również zastosowanie w obrazowaniu zmian zachodzących w nerkach w wyniku hipercholesterolemii [49]. Pewnym ograniczeniem zastosowania nitroksydów jako środków kontrastowych metodą obrazowania MR jest ich redukcja *in vivo* np. przez kwas askorbinowy. Rozwiązaniem problemu jest użycie odpowiedniej pochodnej heterocyklicznej z określonym podstawnikiem. Okazało się, że zamiana grup metylowych na etylowe w pierścieniu piperidynowym nitroksydu, co wykazano na przykładzie Teeponu (17), spowodowała wyjątkową jego odporność na redukcję przez kwas askorbinowy i inne związki redukujące występujące w komórkach [16]. Związek skutecznie przenikał przez błony komórkowe oraz barierę krew-mózg. Zależnie od zastosowanego stężenia emulsji tłuszczu (INTRAFAT), w której zawieszany był Teepon, uzyskano różną dystrybucję nitroksydu w ciele myszy. Zastosowanie 5% roztworu Teeponu powodowało jego kumulację głównie w narządach hydrofobowych, takich jak mózg. Natomiast użycie 20% roztworu niwelowało tę swoistość, bowiem dystrybucję nitroksydu obserwowano w wielu innych tkankach np. mięśniach. Ważną cechą Teeponu jest również duża stabilność, np. okres półtrwania w mózgu zdrowych myszy wynosił około 90 min. Dla porównania, okres półtrwania wspomnianego wyżej SLENU wynosił zaledwie około 80 s. Teepon jest związkiem o potencjalnym zastosowaniu w badaniu metodą MR narządów o dużej zawartości przeciwutleniaaczy, w których inne nitroksydy narażone są na szybką redukcję (np. w mózgu) [16].

PODSUMOWANIE

Nitroksydy wydają się bardzo obiecującymi związkami chemicznymi, do wykorzystania w przemyśle kosmetycznym. Chronią przed utlenianiem białek i lipidów indukowanym przez promieniowanie UVA. Protekcyjna aktywność nitroksydów obejmuje również fibroblasty, w których związki te neutralizują RFT i nie dopuszczają



do ich powstawania oraz wpływają na aktywność MMP-1. Uzyskane wyniki dowodzą, że niektóre nitroksydy mają lepsze właściwości fotoochronne wobec skóry, niż powszechnie stosowane w produktach kosmetycznych przeciwutleniacze (witaminy C i E) i inne związki absorbujące promieniowanie UVA (np. PARSOL 1789). Różnica w skuteczności witamin i nitroksydów może wynikać z różnych mechanizmów ich działania.

Innym przykładem zastosowania tych związków jest ich rola radioochronna. Jak wykazano, nitroksydy skutecznie chronią zdrowe, niecelowane tkanki przed szkodliwym działaniem promieniowania jonizującego. Pozwala to na zastosowanie większych dawek promieniowania. Jednocześnie, nitroksydy wykazują toksyczność w stosunku do komórek nowotworowych, zwiększając skuteczność radioterapii. Eliminując produkty radiolizy

wody oraz utleniając jony Fe(II) nie dopuszczają do indukcji apoptozy w zdrowych komórkach, jednocześnie nasilając ją, w komórkach nowotworowych.

Nitroksydy mogą znaleźć zastosowanie jako środki kontrastowe w MR, dzięki subtelnej równowadze redoks i jej zmianom, prowadzącym do utleniania i redukcji nitroksydu (kontrastowego), odpowiednio do jonu oksoamoniowego i hydroksyloaminy (niekontrastowych). Nitroksydy okazywały się też skutecznymi środkami kontrastowymi w badaniach mózgu i innych narządów techniką MR.

PODZIĘKOWANIE

Autorzy dziękują Pani mgr Julicie Rochowiak za wykonanie rysunków.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Berhane H., Shinde A., Kalash R., Xu K., Epperly M.W., Goff J., Francicola D., Zhang X., Dixon T., Shields D., Wang H., Wipf P., Li S., Gao X., Greenberger J.S.: Amelioration of radiation-induced oral cavity mucositis and distant bone marrow suppression in Fanconi anemia *Fancd2*^{-/-} (FVB/N) mice by intraoral GS-nitroxide JP4-039. *Radiat. Res.*, 2014; 182: 35-49
- [2] Bernard M.E., Kim H., Berhane H., Epperly M.W., Francicola D., Zhang X., Houghton F., Shields D., Wang H., Bakkenist C.J., Frantz M.C., Forbeck E.M., Goff J.P., Wipf P., Greenberger J.S.: GS-nitroxide (JP4-039)-mediated radioprotection of human Fanconi anemia cell lines. *Radiat. Res.*, 2011; 176: 603-612
- [3] Bernstein E.F., Kong, S.K., Brown D.B., Kwak, B.C., Takeuchi T., Gasparro F.P., Uitto J.: The nitroxide tempol affords protection against ultraviolet radiation in a transgenic murine fibroblast culture model of cutaneous photoaging. *Exp. Dermatol.*, 2001; 10: 55-61
- [4] Bose B., Agarwal S., Chatterjee S.N.: UV-A induced lipid peroxidation in liposomal membrane. *Radiat. Environ. Biophys.*, 1989; 28: 59-65
- [5] Bose B., Chatterjee S.N.: Correlation between UVA-induced changes in microviscosity, permeability and malondialdehyde formation in liposomal membrane. *J. Photochem. Photobiol. B*, 1995; 28: 149-153
- [6] Bujak S., Gwoździński K.: Nitroxides lead to reduced level of glutathione in red blood cells. W: Free radical and oxidative stress: chemistry and pathological implications, red.: Galaris G. Medimond International Proceedings, 2003; 105-108
- [7] Carroll R.T., Galatsis P., Borosky S., Kopec K.K., Kumar V., Althaus J.S., Hall E.D.: 4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl (tempol) inhibits peroxynitrite-mediated phenol nitration. *Chem. Res. Toxicol.*, 2000; 13: 294-300
- [8] Charloux C., Paul M., Loisanse D., Astier A.: Inhibition of hydroxyl radical production by lactobionate, adenine, and tempol. *Free Radic. Biol. Med.*, 1995; 19: 699-704
- [9] Chateaufneuf J., Luszyk J., Ingold K.U.: Absolute rate constants for the reactions of some carbon-centered radicals with 2,2,6,6-tetramethylpiperidine-N-oxyl. *J. Org. Chem.*, 1988; 53: 1629-1632
- [10] Czepas J., Koceva-Chyla A., Gwoździński K., Józwiak Z.: Different effectiveness of piperidine nitroxides against oxidative stress induced by doxorubicin and hydrogen peroxide. *Cell Biol. Toxicol.*, 2008; 24: 101-112
- [11] Damiani E., Castagna R., Greci L.: The effects of derivatives of the nitroxide tempol on UVA-mediated in vitro lipid and protein oxidation. *Free Radic. Biol. Med.*, 2002; 33: 128-136
- [12] Davis R.M., Matsumoto S., Bernardo M., Sowers A., Matsumoto K., Krishna M.C., Mitchell J.B.: Magnetic resonance imaging of organic contrast agents in mice: capturing the whole-body redox landscape. *Free Radic. Biol. Med.*, 2011; 50: 459-468
- [13] Davis R.M., Sowers A.L., DeGraff W., Bernardo M., Thetford A., Krishna M.C., Mitchell J.B.: A novel nitroxide is an effective brain redox imaging contrast agent and *in vivo* radioprotector. *Free Radic. Biol. Med.*, 2011; 51: 780-790
- [14] Dikalov S., Grigor'ev I.A., Voinov M., Bassege E.: Detection of superoxide radicals and peroxynitrite by 1-hydroxy-4-phosphonoxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine: quantification of extracellular superoxide radicals formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1998; 248: 211-215
- [15] Dilip A., Cheng G., Joseph J., Kunnimalaiyaan S., Kalyanaraman B., Kunnimalaiyaan M., Gamblin T.C.: Mitochondria-targeted antioxidant and glycolysis inhibition: synergistic therapy in hepatocellular carcinoma. *Anticancer Drugs*, 2013; 24: 881-888
- [16] Emoto M., Yamada K., Yamato M., Fujii H.G.: Novel ascorbic acid-resistant nitroxide in a lipid emulsion: an efficient brain imaging contrast agent for MRI of small rodents. *Neurosci. Lett.*, 2013; 546: 11-15
- [17] Gariboldi M.B., Lucchi S., Caserini C., Supino R., Oliva C., Monti E.: Antiproliferative effect of piperidine nitroxide tempol on neoplastic and nonneoplastic mammalian cell lines. *Free Radic. Biol. Med.*, 1998; 24: 913-923
- [18] Gariboldi M.B., Rimoldi V., Supino R., Favini E., Monti E.: The nitroxide tempol induces oxidative stress, p21^{waf1/cip1}, and cell death in HL60 cells. *Free Radic. Biol. Med.*, 2000; 29: 633-641
- [19] Głębska J., Gwoździński K.: Oxygen-dependent reduction of nitroxides by ascorbic acid and glutathione. *EPR investigations. Curr. Top. Biophys. (Suppl.)*, 1998; 22: 75-82
- [20] Głębska J., Gwoździński K.: Nitroxides as protectors against oxidative damage induced by Fenton system. *Curr. Top. Biophys.*, 2000; 24: 57-63
- [21] Głębska J., Skolimowski J., Kudzin Z., Gwoździński K., Grzelak A., Bartosz G.: Pro-oxidative activity of nitroxides in their reactions with glutathione. *Free Radic. Biol. Med.*, 2003; 35: 310-316

- [22] Goralska M., Holley B., McGahan M.C.: The effects of tempol on ferritin synthesis and Fe metabolism in lens epithelial cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 2000; 1497: 51-60
- [23] Greenberger J.S., Berhane H., Shinde A., Rhieu B.H., Bernard M., Wipf P., Skoda E.M., Epperly M.W.: Can radiosensitivity associated with defects in DNA repair be overcome by mitochondrial-targeted antioxidant radioprotectors. *Front. Oncol.*, 2014; 4: 24
- [24] Grinberg L.N., Samuni A.: Nitroxide stable radical prevents primaquine-induced lysis of red blood cell. *Biochim. Biophys. Acta*, 1994; 1201: 284-288
- [25] Guo J., Zhang Y., Zhang J., Liang J., Zeng L., Guo G.: Anticancer effect of tert-butyl-2 (4,5-dihydrogen-4,4,5,5-tetramethyl-3-O-1H-imidazole-3-cationic-1-oxyl-2)-pyrrolidine-1-carboxylic ester on human hepatoma HepG2 cell line. *Chem. Biol. Interact.*, 2012; 199: 38-48
- [26] Gupta S.C., Hevia D., Patchva S., Park B., Koh W., Aggarwal B.B.: Upsides and downsides of reactive oxygen species for cancer: the roles of reactive oxygen species in tumorigenesis, prevention, and therapy. *Antioxid. Redox Signal.*, 2012; 16:1295-1322
- [27] Gwoździński K.: Effect of cupric ions on the permeability of erythrocyte membrane to non-electrolyte spin labels. *Physiol. Chem. Phys. Med. NMR*, 1985; 17: 431-434
- [28] Gwoździński K.: Effect of thiol reactive reagents and ionizing radiation on the permeability of erythrocyte membrane for non-electrolyte spin labels. *Radiat. Environ. Biophys.*, 1986; 25: 107-111
- [29] Gwoździński K., Bartosz G.: Nitroxide reduction in human red blood cells. *Curr. Top. Biophys.*, 1996; 20: 60-65
- [30] Gwoździński K., Bartosz G., Leyko W.: Effect of γ radiation on the transport of spin-labeled compounds across the erythrocyte membrane. *Radiat. Environ. Biophys.*, 1981; 19: 275-285
- [31] Gwoździński K., Bartosz G., Leyko W.: Effect of γ radiation on the transport of electrolyte spin labels across human erythrocyte. *Stud. Biophys.*, 1982; 89: 141-145
- [32] Gwoździński K., Bartosz G., Leyko W.: Effect of thiol reactive reagents and ionizing radiation on the permeability of erythrocyte membrane for spin-labeled non-electrolytes. *Radiat. Environ. Biophys.*, 1983; 22: 53-59
- [33] Huang Z., Jiang J., Belikova N.A., Stoyanovsky D.A., Kagan V.E., Mintz A.H.: Protection of normal brain cells from γ -irradiation-induced apoptosis by a mitochondria-targeted triphenyl-phosphonium-nitroxide: a possible utility in glioblastoma therapy. *J. Neurooncol.*, 2010; 100: 1-8
- [34] Hyodo F., Matsumoto K., Matsumoto A., Mitchell J.B., Krishna M.C.: Probing the intracellular redox status of tumors with magnetic resonance imaging and redox-sensitive contrast agents. *Cancer Res.*, 2006; 66: 9921-9928
- [35] Jiang J., Belikova N.A., Hoye A.T., Zhao Q., Epperly M.W., Greenberger J.S., Wipf P., Kagan V.E.: A mitochondria-targeted nitroxide/hemigramicidin S conjugate protects mouse embryonic cells against g γ radiation. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 2008; 70: 816-825
- [36] Kim H., Bernard M.E., Epperly M.W., Shen H., Amoscato A., Dixon T.M., Doemling A.S., Li S., Gao X., Wipf P., Wang H., Zhang X., Kagan V.E., Greenberger J.S.: Amelioration of radiation esophagitis by orally administered p53/Mdm2/Mdm4 inhibitor (BEB55) or GS-nitroxide. *In Vivo*, 2011; 25: 841-848
- [37] Koceva-Chyla A., Kochman A., Głębska J., Gwoździński K., Józwiak Z., Metodiewa D.: Tempicol-3, a novel low toxic piperidine-nitroxide stable radical and antioxidant, acts as apoptosis inducer and cell proliferation modifier of Yoshida sarcoma cells in vivo. *Anticancer Res.*, 2000; 20: 4611-4618
- [38] Krishna M.C., Russo A., Mitchell J.B., Goldstein S., Dafni H., Samuni A.: Do nitroxide antioxidants act as scavengers of o_2^- or as SOD mimics? *J. Biol. Chem.*, 1996; 271: 26026-26031
- [39] Krishna M.C., Samuni A., Taira J., Goldstein S., Mitchell J.B., Russo A.: Stimulation by nitroxides of catalase-like activity of hemeproteins. Kinetics and mechanism. *J. Biol. Chem.*, 1996; 271: 26018-26025
- [40] Lewandowski M., Gwoździński K.: Wykorzystanie nitroksydów jako leków oraz przeciwtleniaczy w stresie oksydacyjnym indukowanym przez chemioterapeutyki stosowane w terapii nowotworów. *Postępy Biol. Kom.*, 2015; 42: 667-686
- [41] Miura Y., Utsumi H., Hamada A.: Antioxidant activity of nitroxide radicals in lipid peroxidation of rat liver microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1993; 300: 148-156
- [42] Nilsson U.A., Olsson L.I., Carlin G., Bylund-Fellenius A.C.: Inhibition of lipid peroxidation by spin labels: relationships between structure and function. *J. Biol. Chem.*, 1989; 264: 11131-11135
- [43] Samuni A.M., DeGraff W., Krishna M.C., Mitchell J.B.: Cellular sites of H_2O_2 -induced damage and their protection by nitroxides. *Biochim. Biophys. Acta*, 2001; 1525: 70-76
- [44] Schaefer H., Chardon A., Moyal D.: Photoprotection of skin against ultraviolet A damage. *Methods Enzymol.*, 2000; 319: 445-465
- [45] Selvendiran K., Ahmed S., Dayton A., Kuppusamy M.L., Tazi M., Bratasz A., Tong L., Rivera B.K., Kalai T., Hideg K., Kuppusamy P.: Safe and targeted anticancer efficacy of a novel class of antioxidant-conjugated difluorodiarlyldenyl piperidones: differential cytotoxicity in healthy and cancer cells. *Free Radic. Biol. Med.*, 2010; 48: 1228-1235
- [46] Sen' V.D., Terentiev A.A., Konovalova N.P.: Platinum complexes with bioactive nitroxyl radicals: synthesis and antitumor properties. W: Nitroxides – theory, experiment and applications, red.: Kokorin A. *Intech*, 2012, 385-406
- [47] Skolimowski J., Metodiewa D., Kochman A., Gwoździński K.: Novel complex rutoxyl as antioxidant and radioprotector: a comparison with rutin action. *J. Biochem. Mol. Biol. Biophys.*, 1999; 3: 87-97
- [48] Szatrowski T.P., Nathan C.F.: Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer Res.*, 1991; 51: 794-798
- [49] Tomizawa A., Hadjidekov G., Ishii I., Bakalova R., Zhelev Z., Aoki I., Saga T., Kitada M.: Nitroxide derivatives for imaging of hypercholesterolemia-induced kidney dysfunction and assessing the effectiveness of antilipidemic drugs. *Mol. Pharm.*, 2011; 8: 1962-1969
- [50] Venditti E., Bruge F., Astolfi P., Kochevar I., Damiani E.: Nitroxides and a nitroxide-based UV filter have the potential to photoprotect UVA-irradiated human skin fibroblasts against oxidative damage. *J. Dermatol. Sci.*, 2011; 63: 55-61
- [51] Venditti E., Scire A., Tanfani F., Greci L., Damiani E.: Nitroxides are more efficient inhibitors of oxidative damage to calf skin collagen than antioxidant vitamins. *Biochim. Biophys. Acta.*, 2008; 1780: 58-68
- [52] Vitolo J.M., Cotrim A.P., Sowers A.L., Russo A., Wellner R.B., Pillemer S.R., Mitchell J.B., Baum B.J.: The stable nitroxide tempol facilitates salivary gland protection during head and neck irradiation in mouse model. *Clin. Cancer Res.*, 2004; 10: 1807-1812
- [53] Warburg O.: The metabolism of tumors. Arnold Constable, London. 1930; 254-270
- [54] Warburg O.: On the origin of cancer cells. *Science*, 1956; 123: 309-314
- [55] Warburg O.P., Posener K., Negelein E.: Über den Stoffwechsel der Tumoren. *Biochem. Z.*, 1924; 152: 319-344
- [56] Wu Y.J., Li W.G., Zhang Z.M., Tian X.: Antioxidative activity of 4-oxy- and 4-hydroxy-nitroxides in tissues and erythrocytes from rats. *Zhongguo Yao Li Xue Bao*, 1997; 18: 150-154
- [57] Yan S.X., Hong X.Y., Hu Y., Liao K.H.: Tempol, one of nitroxides,



is a novel ultraviolet-A1 radiation protector for human dermal fibroblasts. *J. Dermatol. Sci.*, 2005; 37: 137-143

[58] Yoshino F., Shoji H., Lee M.C.: Vascular effects of singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) generated by photo-excitation on adrenergic neurotransmission in isolated rabbit mesenteric vein. *Redox Rep.*, 2002; 7: 266-270

[59] Zhelev Z., Aoki I., Gadjeva V., Nikolova B., Bakalova R., Saga T.: Tissue redox activity as a sensing platform for imaging of cancer based on nitroxide redox cycle. *Eur. J. Cancer*, 2013; 49: 1467-1478

[60] Zhelev Z., Bakalova R., Aoki I., Lazarova D., Saga T.: Imaging of superoxide generation in the dopaminergic area of the brain

in Parkinson's disease, using mito-TEMPO. *ACS Chem. Neurosci.*, 2013; 4: 1439-1445

[61] Zhelev Z., Gadjeva V., Aoki I., Bakalova R., Saga T.: Cell-penetrating nitroxides as molecular sensors for imaging of cancer in vivo, based on tissue redox activity. *Mol. Biosyst.*, 2012; 8: 2733-2740

[62] Zienolddiny S., Ryberg D., Haugen A.: Induction of microsatellite mutations by oxidative agents in human lung cancer cell lines. *Carcinogenesis*, 2000; 21: 1521-1526

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.