

WYKORZYSTANIE NITROKSYDÓW JAKO LEKÓW ORAZ PRZECIWUTLENIACZY W STRESIE OKSYDACYJNYM INDUKOWANYM PRZEZ CHEMIOTERAPEUTYKI STOSOWANE W TERAPII NOWOTWORÓW

APPLICATION OF NITROXIDES AS AN ANTICANCER DRUGS AND
ANTIOXIDANTS AGAINST DRUG-INDUCED OXIDATIVE STRESS IN
CANCER THERAPY

Marcin LEWANDOWSKI, Krzysztof GWOŹDZIŃSKI

Katedra Biofizyki Molekularnej Uniwersytetu Łódzkiego

Streszczenie: Nitroksydy (rodniki nitroksylowe) należą do stabilnych rodników organicznych o małej masie cząsteczkowej, posiadających grupę nitroksylową (>N-O). W niniejszej pracy omówiono zastosowania nitroksydów w biologii i medycynie, które pojawiły się w ostatnich latach. Dotyczą one wykorzystania nitroksydów jako potencjalnych leków oraz jako przeciwutleniaczy w generowanym przez leki przeciwnowotworowe stresie oksydacyjnym. Mechanizm ich działania związany jest cyklem redoks, co odróżnia nitroksydy od innych wolnych rodników, kojarzonych zwykle z wysoką reaktywnością i szkodliwym działaniem. Nitroksydy są również znane jako mimetyki SOD, inhibitory reakcji Fentona i Habera-Weissa oraz związkami zapobiegającymi peroksydacji makrocząsteczek. Istotną cechą odróżniającą je od innych antyoksydantów jest katalityczny mechanizm działania, opierający się na jednoelektronowych reakcjach utleniania i redukcji. Wydają się one posiadać wysoką wartość terapeutyczną i diagnostyczną, będąc jednocześnie stosunkowo nieszkodliwymi w stosunku do komórek prawidłowych.

Słowa kluczowe: nitroksydy, stres oksydacyjny, właściwości przeciwutleniające, nowotwory

Summary: Nitroxides (nitroxyl radicals) are a group of low molecular weight organic stable radicals, which have a characteristic nitroxyl group (>N-O). The aim of this paper is to discuss the other potential applications of nitroxides in biology and medicine which have emerged in recent years. They concern the use of nitroxides as potential drugs, and as antioxidants against oxidative stress generated by anticancer drugs. Their mechanism of action is connected with their redox cycle which distinguishes nitroxides from other free radicals, which are commonly associated with high reactivity and harmful effects. Nitroxides are also known as SOD mimetic, inhibitors of Fenton and

Haber–Weiss reactions and also protectants against peroxidation of macromolecules. They appear to have significant therapeutic and diagnostic value, while being relatively harmless to normal cells.

Key-words: nitroxide, oxidative stress, antioxidant properties, cancer

Wykaz stosowanych skrótów: **CAT** – katalaza; **EPR** – elektronowy rezonans paramagnetyczny; **MMP-1** – metaloproteinazy matriks-1; **NF-κB** – czynnik jądrowy κB; **SOD** – dysmutazy ponadtlenkowe (manganowa: MnSOD oraz cynkowo-miedziowa: CuZnSOD); **RFT** – reaktywne formy tlenu; **PARP** – polimeraza poli(ADP-rybozy); **RET** – gen kodujący receptorową kinazę tyrozynową; **STAT 3** – przekaźnik sygnału i aktywator transkrypcji 3

WSTĘP

Nitroksydy są grupą syntetycznych rodników organicznych, posiadających niesparowany elektron zlokalizowany w grupie nitroksylowej $>N^{\cdot}O$ [50]. Charakteryzują się małą masą cząsteczkową, są nieszkodliwe dla komórek ssaków oraz swobodnie dyfundują przez błony komórkowe, choć oczywiście możliwe są wyjątki od tych reguł [18]. Głównym mechanizmem aktywności biologicznej nitroksydów jest regulacja poziomu stresu oksydacyjnego. Jest ona osiągnana np. poprzez zmiatanie wolnych rodników, bezpośrednie oddziaływanie z nimi oraz zapobieganie redukcji nadtlenu wodoru do rodnika hydroksylowego w reakcji Fentona i Habera-Weissa przez utlenianie jonów Fe(II) do Fe(III) [7]. Nitroksydy są też mimetykami dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), przerywają wolnorodnikowe łańcuchy reakcji, np. peroksydację lipidów. Jako rodniki uczestniczą w reakcji rekombinacji typu rodnik-rodnik oraz biorą udział w reakcjach przenoszenia elektronów, czym przejawiają swoje właściwości przeciwutleniające [51]. Nitroksydy hamują stres oksydacyjny, chociaż w pewnych warunkach mogą prowadzić do jego wzrostu. Dzieje się tak w komórkach nowotworowych oraz w przypadku zastosowania nadmiaru nitroksydu, który może wpływać na metabolizm żelaza zwiększając jego pulę dostępną do reakcji Fentona i Habera-Weissa, nasilając wytwarzanie reaktywnych form tlenu (RFT) [17, 18, 21]. Cechą odróżniającą nitroksydy od innych przeciwutleniaczy jest katalityczny mechanizm działania związany z jednoelektronowym cyklem redoks. W wyniku utleniania nitroksydu powstaje jon oksoamoniowy, z kolei redukcja prowadzi do hydroksyloaminy [22]. Jednak, w odpowiednich warunkach dochodzi do odtworzenia nitroksydu i w sposób ciągły może on pełnić swoją rolę przeciwutleniającą. Kolejnymi właściwościami odróżniającymi nitroksydy od innych przeciwutleniaczy jest łatwa dyfuzja przez błony (wiele przeciwutleniaczy nie przenika przez błony biologiczne), aktywność w stosunku do rodników, modulowanie poziomu tlenu azotu oraz możliwość zmiatania wolnych rodników wewnątrzkomórkowych [33].

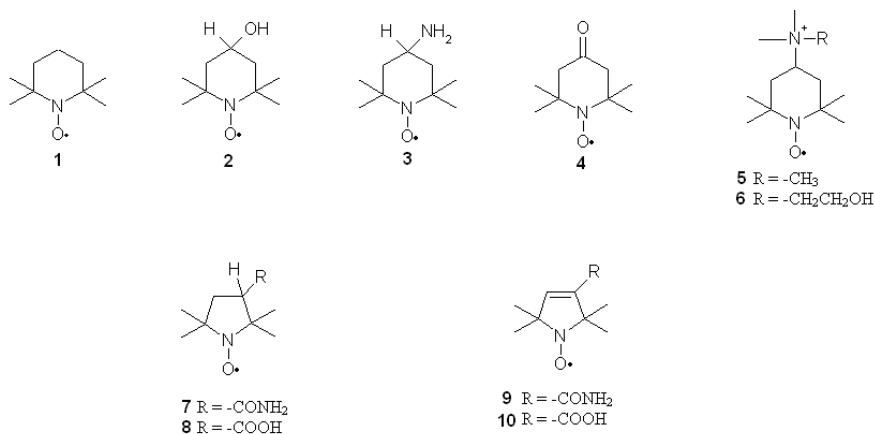
W praktyce, nitroksydy są stosowane głównie w technice elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR) jako znaczniki spinowe, jednakże w przyszłości

ich zastosowanie może mieć znacznie szerszy charakter [18]. Właśnie temu zagadnieniu postanowiono poświęcić niniejszą pracę, bowiem właściwości chemiczne oraz fizyczne, metabolizm i szczegółowy mechanizm działania nitroksydów, zostały dokładnie opisane w innych opracowaniach [47, 50, 52, 53]. Ze względu na brak prac przeglądowych opisujących zastosowania nitroksydów, postanowiono skupić się na przedstawieniu badań, które mogą w przyszłości przełożyć się na ich zastosowanie w praktyce. Chodzi mianowicie o wykorzystanie tych związków jako leków w terapii nowotworów oraz jako przeciwutleniaczy niwelujących stres oksydacyjny indukowany przez leki stosowane w standardowej chemioterapii.

WŁAŚCIWOŚCI NITROKSYDÓW

Nitroksydy są grupą stabilnych rodników organicznych: alifatycznych, aromatycznych, bicyklicznych oraz heterocyklicznych posiadających grupę nitroksylową $>N-O$ z niesparowanym elektronem. Do najczęściej stosowanych w biologii i medycynie można zaliczyć nitroksydy heterocykliczne, pochodne piperydyny, piroliny i pirolidyny. Trwałość nitroksydów związana jest z brakiem atomów wodoru przy alfa atomach węgla (sąsiadujących z grupą $>N-O$), dotyczy to wszystkich grup związków heterocyklicznych przedstawionych poniżej. Większość wyżej wymienionych pochodnych heterocyklicznych jest rozpuszczalna w wodzie, co ułatwia ich stosowanie. Ponadto, nitroksydy pozbawione ładunku elektrycznego łatwo przenikają przez błony biologiczne. Należy również dodać, że są one nietoksyczne i nieimmunogenne.

Na ryc. 1 przedstawiono struktury najczęściej stosowanych nitroksydów:

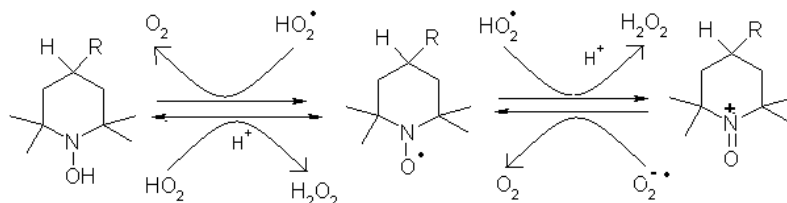


RYCINA 1. Przykłady nitroksydów piperydynowych: (1) Tempo, (2) Tempol, (3) Tempamina, (4) Tempon, (5) CAT, (6) Tempocholina, (7) Pirolid, (8) karboksypirolid, (9) Pirolin, (10) karboksypirolin
FIGURE 1. Piperidine nitroxide examples: (1) Tempo, (2) Tempol, (3) Tempamine, (4) Tempone, (5) CAT, (6) Tempocholine, (7) Pirolid, (8) carboxypirolid, (9) Pirolin, (10) carboxypirolin

Nitroksydy posiadają właściwości przeciwutleniające, co związane jest z ich cyklem redoks. Ulegają stosunkowo łatwo jednoelektronowej redukcji do odpowiednich hydroksyloamin oraz jednoelektronowemu utlenieniu do soli oksoamoniowych [30]. Hydroksyloaminy mogą ulegać dwuelektronowemu utlenieniu, które prowadzi do soli oksoamoniowych. Możliwa jest również reakcja w kierunku przeciwnym, czyli dwuelektronowa redukcja. Nitroksydy metabolizują anionorodniki lub ich protonowane formy (rodniki nadtlenkowe) do nadtlenu wodoru i tlenu, wykazując działanie dysmutazowe (mimetyki SOD) (ryc. 2) [5, 30, 31, 39, 40, 41].

Stała szybkości zmiatania rodnika wodoronadtlenkowego (protonowana forma anionorodnika ponadtlenkowego) przez nitroksyd wynosi ok. $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Natomiast stała szybkości zmiatania przez powstałą sól oksoamoniową jest znacznie wyższa ($>10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), a więc, zbliżona do wartości charakterystycznych dla dysmutaz ponadtlenkowych (cynkowo, miedziowej CuZnSOD i manganowej MnSOD). Redukcja nitroksydów przez anionorodnik ponadtlenkowy w obecności tioli była obserwowana po raz pierwszy przez Finkelsteina i wsp. [15].

Nitroksydy wykazują także właściwości proutleniające, podobnie jak inne przeciwutleniacze np. flawonoidy i witaminy, bowiem ich cykl redoks ułatwia zarówno utlenianie, jak i redukcję. W komórkach mogą być redukowane do hydroksyloamin głównie przez kwas askorbinowy. Jednak mechanizm redukcji nitroksydów w komórkach jest bardziej złożony, bowiem w reakcji tej uczestniczą tiole. W erytrocytach inkubowanych z nitroksydami obserwuje się również spadek ilości tioli, szczególnie dotyczy to glutationu [2, 20]. Nie bez znaczenia pozostaje wpływ tlenu, w warunkach beztlenowych proces redukcji jest szybszy niż w jego obecności [19]. Nitroksydy pochodne piperydyny pozbawione ładunku są łatwiej redukowane w komórkach niż posiadające ładunek, co jest związane jest m.in. z różną szybkością przenikania ich przez błony biologiczne [25, 26]. Z kolei, nitroksydy piperydynowe redukowane są szybciej w komórkach niż pirolinowe i pirolidynowe, co zostało wykazane na erytrocytach i innych komórkach [9, 24, 25]. Nasze badania wykazały, że nitroksydy nie są metabolizowane w erytrocy-



RYCINA 2. Cykl redoks nitroksydów związany z ich funkcją pseudodysmutazową
FIGURE 2. Redox cycle of nitroxide with superoxides

tach, co zostało potwierdzone przez innych autorów w tkankach [27]. Szybkość redukcji nitroksydów piperydynowych zależy od charakteru podstawnika w pozycji 4 pierścienia heterocyklicznego [19]. Dla przykładu kolejność redukcji nitroksydów piperydynowych przedstawia się następująco: Tempamina>Tempon>Tempol>Tempocholina (ryc. 2). Natomiast dla nitroksydów pirolinowych i pirolidynowych: Pirolid>Pirolin>karboksy-Pirolid>karboksy-Pirolin [24, 25]. Wprowadzenie w miejsce grup metylowych, grup etylowych, powoduje spadek szybkości redukcji nitroksydów przez askorbinian. Nitroksydy wykazują także właściwości pseudokatalazowe w inaktywacji nadtlenu wodoru przez udział kationu oksoamoniowego [29, 32, 38, 54] lub hydroksyloaminy [11]. Jako wolne rodniki uczestniczą w reakcji rekombinacji, z jednej strony inaktywują wolne rodniki inicjujące proces utleniania białek i lipidów np. w reakcji z rodnikiem hydroksylowym. Z drugiej strony hamują oba te procesy, reagując np. z rodnikami lipidowymi i nadtlenkowymi, przerywając reakcję peroksydacji lipidów [16, 36, 43]. Podobną funkcję wykazują również hydroksyloaminy. Jak wspomniano powyżej, kationy oksoamoniowe mogą być redukowane przez kwas askorbinowy do hydroksyloamin. Powstałe w reakcji rodniki askorbylowe są dysmutowane do kwasu askorbinowego i kwasu dehydroaskorbinowego. Reakcja ta katalizowana jest przez nitroksydy [1]. Rodniki askorbylowe mogą być również redukowane do kwasu askorbinowego przez glutation. Nitroksydy hamowały peroksydację lipidów indukowaną przez reakcję Fentona w homogenatach wątroby, serca i nerek szczurów oraz hamowały hemolizę erytrocytów szczurów stymulowaną przez nadtlenek wodoru [34]. Wykazano, że nitroksydy zmiatają reaktywne formy tlenu w następującym porządku: rodniki hydroksylowe > nadtlenek wodoru > anionorodnik ponadtlenkowy. Ponadto inaktywują tlen singletowy, rodniki nadtlenkowe, ditlenek azotu [16, 37, 56] oraz biorą udział w rozkładzie silnego czynnika utleniającego i nitrującego, jakim jest nadtlenoazotyn (ONOO⁻) [3, 8, 13, 14]. Nitroksydy utleniają jony metali przejściowych biorące udział w reakcji typu Fentona i Habera-Weissa zapobiegając w ten sposób uszkodzeniu materiału biologicznego przez rodniki hydroksylowe i inne rodniki tlenopochodne [4, 19, 42, 58]. Redukcja nitroksydów w napromieniowanych erytrocytach była znacznie szybsza niż kontrolnych, dotyczy to pochodnych piperydynowych i pirolidynowych [25, 26].

NITROKSYDY W TERAPII NOWOTWOROWEJ

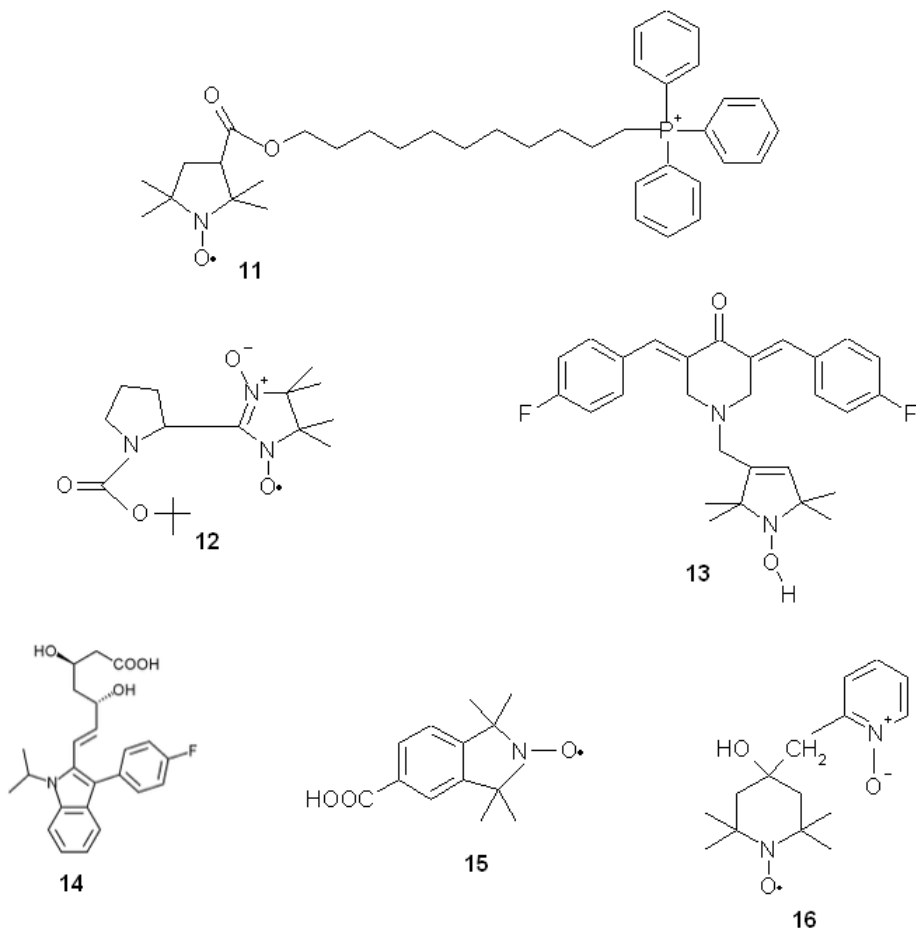
NOWOTWORY PIERSI

Stosowanie chemioterapii wiąże się często z toksycznością leków nie tylko w stosunku do komórek nowotworowych. Dotyczy ona również komórek zdro-

wych, a ma to miejsce np. w terapii raka piersi wykorzystującej fluwastatynę i inne leki (14). Rozwiązaniem problemu toksyczności w stosunku do komórek prawidłowych okazało się być włączenie do terapii nitroksydu. Pochodna estrowa karboksy-Proksylu z kationem trifenylofosfoniowym, Mito-CP₁₁ (11) (ryc. 3) akumuluje się specyficznie w mitochondriach, co związane jest z obecnością grupy obdarzonej ładunkiem, ułatwiającej przenikanie przez błony. Wykazano, iż po 48 godzinach od podania Mito-CP₁₁ żywotność ludzkich komórek inwazyjnego raka sutka MCF-7 spadła do ok. 70% wartości kontrolnej. Co istotne, żywotność prawidłowych komórek nabłonkowych gruczołu sutkowego MCF10A została zredukowana do 95%, nie odbiegając znacznie od kontroli. W przypadku stosowania kombinacji Mito-CP₁₁ z fluwastatyną obserwowano efekt synergistyczny działania. Przy jednoczesnym stosowaniu obu związków doszło do 80% hamowania tworzenia kolonii przez komórki nowotworowe, podczas gdy leki te stosowane oddzielnie doprowadziły jedynie do około 25% inhibicji. Podobne wyniki uzyskano na linii komórkowej MDA-MB-231 (komórki inwazyjnego raka piersi wywodzącego się z komórek przewodów gruczołów piersiowych). Przeprowadzone testy (ocena tworzenia kolonii, test MTT, pobieranie [³H]-tymidyny) pozwoliły stwierdzić że Mito-CP₁₁ wzmacnia cytotoksyczność fluwastatyn w stosunku do komórek raka piersi, wykazując jednocześnie niską toksyczność w stosunku do komórek prawidłowych. Różnice te, jak się okazało, wynikały ze specyficznej inhibicji, odpowiedzialnego za przeżywalność i proliferację komórek nowotworowych, czynnika jądrowego κB (NF-κB), do której dochodziło jedynie w komórkach MCF-7. Odmierna toksyczność nie wynikała z różnic związanych z poborem Mito-CP₁₁, który w obu typach komórek był akumulowany w tym samym stopniu [6].

Zastosowanie nitroksydów w terapii raka piersi nie ogranicza się jedynie do użycia ich jako cytostatyków, mogą one również łagodzić efekty uboczne wywołane innymi lekami. Chodzi tu o powszechnie stosowaną i skuteczną terapię z wykorzystaniem doksorubicyny i taksanów, która również prowadzi do rozwoju kardio-, hepato- neuro- i nefrotoksyczności. Uszkodzenia tych organów spowodowane są stresem oksydacyjnym i wiążą się z koniecznością zmniejszenia dawek podawanych leków, co niestety, przekłada się na niższą skuteczność terapii. Pewnym rozwiązaniem problemu może być podanie wraz z lekami nitroksydu, który przejawia swoją aktywność dzięki właściwościom przeciwutleniającym i możliwości utleniania jonów Fe(II) w tkankach „nie celowanych”. Wykazano, że Pirolin miał wpływ ochronny na osocze szczurów z indukowanym nowotworem sutka, którym podawano kombinację doksorubicyny z docetakselem (9). Podanie nitroksydu zmniejszyło poziom grup karbonylowych, wskaźnika oksydacyjnego uszkodzenia białek osocza i nie miało wpływu na poziom grup tiolowych. Natomiast w przypadku peroksydacji lipidów, nitroksyd wykazywał działanie zarówno pro-, jak i przeciwutleniające, prowadząc do równoczesnego wzrostu poziomu

wodoronadtlenków i spadku poziomu substancji reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS). Wyniki te mogą świadczyć o hamowaniu fragmentacji wodoronadtlenków poprzez utlenianie jonów Fe (II), katalizujących proces reinicjacji rozpadu tych związków. Należy jednak zaznaczyć, że toksyczność dokсорубicyny i docetakselu wiąże się głównie z uszkodzeniem mięśnia sercowego, wątroby i nerek, więc ochronne działanie Pirolinu w tych narządach może być inne (silniejsze) niż w osoczu [49].



RYCINA 3. Nitroksydy oraz pochodne diamagnetyczne stosowane w terapii nowotworowej. (11) Mito-Cp₁₁, (12) L-NNP, (13) HO 3867, (14) fluwastatyna, (15) CTMIO, (16) Tempicol-3

FIGURE 3. Nitroxides and diamagnetic derivatives used in cancer therapy. (11) Mito-CP11, (12) L-NNP (13) HO 3867, (14), fluvastatin (15) CTMIO (16) Tempicol-3

NOWOTWORY WĄTROBY

Opisany w poprzednim podrozdziale Mito-CP₁₁ okazał się być również skuteczny w terapii raka wątroby, co wykazały badania przeprowadzone na komórkach raka wątrobowokomórkowego linii HepG2. Licząc na efekt synergii oraz wykorzystując fakt, iż komórki nowotworowe charakteryzują się nasileniem procesu glikolizy, zastosowano dodatkowo 2-deoksyglukozę (2-DG) jako związek przerywający ten szlak. Wyniki testu MTT wykazały, iż stosowanie samego Mito-CP₁₁ lub 2-DG nie miały większego wpływu na żywotność komórek zarówno nowotworowych, jak i prawidłowych. Jednak kombinacja 2 μM Mito-CP₁₁ i 1 mM 2-DG prowadziła do 50% spadku żywotności komórek linii HepG2, wpływając w niewielkim stopniu na hepatocyty prawidłowe. Sześciogodzinne stosowanie tej dawki leków zaburzało procesy produkcji energii w komórkach zmutowanych prowadząc do 60% spadku poziomu adenozyno-5'-trifosforanu (ATP), podczas gdy, w komórkach prawidłowych rejestrowano niewielkie zmiany. Dodatkowo, potwierdzono też cytotoksyczne działanie tych związków na komórki nowotworowe przy użyciu barwnika kwasów nukleinowych, YOYO-1. Dodatkowo, obserwowano także indukcję apoptozy przez badanie aktywności kaspaz 3/7 oraz białek pro- i antyapoptotycznych. Uzyskane rezultaty wykazały synergistyczne działanie Mito-CP₁₁ i 2-DG, gdyż wszystkie obserwowane zmiany uległy nasileniu w wyniku połączonego ich działania [12].

Skuteczności nitroksydów w stosunku do komórek raka wątroby linii HepG2 dowiodły również inne doświadczenia, w którym badano działanie związku L-NNP (12). Wyniki testu MTT wykazały, iż działa on selektywnie w stosunku do komórek raka wątroby, będąc jednocześnie bezpiecznym dla komórek prawidłowych wątroby (IC₅₀ wynosiło odpowiednio 5,6 oraz 169,6 μg/ml L-NNP). Inkubacja komórek nowotworowych z tym nitroksydem prowadziła do wzrostu cytotoksyczności, wzrostu poziomu (RFT) i peroksydacji lipidów, przy jednoczesnym obniżeniu potencjału mitochondrialnego i stężenia zredukowanego glutationu. Podobne, choć znacznie mniejsze zmiany obserwowane były w komórkach prawidłowych. Metodą Western blot wykazano, iż wraz ze wzrostem stężenia nitroksydu, dochodziło do wzrostu ekspresji proapoptotycznego białka Bax oraz spadku ekspresji antyapoptotycznego Bcl-2, co wskazuje na zdolność tego związku do indukcji apoptozy w komórkach nowotworowych wątroby. Co istotne, powyższe wyniki zostały potwierdzone w badaniach przeprowadzonych na myszach (*in vivo*). Osobniki z nowotworem wątroby, którym podawano wysokie i średnie dawki L-NNP (40 oraz 20 mg/kg masy ciała przez 7 dni) żyły dłużej, posiadały wyższą masę ciała oraz mniejsze objętościowo guzy niż myszy kontrolne (kontrola negatywna) oraz te, którym podawano 5-fluorouracyl (kontrola pozytywna). Dodatkowo, wyższa dawka nitroksydu powodowała aż 126-krotny wzrost poziomu RFT w obrębie nowotworu. Wysoka skuteczność L-NNP związana była ze indukcją stresu oksydacyjnego, któremu nie były w stanie przeciwdziałać ze względu na niską aktywność enzymów przeciwutleniających (dysmutaza ponadtlen-

kowa, katalaza), w przeciwieństwie do komórek prawidłowych. Badania te wykazały, że nitroksyd ten działał proapoptotycznie oraz indukował stres oksydacyjny w sposób selektywny jedynie w komórkach nowotworowych [23].

NOWOTWORY PŁUC

Wykazano, że linia komórkowa raka płuc 95-D była wrażliwa na terapię nitroksydem FC-Tempo. Test MTT wykazał ponad 50% spadek żywotności komórek, wyższy niż w przypadku zastosowania Tempolu. Potwierdzeniem tych wyników był 3-krotny (w porównaniu do kontroli) wzrost uwolnionej do przestrzeni pozakomórkowej dehydrogenazy mleczanowej (LDH), po zastosowaniu FC-Tempo. Ponadto, w komórkach 95-D obserwowano 2-krotny wzrost nasilenia apoptozy i aktywności kaspazy-3. Wykazano też znaczny wzrost liczby komórek w fazie G1 przy równoczesnej ich redukcji w fazach S i G2. Dodatkowo, odnotowano nasiloną aktywność CAT i SOD, która świadczy o wpływie nitroksydu na zaburzenie równowagi redoks komórek nowotworu. Aktywność cytotoksyczna FC-Tempo związana jest z obecnością w pozycji 4 grupy ferrocenokarboksylowej, która może oddziaływać z DNA nowotworu lub/i indukować genotoksyczność w wyniku zaburzenia stanu redoks komórki [55].

NOWOTWORY TARCZYCY

Udowodniono, że Mito-CP₁₁ może być również skutecznie stosowany w terapii nowotworu tarczycy. Badania przeprowadzone na komórkach raka rdzeniastego tarczycy linii TT oraz MZ-CRC-1 dowiodły, iż są one wrażliwe na działanie tego nitroksydu. Mito-CP₁₁ okazał się skuteczny już w bardzo niskich stężeniach (IC₅₀ wynoszące odpowiednio 0,38 i 0,89 μM w obu liniach). Charakterystyczny był również wzrost udziału komórek w fazie G1 połączony z ich spadkiem w fazach S i G2/M. Skuteczność nitroksydu została porównana ze stosowanym w terapii raka rdzeniastego tarczycy, vandetanibem. Oba związki równie skutecznie redukowały żywotność komórek, jednak metodą Western blot wykazano, iż jedynie nitroksyd wpływał na spadek ekspresji genu RET odpowiedzialnego za ten typ nowotworu oraz indukował fragmentację białka PARP, a więc apoptozę zależną od kaspaz. Dowodzi to, iż mechanizm oddziaływania Mito-CP₁₁ z komórkami nowotworowymi jest inny niż vandetanibu. Powyższe wyniki znalazły potwierdzenie w badaniach przeprowadzonym na myszach, u których indukowano raka rdzeniastego tarczycy. Dodatkowo wykazano, że nitroksyd redukował masę nowotworu oraz przyczyniał się do ograniczenia utraty masy ciała skuteczniej niż vandetanib. Ponadto, Mito-CP₁₁ okazał się, być bardziej efektywny oraz mniej toksyczny dla komórek prawidłowych niż leki powszechnie stosowane w terapii nowotworowej [48].

NOWOTWORY JAJNIKA

W kolejnych doświadczeniach badano wpływ nowej grupy związków – 3,5-dia-rylidenylo piperydonów (DAPs) na komórki raka jajnika. Z tej grupy najbardziej skutecznym okazał się piperydon posiadający w pozycji 1 podstawnik N-hydroksypirolidynowy (HO-3867) (13). W dawce $10\mu\text{M}$ prowadził do ok. 80% spadku żywotności komórek raka jajnika linii A2780, oraz w niewielkim stopniu wpływał na komórki zdrowe prowadząc do śmierci zaledwie kilkunastu procent populacji. W wyniku zastosowania tej hydroksyloaminy obserwowano wzrost poziomu stresu oksydacyjnego w komórkach raka jajnika oraz spadek stopnia fosforylacji czynnika transkrypcyjnego STAT3 przy równoczesnym wzroście aktywności kaspazy-3. Takiego wpływu nie obserwowano w przypadku komórek prawidłowych. Wskazuje to na możliwy mechanizm cytotoksyczności HO-3867, który związany jest z aktywacją apoptozy i hamowaniu aktywności STAT3 w komórkach nowotworowych. W przypadku komórek prawidłowych związek ten nie wykazywał znacznej cytotoksyczności, pełniąc jednocześnie funkcję przeciwutleniającą [45].

NOWOTWORY UKŁADU LIMFITYCZNEGO

Badania wpływu Tempolu na komórki ostrej białaczki szpikowej promielocytowej linii HL-60 wykazały, że wartość parametru IC_{50} w komórkach nowotworowych była trzykrotnie niższa niż w komórkach prawidłowych szpiku Detroit 6. Różnica w toksyczności mogła wynikać z różnego mechanizmu działania Tempolu, który w komórkach zdrowych mógł funkcjonować jako przeciwutleniacz, a w nowotworowych jako proutleniacz. Istotnie, w linii HL-60 doprowadził on do nasilenia stresu oksydacyjnego, a następnie aktywacji odpowiedzialnego za apoptozę białka $\text{p21}^{\text{WAF1/CIP1}}$. Dodatkowo, obserwowano również zatrzymanie cyklu komórkowego, wzrostu udziału komórek w fazie G1 oraz spadku ich ilości w fazie G2/M i S. Wywołanie stresu oksydacyjnego w komórkach nowotworowych było więc, prawdopodobną przyczyną cytotoksyczności Tempolu. Badania te dowiodły również, iż apoptoza indukowana stresem oksydacyjnym przez nitroksyd nie wymagała udziału białka p53, którego ekspresja nie zachodzi w komórkach linii HL-60 ani białek Bax i Bcl-2, których poziom również nie uległ znacznej zmianie. Uważa się, że białko $\text{p21}^{\text{WAF1/CIP1}}$ indukowało niezależny od p53 szlak apoptozy [18]. W innej pracy tego zespołu, obserwowano znaczne obniżenie poziom zarówno komórkowego, jak i mitochondrialnego GSH w linii HL-60 po zastosowaniu Tempolu. Wykazano również, iż nitroksyd ten akumulował się w mitochondriach, obniżał potencjał mitochondrialny, konsumpcję tlenu oraz produkcję ATP. Doprowadzał też do spadku aktywności kompleksu I, II i IV łańcucha oddechowego. W podsumowaniu, zaproponowano dwa mechanizmy działania Tempolu, bezpośrednie oddziaływanie związane z uszkodzeniem białek

łańcucha oddechowego prowadzące do „wycieku elektronów” i tworzenia RFT oraz szybkie wykorzystanie puli GSH, w konsekwencji indukujące stres oksydacyjny i prowadzące do apoptozy [35].

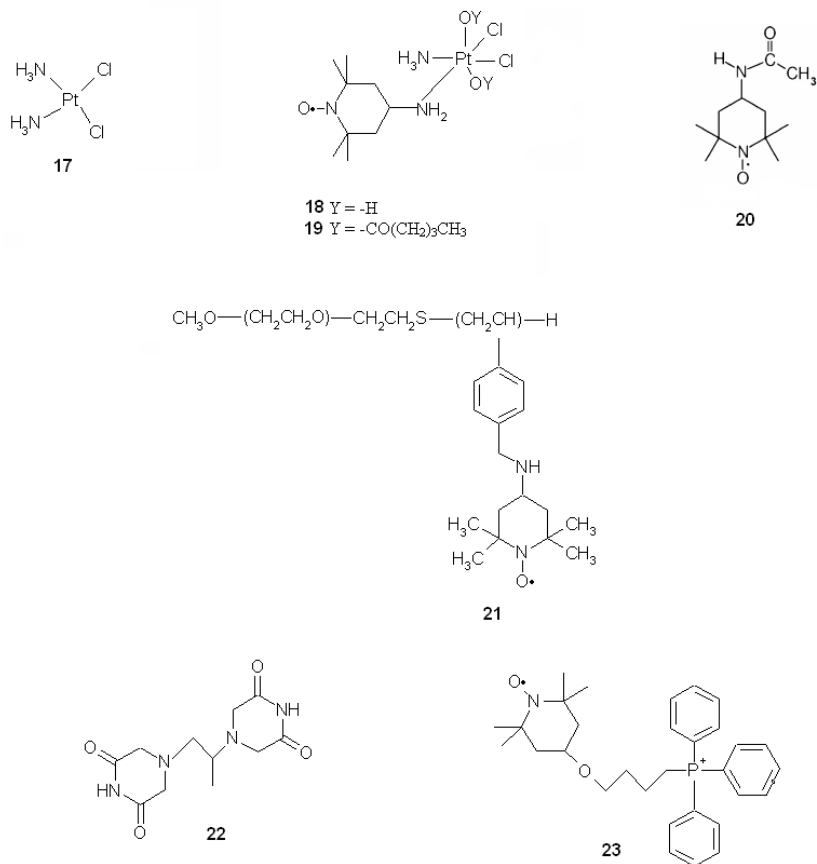
Nitroksydy mogą działać również chemoprewencyjnie, co zostało udowodnione w niżej przedstawionych badaniach. Określono wpływ Tempolu na żywotność i rozwój nowotworów u myszy $Atm^{-/-}$, będących szczególnie podatnymi na rozwój chłoniaków (spowodowany prawdopodobnie przez RFT). Ten typ gryzoni charakteryzuje się wysokim poziomem stresu oksydacyjnego w komórkach, zmianami neurodegeneracyjnymi, dużą podatnością na choroby nowotworowe oraz stosunkowo wczesnym ich początkiem. Myszy $Atm^{-/-}$ nie otrzymujące Tempolu przeżywały zaledwie 30 tygodni, podczas gdy, osobniki otrzymujące nitroksyd w dawce 10 mg/g pożywienia żyły 2-krotnie dłużej (średni czas życia myszy dzikich ok. 1,5 roku). Zgodnie z przewidywaniami, nitroksyd obniżał poziom stresu oksydacyjnego w tymocytach myszy zarówno typu dzikiego, jaki i $Atm^{-/-}$, u których podstawowy poziom uwalnianych RFT był dużo wyższy niż u dzikich. U osobników $Atm^{-/-}$ Tempol wykazywał działanie ochronne przed spadkiem potencjału mitochondrialnego oraz obniżał ekspresję hemo-oksygenazy-1 markera stresu oksydacyjnego. Stwierdzono, iż chemoprewencyjne działanie tego nitroksydu opiera się na jego aktywności przeciwutleniającej. Jednocześnie zauważono, że podawanie Tempolu prowadziło do spadku masy ciała myszy $Atm^{-/-}$, pozostając bez wpływu na myszy dzikie. Ponadto, wpływał on również na obniżenie rozmiarów grasicy, a także wolniejszą proliferację splenocytów *in vitro*. Wyniki te sugerują, że nitroksyd wpływa na szlaki sygnałowe związane z proliferacją komórek [44]. W innych doświadczeniach przeprowadzonych na myszach $Atm^{-/-}$ stosując nitroksyd CTMIO (15) wykazano jeszcze silniejszą chemoprewencję, której efektem był znacznie dłuższy czas życia tych zwierząt [22].

MIĘSAK YOSHIDA

Kolejnym nitroksydem mogącym mieć zastosowanie w terapii nowotworowej jest Tempikol-3 (16). Okazał się on być skutecznym związkiem cytotoksycznym, zarówno *in vivo* (u szczurów z mięsakiem Yoshida), jak i *in vitro* (w mysich liniach komórkowych o fenotypie neoplastycznym). Ponadto, charakteryzował się niską toksycznością w stosunku do komórek prawidłowych. Dodatkowo pełnił funkcję supresora tumorogenezy oraz induktora apoptozy [28].

NITROKSYDY, A TOKSYCZNOŚĆ CISPLATYNY

Cisplatyna (17) (ryc.4) należy do najpowszechniej używanych leków w terapii nowotworowej.



RYCINA 4. Nitroksydy stosowane w ochronie materiału biologicznego przed działaniem cisplatyny i doxorubicyny. (17) Cisplatyna, (18) Nx-Pt I, (19) Nx-Pt II, (20) Tempace, (21) PEG-b-PMNT, (22) deksrazoksan, (23) Mito-T(4)

FIGURE 4. Nitroxides used in protection of biological material against cisplatin and doxorubicin. (17) Cisplatin, (18) Nx-Pt I, (19) Nx-Pt II, (20) Tempace, (21) PEG-b-PMNT (22) dexrazoxane, (23) Mito-T (4)

Stosowana jest od kilkudziesięciu lat, a obecnie pracuje się nad jej nowymi pochodnymi, które miałyby ograniczone niekorzystne skutki stosowania tego leku, takie jak, wysoka toksyczność w stosunku do zdrowych komórek oraz szybki rozwój oporności na lek przez komórki nowotworowe. Obiecującymi wydają się być kompleksy cisplatyny i nitroksydów, niektóre z nich wykazują wyjątkową cytotoksyczność w stosunku do komórek nowotworowych. Dla przykładu, zastosowanie kompleksu Nx-Pt II (19) wobec komórek raka szyjki macicy linii HeLa i niedrob-

nokomórkowego raka płuca H1299 prowadziło do wzrostu liczby komórek w fazie sub-G1 i S oraz spadku w fazach G1 i G2/M. Co istotne, był on równie skuteczny jak cisplatyna. Obydwa związki indukowały apoptozę, jednak kompleks Nx-Pt II nie prowadził do wzrostu ekspresji białka p53, przeciwnie do cisplatyny. Z kolei badania *in vivo* wykazały iż niektóre kompleksy, np. Nx-Pt I (18), indukowały rozwój oporności nowotworu nawet 2,5-krotnie wolniej niż cisplatyna. Przy zastosowaniu kombinacji obu tych związków (cisplatyna-0,6 mg/kg, Nx-Pt I- 1,4 mg/kg) w leczeniu białaczki obserwowano efekt synergii, w ciągu 60 dni 100% myszy zostało „wyleczonych”. Tymczasem podane pojedynczo, leki nie wykazały żadnego działania (wszystkie zwierzęta zmarły). Wolniejszy rozwój oporności oraz obserwowany synergizm wskazują na inny niż w przypadku cisplatyny mechanizm działania przeciwnowotworowego kompleksów platyny i nitroksydu. Możliwe, iż posiadają one aktywność przeciwutleniającą, która pomaga znosić uboczne efekty terapii przy użyciu cisplatyny, takie jak nefro- czy neurotoksyczność, co w konsekwencji wpływa na wyższą przeżywalność i skuteczność terapii przeciwnowotworowej [46].

NITROKSYDY, A TOKSYCZNOŚĆ DOKSORUBICYNY

Dokсорubicyna (DOX) należy do grupy antybiotyków antracyklinowych, powszechnie stosowanych w leczeniu wielu rodzajów nowotworów, jednak jej działanie toksyczne przejawia się również w stosunku do komórek prawidłowych całego organizmu, a szczególnie serca, wątroby i nerek. Jednym z mechanizmów toksycznego działania tego leku jest redukcja cząsteczki do aktywnego rodnika semichinonowego, który reaguje z cząsteczką DNA lub/i z cząsteczką tlenu tworząc anionorodnik ponadtlenkowy. Ten ostatni, po dysmutacji do nadtlenu wodoru bierze udział w reakcji Fentona i Habera-Weissa. Powstały w jej wyniku rodnik hydroksylowy prowadzi do oksydacyjnego uszkodzenia lipidów, białek i DNA wielu komórek, a szczególnie kardiomiocytów charakteryzujących się niskim potencjałem przeciwutleniającym, co w konsekwencji prowadzi do rozwoju kardiotoxyczności. Uważa się, że stosowanie nitroksydów mogłoby znacznie złagodzić skutki uboczne aktywności DOX chroniąc komórki prawidłowe przed stresem oksydacyjnym oraz nasilać toksyczną aktywność dokсорubicyny w stosunku do nowotworu [9, 10, 57].

W jednym z doświadczeń określano działanie nitroksydów na obniżenie toksyczności indukowanej przez DOX w komórkach prawidłowych. Badano wpływ nitroksydów piperydynowych różniących się podstawnikiem w pozycji 4 pierścienia piperydynowego: niepodstawiony Tempo (1), z grupą hydroksylową – Tempol (2), aminową – Tempamina (3) i acetamidową – Tempace (20). Wcześniejsze badania wykazały, że rodzaj podstawnika ma znaczenie dla jego aktywności biologicznej. Doświadczenie przeprowadzono na unieśmiertnionych fibroblastach chomika

chińskiego (linia B14). Okazało się, iż nitroksydem najskuteczniej łagodzącym działanie DOX był Tempace, który w podobnym stopniu jak Tempo i Tempol zwiększał żywotność komórek poddanych działaniu doksorubicyny. Wyjątkiem była Tempamina, która przy wyższych stężeniach zmniejszała żywotność komórek. Ponadto wykazano, że trzy stosowane nitroksydy chroniły skutecznie lipidy przed procesem peroksydacji, natomiast Tempamina wykazywała działanie proutleniające. Dwa ze stosowanych nitroksydów niwelowały stopień peroksydacji lipidów o ok. połowę, a największą skuteczność charakteryzował się Tempace, który w najwyższych stężeniach obniżał poziom peroksydacji lipidów do wartości niższych niż w komórkach kontrolnych (nie poddanych działaniu doksorubicyny). Badania przy użyciu spektroskopii EPR wykazały, iż bioredukcja nitroksydów w komórkach prawidłowych może mieć znaczenie dla ich ochrony przed toksycznym działaniem leków inicjujących stres oksydacyjny. Okazało się, że Tempace był redukowany najwolniej, będąc jednocześnie najskuteczniejszym przeciwutleniaczem chroniącym przed działaniem DOX. Z kolei, najmniej skuteczna Tempamina była redukowana najszybciej. Potwierdzono również, iż dla aktywności nitroksydu istotny jest rodzaj podstawnika w pozycji 4 pierścienia piperydynowego [9]. Z drugiej strony wykazano właściwości przeciwutleniające hydroksyloamin, choć były one mniej skuteczne niż nitroksydy [59].

W innej pracy poświęconej niwelowaniu skutków terapii z użyciem DOX, badano działanie nanocząsteczki RNP^N, złożonej z kopolimeru glikolu polietylenowego z aminometylostyrenem (PEG-*b*-PMNT) (21) związanego z nitroksydem. Makrocząsteczki polimeru są wrażliwe na zmiany pH, preferencyjnie akumulują się w miejscach, w których toczy się proces zapalny, np. w środowisku nowotworu. Ze względu na warunki hipoksji i nasiloną glikolizę występuje w nim niższe pH niż w otaczających komórkach prawidłowych reszty organizmu (efekt Warburga). W tych warunkach z polimeru uwolniona zostaje cząsteczka Tempo, który działa głównie na komórki nowotworu. Aktywność uwolnionego Tempo miałaby się opierać na obniżaniu poziomu reaktywnych form tlenu, rosnącego znacznie w wyniku działania DOX. Wiadomo, że RFT prowadzą do aktywacji czynnika jądrowego NF- κ B, promującego rozwój nowotworu, progresję, oporność wielolekową oraz opieranie się apoptozie. Dlatego też badacze założyli, iż terapia DOX zwiększając stres oksydacyjny w mikrośrodowisku nowotworu prowadzi do wytworzenia oporności lekowej. Założono, że zmiatacz wolnych rodników Tempo i leki przeciwzapalne mogą zmniejszać stan zapalny oraz poziom stresu oksydacyjnego w guzie, prowadząc do zwiększenia skuteczności terapii. Wykazano, iż RNP^N utrzymywał się dłużej w krwioobiegach myszy i akumulował w nowotworze kilkukrotnie silniej niż Tempol oraz znacznie zmniejszał aktywację czynnika NF- κ B w jądrach komórek raka jelita grubego (linii colon-26). Podawanie RNP^N prowadziło do znacznego spadku poziomu reaktywnych form tlenu oraz czynnika martwicy nowotworów alfa (TNF- α) w porównaniu do kontroli oraz wolnego Tempolu. Zastosowanie po kilku dniach DOX doprowadziło do 6-krotnego zmniejszenia objętości guza, pod-

czas gdy podanie samej DOX zmniejszało objętość 3-krotnie, a kombinacja DOX z Tempolem wykazywała najniższą skuteczność. Badano również wpływ RNP^N na toksyczność DOX względem komórek prawidłowych, a dokładniej na kardiotoksyczność. Określono aktywności fosfokinazy kreatynowej (CPK) i dehydrogenazy mleczanowej (LDH), wskaźników uszkodzenia kardiomiocytów. Wykazano, że podanie DOX prowadziło do kilkukrotnego wzrostu aktywności CPK i LDH w porównaniu do myszy kontrolnych. Wprowadzenie Tempolu do terapii nie przyniosło większych zmian, natomiast podanie RNP^N prowadziło do znaczącego spadku kardiotoksyczności indukowanej przez DOX, zmniejszając poziom RFT oraz stopień peroksydacji lipidów w sercach myszy. Podsumowując, RNP^N zmniejszał poziom cytokin prozapalnych, produkcję RFT oraz kardiotoksyczność, zwiększając jednocześnie aktywność przeciwnowotworową DOX. Był on znacznie bardziej skuteczny od Tempolu, który podawany dożylnie i transportowany w całym ciele nie mógł działać tak precyzyjnie, jak RNP^N, specyficznie uwalniający Tempo w mikrośrodku nowotworu [57].

W kolejnych badaniach poświęconych kardiotoksyczności DOX wykorzystano szczury SHR (spontaneously hypertensive rats), którym wszczepiono komórki raka piersi SST-2. Badany nitroksyd Mito-T(4) [Mito-Tempo] (23), porównywano ze stosowanym w terapii DOX deksrazoksanem (22), chelatorem jonów żelaza, który zapobiega tworzeniu kompleksów DOX-Fe, obniża stres oksydacyjny i w konsekwencji łagodzi skutki działania samej antracykliny. Analiza mitochondrialnych frakcji serc i komórek nowotworowych szczurów wykazała, że Mito-T (4) akumulował w mitochondriach, jednak w większym stopniu w kardiomiocytach niż w komórkach nowotworu. Z drugiej strony, terapia DOX w połączeniu z Mito-T (4) prowadziła do znacznej redukcji masy ciała szczurów w porównaniu do kontroli oraz samej doksorubicyny. Nitroksyd wpływał na niektóre parametry związane z kardiotoksycznością, takie jak, stężenie glukozy w osoczu oraz poziom limfocytów i granulocytów we krwi. Deksrazoksan z kolei, łagodził spadek poziomów: albuminy osocza, transferazy-1 alaninowej, bilirubiny, glukozy i lipidów. W celu określenia wpływu na kardiotoksyczność badano stopień uszkodzenia kardiomiocytów wywołany terapią DOX. Stwierdzono, że uległ on znacznemu zmniejszeniu po zastosowaniu Mito-T (4). Nitroksyd charakteryzował się nieznacznie mniejszą skutecznością niż deksrazoksan. Jednakże, przeprowadzone badania wykazały istotne różnice między mechanizmem działania tych związków, bowiem okazało się, że jedynie nitroksyd zwiększał toksyczność DOX w stosunku do komórek nowotworowych. Oprócz tego stwierdzono, że deksrazoksan i Mito-T (4) hamowały apoptozę i indukowały ochronny szlak autofagii, chroniąc serca szczurów oraz zmniejszając oksydacyjne uszkodzenie DNA spowodowane przez DOX w tym narządzie. Powyższe badania sugerują, że nitroksyd Mito-T (4) mógłby być z powodzeniem stosowany w terapii z doksorubicyną, gdzie będzie zarówno zwiększał skuteczność leku, jak i chronił serce przed jej ubocznymi działaniami [10].

PODSUMOWANIE

W opisanych pracach wykazano skuteczność nitroksydów wobec nowotworów piersi, wątroby, płuc, tarczycy, jajnika i układu limfatycznego. Zastosowanie ich prowadziło do: redukcji żywotności nowotworowych linii komórkowych, uszkodzenia białek łańcucha oddechowego, spowolnienia procesów wytwarzania ATP, obniżenia potencjału mitochondrialnego, indukcji apoptozy (m.in. poprzez regulację poziomu białek pro- i antyapoptotycznych), zatrzymania cyklu komórkowego w fazie G1, zmniejszenie rozmiarów guza oraz nasilonego wytwarzania RFT prowadzącą do stresu oksydacyjnego [6, 12, 23, 35, 55]. Działanie nitroksydów jest precyzyjne i selektywne, gdyż w przypadku komórek prawidłowych wykazują one zupełnie odmienną aktywność. Działają ochronnie i przeciwutleniająco, jedynie nieznacznie zmniejszając żywotność komórek zdrowych. Chronią przed utratą masy ciała, a w pewnych przypadkach skutecznie zapobiegają zapoczątkowaniu choroby nowotworowej oraz wydłużają czas życia zwierząt doświadczalnych [22, 23]. W kilku opisywanych pracach dowiedziono synergistycznego działania nitroksydów z innymi lekami przeciwnowotworowymi, np. Mito-CP₁₁ z fluwastatyną w raku piersi [6] oraz z 2-DG w przypadku raka wątroby [12]. Nitroksyd ten wyróżniał się wysoką skutecznością, będąc również aktywnym w stosunku do raka tarczycy [48]. Jego aktywność związana była z obecnością reszty kationowej soli trimetylofosfoniowej, która dawała mu szczególne powinowactwo w stosunku do mitochondriów. Co istotne, wykazano również że nitroksydy mogą być skuteczniejsze od powszechnie stosowanych leków przeciwnowotworowych, takich jak 5-fluorouracyl [23], czy vandetanib [48]. Interesujące jest również obniżanie stresu oksydacyjnego indukowanego przez doksorubicynę w komórkach prawidłowych. Włączenie nitroksydów do terapii DOX skutkowało obniżeniem jej toksyczności w stosunku do zdrowych komórek chomika chińskiego (linii B14) [9], kardiomiocytów myszy [57] i szczurów SHR [10]. W dwóch ostatnich przypadkach wspomagały one terapię DOX, zwiększając jej toksyczność wobec komórek nowotworowych. Ochronne działanie nitroksydów było związane z obniżeniem stresu oksydacyjnego, a w konsekwencji hamowaniem utleniania białek i lipidów, zmniejszeniem stopnia uszkodzenia komórek serca oraz niedopuszczeniem do indukcji apoptozy w tym narządzie [10,57]. Nitroksydy, jako ligandy w pochodnej cis-platyny wykazywały toksyczność w stosunku do komórek nowotworowych *in vitro*. Z kolei, *in vivo*, gdy kompleksy te podawano wraz z cisplatyną, obserwowano wysoką wartość terapeutyczną oraz znacznie wolniejszy rozwój oporności lekowej przez komórki nowotworowe [46].

Nitroksydy wydają się być bardzo obiecującą grupą związków chemicznych stosowanych w terapii nowotworowej jako chemioterapeutyki i przeciwutleniacze.

PODZIĘKOWANIA

Autorzy dziękują Pani mgr Julicie Rochowiak za wykonanie rysunków

LITERATURA

- [1] BOBKO AA, KIRILYUK IA, GRIGOR'EV IA, ZWEIER JL, KHRAMTSOV VV. Reversible reduction of nitroxides to hydroxylamines: roles for ascorbate and glutathione. *Free Radic. Biol. Med.*, 2007; **42** : 404-412.
- [2] 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.
- [3] CARROLL RT, GALATSIS P, BOROSKY S, KOPEC KK, KUMAR V, ALTHAUS JS, HALL ED. 4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl (tempol) inhibits peroxynitrite-mediated phenol nitration. *Chem. Res. Toxicol.*, 2000; **13** : 294-300.
- [4] CHARLOUX C, PAUL M, LOISANCE D, ASTIER A. Inhibition of hydroxyl radical production by lactobionate, adenine, and tempol. *Free Radic. Biol. Med.*, 1995; **19** : 699-704.
- [5] CHATEAUNEUF J, LUSZTYK J, INGOLD KU. 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.
- [6] CHENG G, LOPEZ M, ZIELONKA J, HAUSER AD, JOSEPH J, MCALLISTER D, ROWE JJ, SUGG SL, WILLIAMS CL, KALYANARAMAN B. Mitochondria-targeted nitroxides exacerbate fluvastatin-mediated cytostatic and cytotoxic effects in breast cancer cells. *Cancer. Biol. Therap.*, 2011; **12**: 707-717.
- [7] CHONPATHOMPIKUNLERT P, HAN J, TOH K, ISODA H, NAGASAKI Y. Tempol protects human neuroblastoma SH-SY5Y cells against β -amyloid-induced cell toxicity. *Eur. J. Pharmacol.*, 2011; **650**: 544-549.
- [8] CUZZOCREA S, MCDONALD MC, MAZZON E, FILIPE HM, CENTORRINO T, LEPORE V, TERRANOVA ML, CICCOLO A, CAPUTI AP, THIEMERMANN C. Beneficial effects of tempol, a membrane-permeable radical scavenger, on the multiple organ failure induced by zymosan in the rat. *Crit. Care Med.*, 2001; **29**: 102-111.
- [9] CZEPAS J, KOCEVA-CHYLA A, GWOŹDZIŃSKI K, JÓZWIAK Z. Different effectiveness of piperidinenitroxides against oxidative stress induced by doxorubicin and hydrogen peroxide. *Cell. Biol. Toxicol.*, 2008; **24**: 101-112.
- [10] DICKEY JS, GONZALEZ Y, ARYAL B, MOG S, NAKAMURA AJ, REDON CE, BAXA U, ROSEN E, CHENG G, ZIELONKA J, PAREKH P, MASON KP, JOSEPH J, KALYANARAMAN B, BONNER W ET AL. Mito-tempol and dexrazoxane exhibit cardioprotective and chemotherapeutic effects through specific protein oxidation and autophagy in a syngenic breast tumor preclinical model. *PLoS ONE*, 2013; **8**.
- [11] DIKALOV S, GRIGOR'EV IA, VOINOV M, BASSENGE 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.
- [12] DILIP A, CHENG G, JOSEPH J, KUNNIMALAIYAAN S, KALYANARAMAN B, KUNNIMALAIYAAN M, GAMBLIN TC. Mitochondria-targeted antioxidant and glycolysis inhibition: synergistic therapy in hepatocellular carcinoma. *Anticancer Drugs*, 2013; **24**: 881-888.
- [13] EL-REMESSY AB, KHALIL IE, MATRAGOON S, ABOU-MOHAMED G, TSAI NJ, ROON P, CALDWELL RB, CALDWELL RW, GREEN K, LIOU GI. Neuroprotective effect of (-) Δ^9 -tetrahydrocannabinol and cannabidiol in N-methyl-D-aspartate-induced retinal neurotoxicity: involvement of peroxynitrite. *Am. J. Pathol.*, 2003; **163**: 1997-2008.
- [14] FERNANDES DC, MEDINAS DB, ALVES MJ, AUGUSTO O. Tempol diverts peroxynitrite/carbon dioxide reactivity toward albumin and cells from protein-tyrosine nitration to protein-cysteine nitrosation. *Free Radic. Biol. Med.*, 2005; **38**: 189-200.

- [15] FINKELSTEIN E, ROSEN GM, RAUCKMAN EJ. Superoxide-dependent reduction of nitroxides by thiols. *Biochim. Biophys. Acta*, 1984; **802**: 90-98.
- [16] GADJEVA V, KUCHUKOVA D, TOLEKOVA A, TANCHEV S. Beneficial effects of spin-labelled nitrosourea on CCNU-induced oxidative stress in rat blood compared with vitamin E. *Pharmazie*, 2005; **60**: 530-532.
- [17] GARIBOLDI MB, 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 MB, 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, 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.
- [21] GORALSKA M, HOLLEY B, MCGAHAN MC. The effects of tempol on ferritin synthesis and Fe metabolism in lens epithelial cells. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.*, 2000; **1497**: 51-60.
- [22] GUEVEN N, LUFF J, PENG C, HOSOKAWA K, BOTTLE SE, LAVIN MF. Dramatic extension of tumor latency and correction of neurobehavioral phenotype in Atm-mutant mice with a nitroxide antioxidant. *Free Radic. Biol. Med.*, 2006; **41**: 992-1000.
- [23] 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.
- [24] GWOŹDZIŃSKI K, BARTOSZ G. Nitroxide reduction in human red blood cells. *Curr. Top. Biophys.*, 1996; **20**: 60-65.
- [25] GWOŹDZIŃSKI K, BARTOSZ G, LEYKO W. Effect of gamma radiation on the transport of spin-labeled compounds across the erythrocyte membrane. *Radiat. Environ. Biophys.*, 1981; **19**: 275-285.
- [26] GWOŹDZIŃSKI K, BARTOSZ G, LEYKO W. Effect of gamma radiation on the transport of electrolyte spin labels across human erythrocyte. *Stud Biophys.*, 1982; **89**: 141-145.
- [27] HYODO F, MATSUMOTO K, MATSUMOTO A, MITCHELL JB, KRISHNA MC. Probing the intracellular redox status of tumors with magnetic resonance imaging and redox-sensitive contrast agents. *Cancer Res.*, 2006; **66**: 9921-9928.
- [28] KOCEVA-CHYLA A, KOCHMAN A, GŁĘBSKA J, GWOŹDZIŃSKI K, JÓŹWIĄK Z, METODIEWA D. Tempicol-3, a novel low toxic piperidine-N-oxide stable radical and antioxidant, acts as apoptosis inducer and cell proliferation modifier of Yoshida sarcoma cells in vivo. *Anticancer Res.*, 2000; **20**: 4611-4618.
- [29] KRISHNA MC, DEGRAFF W, HANKOVSKY O, SAR CP, KALAI T, JEKO J, RUSSO A, MITCHELL JB. Studies of structure-activity relationship of nitroxide free radicals and their precursors as modifiers against oxidative damage. *J. Med. Chem.*, 1998; **41**: 3477-3492.
- [30] KRISHNA MC, GRAHAME DA, SAMUNI A, MITCHELL JB, RUSSO A. Oxoammonium cation intermediate in the nitroxide-catalyzed dismutation of superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992; **89**: 5537-5541.
- [31] KRISHNA MC, RUSSO A, MITCHELL JB, GOLDSTEIN S, DAFNI H, SAMUNI A. Do nitroxide antioxidants act as scavengers of O₂⁻ or as SOD mimics? *J. Biol. Chem.*, 1996; **271**: 26026-26031.
- [32] KRISHNA MC, SAMUNI A, TAIRA J, GOLDSTEIN S, MITCHELL JB, RUSSO A. Stimulation by nitroxides of catalase-like activity of hemeproteins. *J. Biol. Chem.*, 1996; **271**: 26018-26025.
- [33] LEKER RR, TEICHNER A, LAVIE G, SHOHAMI E, LAMENDS DORF I, OVADIA H. The nitroxide antioxidant tempol is cerebroprotective against focal cerebral ischemia in spontaneously hypertensive rats. *Exp. Neurol.*, 2002; **176**: 355-363.
- [34] LI WG, ZHANG XY, WU YJ, GAO MT, ZHENG RL. The relationship between structure and antioxidative activity of piperidine nitroxides. *J. Pharm. Pharmacol.*, 2006; **58**: 941-949.
- [35] MONTI E, SUPINO R, COLLEONI M, COSTA B, RAVIZZA R, GARIBOLDI MB. Nitroxide tempol impairs mitochondrial function and induces apoptosis in HL60 cells. *J. Cell. Biochem.*, 2001; **82**: 271-276.

- [36] NILSSON UA, OLSSON LI, CARLIN G, BYLUND-FELLENUS AC. Inhibition of lipid peroxidation by spin labels: relationships between structure and function. *J. Biol. Chem.*, 1989; **264**: 11131-11135.
- [37] OFFER T, SAMUNI A. Nitroxides inhibit peroxy radical-mediated DNA scission and enzyme inactivation. *Free Radic. Biol. Med.*, 2002; **32**: 872-881.
- [38] SAMUNI AM, DEGRAFF W, KRISHNA MC, MITCHELL JB. Cellular sites of H₂O₂-induced damage and their protection by nitroxides. *Biochim. Biophys. Acta*, 2001; **1525**: 70-76.
- [39] SAMUNI AM, DEGRAFF W, KRISHNA MC, MITCHELL JB. Nitroxides as antioxidants: tempol protects against EO9 cytotoxicity. *Mol. Cell. Biochem.*, 2002; **234/235**: 327-333.
- [40] SAMUNI A, KRISHNA CM, MITCHELL JB, COLLINS CR, RUSSO A. Superoxide reaction with nitroxides. *Free Radic. Res. Commun.*, 1990; **9**: 241-249.
- [41] SAMUNI A, MIN A, KRISHNA CM, MITCHELL JB, RUSSO A. SOD-like activity of 5-membered ring nitroxide spin labels. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1990; **264**: 85-92.
- [42] SAMUNI A, MITCHELL JB, DEGRAFF W, KRISHNA CM, SAMUNI U, RUSSO A. Nitroxide SOD-mimics: mode of action. *Free Radic. Res. Commun.*, 1991; **12-13**: 187-194.
- [43] SCHNACKENBERG CG, WILCOX CS. Two-week administration of tempol attenuates both hypertension and renal excretion of 8-isoprostaglandin F_{2α}. *Hypertension*, 1999; **33**: 424-428.
- [44] SCHUBERT R, ERKER L, BARLOW C, YAKUSHIJI H, LARSON D, RUSSO A, MITCHELL JB, WYNshaw-BORIS A. Cancer chemoprevention by the antioxidant tempol in Atm-deficient mice. *Hum. Mol. Genet.*, 2004; **13**: 1793-1802.
- [45] SELVENDIRAN K, AHMED S, DAYTON A, KUPPUSAMY ML, TAZI M, BRATASZ A, TONG L, RIVERA BK, KALAI T, HIDEK K, KUPPUSAMY P. Safe and targeted anticancer efficacy of a novel class of antioxidant-conjugated difluorodiarylidene piperidones: differential cytotoxicity in healthy and cancer cells. *Free Radic. Biol. Med.*, 2010; **48**: 1228-1235.
- [46] SEN' VD, TERENTIEV AA, KONOVALOVA NP. Platinum complexes with bioactive nitroxyl radicals: synthesis and antitumor properties. [W] Nitroxides-theory, experiment and applications. [red.] Kokorin A., InTech, 2012, 385-406.
- [47] SOULE BP, HYODO F, MATSUMOTO K, SIMONE NL, COOK JA, KRISHNA MC, MITCHELL JB. The chemistry and biology of nitroxide compounds. *Free Radic. Biol. Med.*, 2007; **42**: 1632-1650.
- [48] STARENKI D, PARK J-I. Mitochondria-targeted nitroxide, MITO-CP, suppresses medullary thyroid carcinoma cell survival in vitro and in vivo. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2013; **98**: 1529-1540.
- [49] TABACZAR S, KOCEVA-CHYLA A, CZEPAS J, PIENIAZEK A, PIASECKA-ZELGA J, GWOZDZIŃSKI K. Nitroxide pirolin reduces oxidative stress generated by doxorubicin and docetaxel in blood plasma of rats bearing mammary tumor. *J. Physiol. Pharmacol.*, 2012; **63**: 153-163.
- [50] TABACZAR S, TALAR M, GWOZDZIŃSKI K. Nitroxides as antioxidants – possibilities of their application in chemoprevention and radioprotection. *Postepy Hig. Med. Dosw.*, 2011; **65**: 46-54.
- [51] VENDITHI E, BRUGE F, ASTOLFI P, KOCHVAR 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.
- [52] WILCOX CS. Effects of tempol and redox-cycling nitroxides in models of oxidative stress. *Pharmacol. Ther.*, 2010; **126**: 119-145.
- [53] WILCOX CS, PEARLMAN A. Chemistry and antihypertensive effects of tempol and other nitroxides. *Pharmacol. Rev.*, 2008; **60**: 418-469.
- [54] WU YJ, LI WG, ZHANG ZM, TIAN X. Antioxidative activity of 4-oxy- and 4-hydroxy-nitroxides in tissues and erythrocytes from rats. *Zhongguo Yao Li XueBao*, 1997; **18**: 150-154.
- [55] WU Y, TANG W, LI CL, LIU JW, MIAO LD, HAN J, LAN MB. Cytotoxicity of a newly synthesized nitroxide derivative of 4-ferrocenecarboxyl-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl in high metastatic lung tumor cells. *Pharmazie*, 2006; **61**: 1028-1033.
- [56] YOSHINO F, SHOJI H, LEE MC. Vascular effects of singlet oxygen (1O₂) generated by photo-excitation on adrenergic neurotransmission in isolated rabbit mesenteric vein. *Redox. Rep.*, 2002; **7**: 266-270.

- [57] YOSHITOMI T, OZAKI Y, THANGAVEL S, NAGASAKI Y. Redox nanoparticle therapeutics to cancer – increase in therapeutic effect of doxorubicin, suppressing its adverse effect. *J. Control. Release.*, 2013; **172**: 137-143.
- [58] ZELTCER G, BERENSSTEIN E, SAMUNI A, CHEVION M. Nitroxide radicals prevent metal-aggravated reperfusion injury in isolated rat heart. *Free Radic. Res.*, 1997; **27**: 627-635.
- [59] ZHANG R, PINSON A, SAMUNI A. Both hydroxylamine and nitroxide protects cardiomyocytes from oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.*, 1998; **24**: 66-75.
- [60] 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.

Redaktor prowadzący – Krzysztof Lewandowski

Otrzymano: 29.04.2015

Przyjęto: 20.06.2015

Krzysztof Gwoździński

Katedra Biofizyki Molekularnej Uniwersytetu Łódzkiego

ul. Pomorska 141/13, 90-236 Łódź

tel. 42 6354452

e-mail: kgwozdz@biol.uni.lodz.pl