



Stacjonarne Studia Doktoranckie
Biochemiczno – Biofizyczne

Magdalena Ewa Szejka

Antyoksydanty polifenolowo – polisacharydowe z roślin leczniczych z rodziny *Rosaceae* i *Asteraceae* jako radioprotektory

Polyphenolic-polysaccharide antioxidants from
medical plants of *Rosaceae* and *Asteraceae* family
as radioprotectors

Praca doktorska

wykonana w Katedrze Biochemii Ogólnej
Instytutu Biochemii

Promotor:

- dr hab. Halina Małgorzata Żbikowska
prof. nadzw. UŁ

Promotor pomocniczy:

- dr n.med. Alicja Klaudia Olejnik, PŁ

Spis treści

Wykaz skrótów	5
Część teoretyczna	9
1. Wstęp	10
2. Skutki działania promieniowania jonizującego na komórkę	13
2.1. Oddziaływanie promieniowania jonizującego z białkami	16
2.2. Oddziaływanie promieniowania jonizującego z lipidami	17
2.3. Oddziaływanie promieniowania jonizującego z DNA	20
2.4. Rodzaje śmierci komórki indukowanej promieniowaniem jonizującym	24
3. Związki o działaniu radioochronnym	26
3.1. Radioprotektory	27
3.1.1. Syntetyczne radioprotektory – wybrane przykłady	27
3.1.2. Radioprotektory pochodzenia naturalnego – wybrane przykłady	29
3.1.3. Radioprotektory pochodzenia roślinnego - mechanizmy działania	30
3.1.4. Radioprotektory pochodzenia roślinnego - wybrane przykłady	32
3.2. „Mitygatory”- wybrane przykłady	36
Część doświadczalna	38
4. Cel pracy	39
5. Materiał i metody	40
5.1. Materiał	40
5.1.1. Izolacja i charakterystyka chemiczna preparatów roślinnych	41
5.2. Odczynniki	48
5.3. Aparatura	49
5.4. Metody	50
5.4.1. Izolacja komórek jednojądrzastych krwi obwodowej (PBMC)	50
5.4.1. Przygotowanie osocza	50
5.4.2. Hodowla komórek L929	50
5.4.3. Hodowla komórek K562	51
5.4.4. Przygotowanie roztworów macierzystych PGs i ich aglikonów	51
5.4.5. Inkubacja osocza i komórek z PGs i ich aglikonami, napromienianie	52

5.4.6. Cytotoksyczność PGs i ich aglikonów wobec komórek L929	52
5.4.7. Żywotność PBMC po inkubacji z PGs i ich aglikonami	54
5.4.8. Całkowity potencjał antyoksydacyjny PGs i ich aglikonów	55
5.4.9. Całkowity potencjał antyoksydacyjny osocza po napromienieniu	56
5.4.10. Oznaczanie peroksydacji lipidów osocza	57
5.4.11. Oznaczanie peroksydacji lipidów w PBMC	58
5.4.12. Oznaczanie aktywności transferazy glutationowej	58
5.4.13. Oznaczanie aktywności dysmutazy ponadtlenkowej	59
5.4.14. Oznaczanie grup –SH w osoczu	60
5.4.15. Uszkodzenia DNA w PBMC	61
5.4.16. Uszkodzenia oksydacyjne zasad DNA w PBMC	62
5.4.17. Przeżywalność PBMC i komórek K562 po napromienieniu	64
5.4.18. Wewnątrzkomórkowy poziom ROS w PBMC i K562	64
5.4.19. Oznaczanie poziomu zredukowanego glutationu w PBMC i w komórkach K562	65
5.4.20. Apoptoza w PBMC i w komórkach K562	66
5.4.21. Analiza statystyczna	66
6. Wyniki	68
6.1. Cytotoksyczność oraz zdolność antyoksydacyjna GPs i aglikonów roślinnych	68
6.2. Porównanie wybranych aktywności radioochronnych PGs z ich aglikonami	70
6.2.2. Uszkodzenia DNA w PBMC	71
6.3. Całkowita zdolność antyoksydacyjna PGs	73
6.4. Antyoksydacyjne działanie PGs roślinnych w osoczu	74
6.4.1. Całkowita zdolność antyoksydacyjna osocza po napromienieniu	74
6.4.2. Indukowane promieniowaniem gamma utlenianie grup tiolowych osocza	76
6.5. Ocena radioochronnego działania PGs roślinnych w PBMC	78
6.5.1. Przeżywalność PBMC	78
6.5.2. Peroksydacja lipidów PBMC	79
6.5.3. Aktywność enzymów antyoksydacyjnych	80
6.5.4. Poziom zredukowanego glutationu w PBMC	82
6.5.5. Wewnątrzkomórkowy poziom ROS w PBMC	83

6.5.6. Apoptoza PBMC	83
6.5.7. Uszkodzenia DNA w PBMC.....	84
6.5.8. Uszkodzenia oksydacyjne zasad DNA w PBMC	86
6.6. Po-radiacyjne działanie PGs w PBMC	87
6.6.1. Aktywność enzymów antyoksydacyjnych	87
6.6.2. Uszkodzenia DNA w PBMC.....	88
6.6.3. Uszkodzenia oksydacyjne zasad DNA w PBMC	89
6.7. Ocena radioochronnego działania PGs w komórkach K562	90
6.7.1. Przeżywalność komórek K562	90
6.7.2. Poziom zredukowanego glutationu w komórkach K562.....	91
6.7.3. Wewnątrzkomórkowy poziom ROS w komórkach K562	92
6.7.4. Apoptoza komórek K562	93
7. Dyskusja.....	95
8. Podsumowanie	107
9. Wnioski	107
10. Streszczenie.....	108
11. Summary	110
12. Bibliografia	112
13. Dorobek naukowy	128

Wykaz skrótów

4HHE	(ang. 4-hydroxyhexanal) 4-hydrokseyheksanal
4HNE	(ang. trans-4-hydroxy-2-nonenal) trans-4-hydroksey-2-nonenal
ABTS	(ang. 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) kwas 2,2'-azino-bis(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonowy)
Agaroz a LMP	(ang. low melting point agarose) agaroz a o niskim punkcie topnienia
Agaroz a NMP	(ang. normal melting point agarose) agaroz a o normalnym punkcie topnienia
ATM	(ang. ataxia telangiectasia mutated) kinaza alarmowa punktu kontrolnego replikacji, aktywowana w przypadku uszkodzenia DNA
ATP	(ang. adenosine triphosphate) adenozyntrifosforan
ATR	(ang. ATM- related kinase) kinaza alarmowa punktu kontrolnego replikacji, aktywowana w przypadku uszkodzenia DNA
Bak	(ang. Bcl-2 homologous antagonist killer) białko proapoptotyczne należą ce do rodziny białek Bcl-2
Bax	(ang. Bcl-2-associated X protein) białko proapoptotyczne należą ce do rodziny białek Bcl-2
Bcl-2	(ang. B-Cell Leukemia/lymphoma-2) produkt protoonkogenu Bcl-2, wykryty w białaczkach i chłoniakach wywodzą cych się z limfocytów B; rodzina białek Bcl-2
BER	(ang. base excision repair) naprawa DNA przez wycinanie zasad azotowych
BSA	(ang. bovine serum albumin) surowica albuminy wołowej
CAT	(ang. catalase) katalaza
CDNB	(ang. 1-chloro-2,4-dinitrobenzene) 1-chloro-2,4-dinitrobenzen
COX-2	(ang. cyclooxygenase-2) cyklooksygenaza-2
DAMP	(ang. damage-associated molecular pattern) wzory molekularne uszkodzeń
DAPI	(ang. 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride) dichlorowodorek 4',6-diamidyno-2-fenyloindolu
DDR	(ang. DNA damage response) szlak odpowiedzi na uszkodzenia DNA
DMEM	(ang. Dulbecco's Modified Eagle Medium) medium wzrostowe

DMSO	(ang. dimethylsulfoxide) dimetylosulfotlenek
DNA	(ang. deoxyribonucleic acid) kwas deoksyrybonukleinowy
DNTB	(ang. 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid) kwas 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoesowy
DSB	(ang. double-strand breaks) podwójne pęknięcia nici DNA
DTNB	(ang. 5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid) kwas 5,5-ditio-bis-(2-nitrobenzoesowy)
DTPA	(ang. diethylenetriaminepentaacetic acid) kwas pentetynowy
EDTA	(ang. ethylenediamine-tetraacetic acid) kwas etylenodiaminotetraoctowy
FBS	(ang. fetal bovine serum) płodowa surowica bydłęca
FDA	(ang. Food and Drug Administration) Agencję do Spraw Żywności i Leków
GIOŚ	Główny Inspektorat Ochrony Środowiska
GPx	(ang. glutathione peroxidase) peroksydaza glutationowa
GR	(ang. glutathione reductase) reduktaza glutationowa
GSH	(ang. glutathione) zredukowany glutation
GSSG	(ang. glutathione disulfide) disiarczek glutationu
GST	(ang. glutathione S-transferase) transferaza glutationowa
H2DCF-DA	(ang. 2',7'-dichloro- dihydro fluorescein diacetate) dioctan 2',7'-dichlorodihydrofluoresceiny
HBSS	(ang. Hank's Buffered Salt Solution) zbuforowany roztwór Hanksa
hOGG1	(ang. human 8-oxoguanine DNA glycosylase 1; ludzka 1 glikozylaza DNA 8-oksoguaniny
ICRP	(ang. International Commission on Radiological Protection) Międzynarodowa Komisja ds. Ochrony Radiologicznej
IL-8	(ang. interleukin 8) interleukina 8
K562	linia komórkowa ludzkiej białaczki szpikowej
L929	linia komórkowa fibroblastów mysich
LLPRs	(ang. long-lived protein radicals) długo żyjące rodniki białkowe
LPO	(ang. lipid peroxidation) peroksydacja lipidów
MAPK	(ang. mitogen-activated protein kinases) kinazy aktywowane miogenami
MDA	(ang. malondialdehyde) dialdehyd malonowy

MetSox	(ang. methionine sulfoximine) sulfoksymina metioniny
MMR	(ang. mismatch repair) naprawa błędnie sparowanych nukleotydów
MNOC	(ang. multi-nucleated giant cells) duże komórki z kilkoma małymi jądrami komórkowymi
MONGC	(ang. mono-nucleated giant cells) duże komórki zawierające jedno duże jądro komórkowe
NADPH	(ang. nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego
NEM	(ang. N-ethylmaleimide) N-etylomaleimid
NER	(ang. nucleotide excision repair) naprawa przez wycinanie nukleotydów
NHEJ	(ang. non-homologous end joining) naprawa DNA przez łączenie końców niehomologicznych
NRPB	(ang. National Radiological Protection Board) Krajowy Zespół ds. Ochrony Radiologicznej
OPA	(ang. o-Phthalaldehyde / ortho-phthalaldehyde) orto-ftalaldehyd, aldehyd orto-ftalowy
p53	(ang. tumor protein p53) białko kodowane przez gen supresorowy TP53
PBMC	(ang. peripheral blood mononuclear cells) komórki jednojądrzaste krwi obwodowej człowieka
PBS	(ang. phosphate buffered saline) zbuforowany roztwór soli fizjologicznej
PG, PGs	glikokoniugat polifenolowy, glikokoniugaty polifenolowe
PKC	(ang. protein kinase C) kinaza białkowa C
PLC γ	(ang. phospholipase C γ) fosfolipaza C γ
PS	(ang. phosphatidylserine) fosfatydyloseryna
RAI	radioaktywny izotop jodu
RIBE	(ang. radiation-induced bystander effect) efekt sąsiedztwa indukowany promieniowaniem gamma
ROS	(ang. reactive oxygen species) reaktywne formy tlenu
RNS	(ang. reactive nitrogen species) reaktywne formy azotu
RPMI	(ang. Roswell Park Memorial Institute medium) medium wzrostowe
SOD	(ang. superoxide dismutase) dysmutaza ponadtlenkowa

SDS	(ang. sodium dodecyl sulfate) siarczan dodecyłu sodu
SSB	(ang. single-strand breaks) pojedyncze pęknięcia nici DNA
TAC	(ang. total antioxidant capacity) całkowity potencjał antyoksydacyjny
TBA	(ang. thiobarbituric acid) kwas tiobarbiturowy
TBARS	(ang. thiobarbituric acid reactive substances) substancje reagujące z kwasem tiobarbiturowym
TCA	(ang. trichloroacetic acid) kwas trichlorooctowy
TGF β 1	(ang. transforming growth factor β) transformujący czynnik wzrostu β 1
TLR	(ang. Toll-like receptor) receptory Toll-podobne
UNSCEAR	(ang. United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation) Komitet Naukowy Narodów Zjednoczonych ds. Skutków Promieniowania Atomowego
WBI	(ang. whole body irradiation) napromienieniem całego ciała
WRAMC	(ang. Walter Reed Army Medical Center) Centrum Badawcze Wojskowego Szpitala w Waszyngtonie

Część teoretyczna

1. Wstęp

Promieniowanie fal elektromagnetycznych (np. promieniowanie ultrafioletowe, radiowe, mikrofalowe, gamma), korpuskularne (np. promieniowanie alfa, beta), czy mieszane (np. promieniowanie kosmiczne, naturalne) jest nieustannie obecne w życiu człowieka. Na działanie promieniowania jonizującego (rentgenowskie, gamma, alfa, beta) człowiek jest narażony, m.in. podczas badań diagnostycznych czy radioterapii oraz w czasie wykonywania czynności zawodowych. Do nieplanowanego narażenia na promieniowanie, zwykle w większych dawkach, może dojść na przykład na skutek ataku terrorystycznego z użyciem izotopu czy awarii elektrowni jądrowej. Jonizacja towarzysząca promieniowaniu stanowi niebezpieczeństwo dla zdrowia człowieka, indukuje stres oksydacyjny, który może uszkadzać białka, lipidy błonowe, DNA oraz RNA. Promieniowanie jonizujące jest czynnikiem mutagennym, ekspozycja na ten rodzaj promieniowania zwiększa ryzyko wystąpienia nowotworów złośliwych (Leuraud i wsp., 2015). Jednak promieniowanie jonizujące stosowane w sposób kontrolowany znalazło zastosowanie w medycynie, zarówno w celach diagnostycznych (radiologia), jak i leczniczych (radioterapia). Źródła promieniotwórcze są często wykorzystywane również w innych dziedzinach życia, takich jak przemysł wyrobów medycznych (sterylizacja radiacyjna), rolnictwo i przemysł spożywczy (utrwalanie żywności) czy badania naukowe (Radwan i Mohamed, 2018).

Zgodnie z art. 25 b ustawy z dnia 20 lipca 1991 r. o Inspekcji Ochrony Środowiska (Dz. U. z 2013 r., poz. 686, z późn. zm.) Główny Inspektorat Ochrony Środowiska (GIOŚ) opracowuje, nie rzadziej niż raz na 4 lata, raport o stanie środowiska w Polsce. Według ostatniego raportu GIOŚ udział różnych źródeł promieniowania jonizującego w średniorocznej dawce skutecznej otrzymanej przez statystycznego mieszkańca Polski w 2012 roku wynosił dla źródeł naturalnych 73,6% całkowitego narażenia radiacyjnego wyrażonego jako dawka skuteczna, ze źródeł stosowanych w medycynie (m.in. tomografia komputerowa, mammografia, radioterapia) 26% dawki skutecznej, natomiast inne formy działalności człowieka mogące powodować wzrost promieniowania stanowiły ok. 0,4% całkowitego narażenia radiacyjnego (m.in. pozostałe w środowisku sztuczne radionuklidy pochodzące z wybuchów jądrowych z lat 50., awarie jądrowe) (Główny Inspektorat Ochrony Środowiska, Raport 2014).

Według szacunków brytyjskiego Krajowego Zespołu ds. Ochrony Radiologicznej (ang. National Radiological Protection Board – NRPB) łączna ekspozycja populacji

Wielkiej Brytanii na wszystkie źródła promieniowania jonizującego, w ciągu całego życia odpowiada za około 1% zgonów z powodu nowotworów złośliwych (http://www.nrpb.org/radiation_topics/risks/cancer_risk.htm, 22 listopada 2002 r.). Międzynarodowa Komisja ds. Ochrony Radiologicznej (ang. International Commission on Radiological Protection – ICRP) ma na celu zapewnienie systemu i użytecznych norm ochrony przed promieniowaniem, w tym kontroli ekspozycji medycznej, zawodowej i środowiskowej, a także narażenia wynikającego z przypadkowych incydentów (np. awaria elektrowni jądrowej) (Nassef i Kinsara, 2017). Ekspozycja zawodowa jest narażeniem człowieka na promieniowanie jonizujące pochodzące ze źródeł naturalnych i wytworzonych przez człowieka w wyniku działań w miejscu pracy, z wyjątkiem ekspozycji wyłączonych z norm lub źródeł zwolnionych zgodnie z normami (Nassef i Kinsara, 2017). W Polsce obowiązują obecnie wartości dawek granicznych określone w Rozporządzeniu Rady Ministrów z dnia 18 stycznia 2005 roku (DzU z 2005 r. nr 20, poz. 168). Zgodnie z tym dokumentem dawka graniczna dla osób zawodowo narażonych na promieniowanie jonizujące, wynosi 20 mSv na rok. Graniczna dawka równoważna dla soczewki oka wynosi 150 mSv, dla skóry 500 mSv (średnia wartość dla dowolnej powierzchni 1 cm² napromienionej części skóry). Zgodnie z Ustawą z dnia 29 listopada 2000 roku o prawie atomowym (DzU z 2007 r. nr 42, poz. 276 z późn. zm.) wyróżnia się dwie grupy pracowników, ze względu na stopień narażenia na promieniowanie jonizujące: grupę A – otrzymujących roczną dawkę powyżej 6 mSv oraz grupę B – otrzymujących roczną dawkę powyżej 1 mSv (Kraska i Bilski, 2012).

W zapewnieniu odpowiedniej ochrony człowieka przed promieniowaniem, wynikającym z narażenia medycznego (radioterapia), zawodowego lub przypadkowego, istotną rolę pełnią substancje o właściwościach radioochronnych, tzw. radioprotektory. Szczególnie ważne są radioprotektory podawane pacjentom podczas radioterapii. Precyzyjnie dobrana dawka promieniowania oraz ochrona otaczających komórek nienowotworowych zapewnia bezpieczeństwo podczas leczenia pacjentów onkologicznych. Podczas radioterapii znaczna część komórek prawidłowych także ulega napromieniowaniu i uszkodzeniu, co często ogranicza skuteczność leczenia. Stosowanie związków radioochronnych mogłoby zmniejszać i/lub łagodzić uboczne skutki radioterapii. Idealny radioprotektor powinien spełniać kilka kryteriów, do których należy przede wszystkim zapewnienie znaczącej ochrony przed szkodliwym działaniem promieniowania (po podaniu doustnym lub dożylnym), minimalna toksyczność i duża stabilność. W przypadku radioprotektora w radioterapii dodatkowe znaczenie ma także

działanie wybiórcze – ochrona komórek prawidłowych przy niewielkim wpływie na promienioczułość komórek nowotworowych oraz brak oddziaływania z szeroką gamą innych leków podawanych w trakcie terapii. Spośród wielu badanych związków dobrymi kandydatami na radioprotektory są naturalne związki uzyskiwane z roślin. Związki naturalne w porównaniu z substancjami uzyskiwanymi na drodze syntezy chemicznej zwykle są bezpieczniejsze, mniej toksyczne i tańsze w pozyskiwaniu. Większość charakteryzuje też stosunkowo długi okres półtrwania.

Należy podkreślić, że jak dotąd nie znaleziono związku, który spełniałby wszystkie kryteria idealnego radioprotektora. Wczesne badania nad radioprotektorami koncentrowały się głównie na związkach zawierających grupy tiolowe, analogach cysteiny i merkaptoetyloaminy. Ponad 4 000 tego typu związków zsyntetyzowano w Centrum Badawczym Wojskowego Szpitala w Waszyngtonie (ang. Walter Reed Army Medical Center – WRAMC). Badania nad większością z nich pozostały na etapie badań na komórkach lub zwierzętach ze względu na dużą toksyczność i/lub fakt, że nie zapewniały skutecznej ochrony (Orditura i wsp., 2000) (Wasserman, 1994). Jedynym obecnie lekiem o właściwościach radio- i chemioprotekcyjnych, zatwierdzonym do użytku klinicznego, z zastosowaniem głównie w zapobieganiu kserostomii u pacjentów z nowotworami głowy i szyi, leczonych radioterapią, jest amifostyna (Ethiol, związek WR 2721). Amifostyna nie jest jednak powszechnie stosowana ze względu na wysoką cenę oraz skutki uboczne, które wywołuje (Gloc, Błasiak, 2004). W ostatnich dwóch dekadach przebadano, na modelach *in vitro* i zwierzęcych, różnorodne grupy związków syntetycznych i naturalnego pochodzenia pod kątem ich działania radioochronnego; są to, m. in. cytokiny i inne czynniki immunomodulacyjne, czynniki wzrostu, metalozwiązki, lipopolisacharydy oraz prostaglandyny, ligandy wiążące się z DNA, a także naturalne antyoksydanty i ekstrakty roślinne (Koukourakis, 2012) (Maurya i wsp., 2006) (Nair i wsp. 2001) (Devi i wsp., 2011). Do bardzo licznej i zróżnicowanej grupy roślin i preparatów roślinnych (m.in. ekstraktów i izolowanych substancji) wykazujących działanie radioochronne, w różnych układach modelowych, należą, m. in.: ekstrakty z zielonej herbaty (i izolowane z nich pochodne katechiny i epikatechiny), ekstrakt z pestek winogron, ekstrakty z ostropestu, warzywa z rodziny krzyżowych, czosnek (allicyny), zioła chińskie i ajurwedyjskie, *Panax ginseng* (żeń-szeń), *Eleutherococcus senticosus* (żeń-szeń syberyjski), *Eleutherococcus senticosus* (Eleuterokok kolczasty), *Spirulina platensis* (algi), *Ginkgo biloba* (Miłorząd dwuklapowy), *Mentha arvensis* (Mięta polna), *Podophyllum hexandrum* (Stopkowiec himalajski), *Syzygium cumini* (Czapetka kuminowa), *Aspalathus*

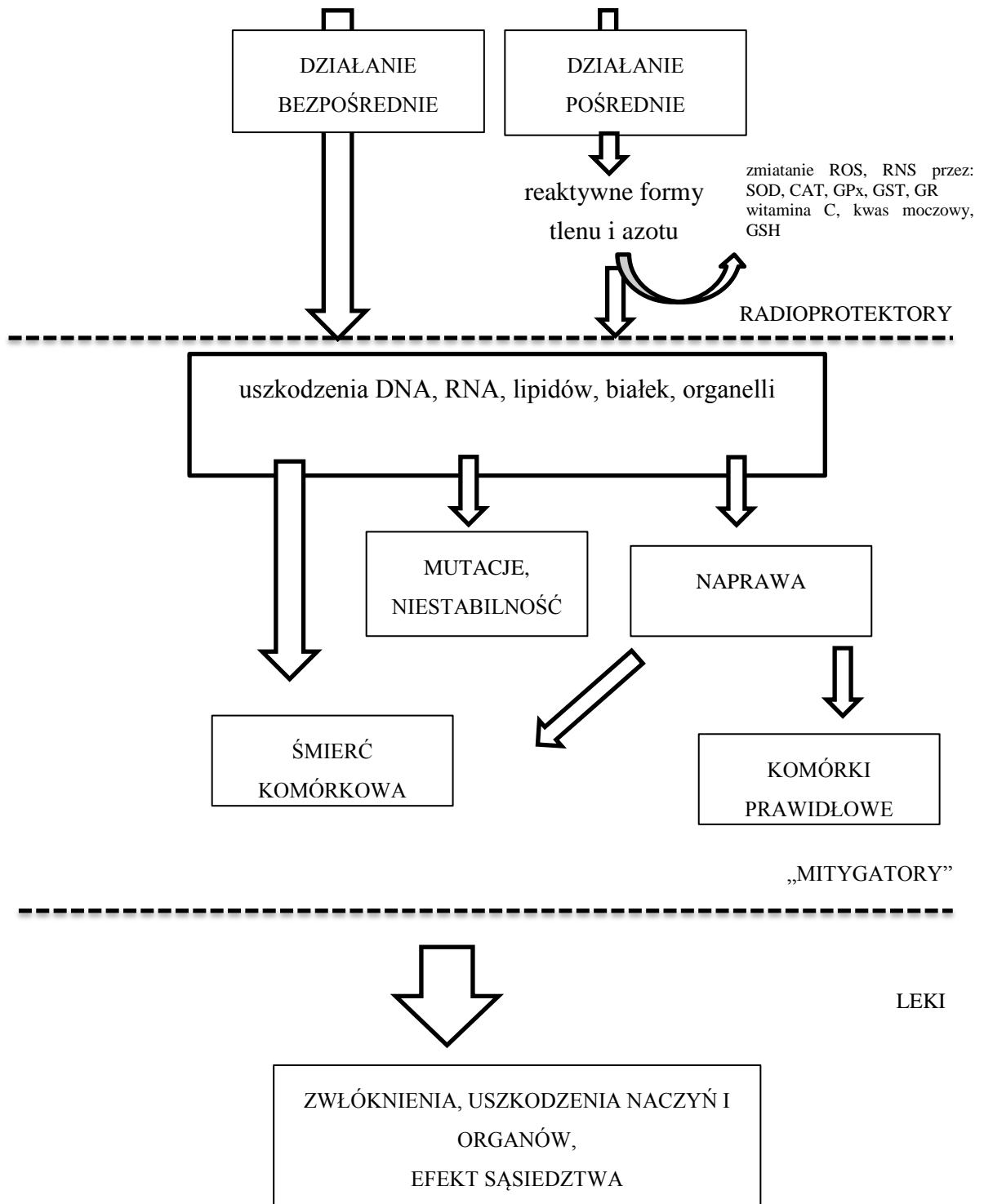
linearis (Aspalat prosty), preparaty sojowe, likopen, metyloksantyny, melatonina (Arora, 2005) (Giardi i wsp., 2013) (Oszmiański i Lamer-Zarawska, 1996) (Jagetia, 2007) (Weiss i Landauer, 2003). Jednakże wiele badań przeprowadzono z użyciem ekstraktów o złożonej budowie co znacznie utrudnia standaryzację tych preparatów, jak i ocenę efektu ochronnego. Wiele z tych ekstraktów oraz scharakteryzowanych substancji o działaniu radioochronnym pochodzi z roślin występujących na terenach Azji (Chiny, Indie, azjatycka część Rosji) i Ameryki Płd, ich uprawa w klimacie umiarkowanym jest kosztowna i wymaga specjalnych warunków.

Wyniki badań na zwierzętach wskazują, że antyoksydanty, takie jak witamina E i selen, czy związki fenolowe (kwasy fenolowe, flawonoidy, stilbeny) podawane przed napromienieniem całego ciała (ang. whole body irradiation; WBI), zmniejszają śmiertelność poradiacyjną oraz wykazują działanie ochronne przed innymi efektami promieniowania, ale w mniejszym stopniu niż związki syntetyczne, m. in. amifostyna (Weiss i Landauer, 2003). Jednak naturalnie występujące antyoksydanty charakteryzują się wydłużonym czasem ochrony i mogą skutecznie chronić przed małymi dawkami promieniowania, także kiedy podawane są po napromienieniu. Badania epidemiologiczne przeprowadzone w grupie napromienionych mieszkańców Hiroszimy i Nagasaki, które przeżyły po wybuchu bomb atomowych sugerują, że duża zawartość antyoksydantów w diecie może zmniejszyć ryzyko zapadalności na nowotwory – wykazano, że duże spożycie żółtozielonych (bogatych w polifenole) warzyw i owoców chroniło przed rakiem pęcherza moczowego (Sauvaget i wsp., 2004) (Nagano i wsp., 2000).

2. Skutki działania promieniowania jonizującego na komórkę

Promieniowanie jonizujące jest promieniowaniem mieszanym, obdarzonym wysoką energią, która powoduje w materii, przez którą przechodzi, procesy jonizacji, polegające na oderwaniu przynajmniej jednego elektronu od atomu lub cząsteczki. Jonizacji towarzyszą procesy wzbudzenia - wybicie elektronu i przemieszczenie na bardziej odległą orbitę. Do promieniowania jonizującego zalicza się różne rodzaje promieniowania elektromagnetycznego (fotony promieniowania X i gamma) oraz korpuskularnego (m.in. cząstki alfa, protony, cząstki beta, czy neutrony) (Strzałkowski, 1978).

PROMIENIOWANIE JONIZUJĄCE



Rycina 1. Schemat działania promieniowania jonizującego na komórki/tkanki oraz miejsca działania związków radioochronnych wg (Kuntić i wsp., 2013) (Pizzimenti i wsp., 2010) (Szejka i wsp., 2016) zmodyfikowano

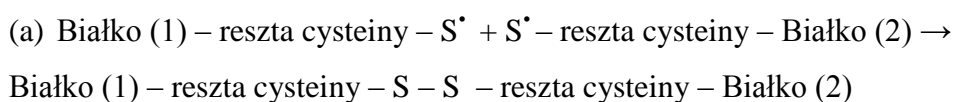
Promieniowanie jonizujące może oddziaływać z biomolekułami komórki bezpośrednio lub pośrednio (Rycina 1). Są to procesy zachodzące bardzo szybko, w czasie $10^{-12} - 10^{-6}$ sekundy od napromieniowania. Podczas działania bezpośredniego uszkodzenia powstają na skutek zderzenia cząstki promieniowania (lub kwantu energii) z cząsteczką docelową, głównie DNA lub cząsteczką białka, lipidu, czy RNA. Działanie pośrednie promieniowania polega na uszkodzeniu biomolekuł poprzez reaktywne formy tlenu (ROS) i reaktywne formy azotu (RNS), powstające podczas radiolizy wody i w dalszych reakcjach rodnikowych (Hosseinimehr, 2007) (Zhao i Robbins, 2009) (Nambiar i wsp., 2011) (Laube i wsp., 2016) (Kuntić i wsp., 2013). Większość uszkodzeń biocząsteczek w komórce ekspozowanej na promieniowanie jonizujące jest generowane przez ROS powstałe podczas radiolizy wody (Gudkov i wsp., 2010). Radioliza wody polega na jonizacji, wzbudzeniu i rozpadzie cząsteczek wody. W czasie około 10^{-16} sekundy po napromienieniu następuje jonizacja i wzbudzanie cząsteczek wody, kolejno dochodzi do rozpadu wody na atomy wodoru i rodniki hydroksylowe, w czasie $10^{-14} - 10^{-13}$ sekundy. Następnie tworzą się elektrony uwodnione czyli elektrony otoczone cząsteczkami wody (10^{-12} sekundy), które reagując z cząsteczką tlenu mogą tworzyć anionorodnik ponadtlenkowy. Następnie dochodzi do utworzenia produktów nierodnikowych, m.in. nadtlenu wodoru, w wyniku oddziaływań pierwotnych wolnorodnikowych produktów radiolizy wody (Bartosz, 2009).

Za zachowanie odpowiedniej homeostazy redoks w komórce odpowiada endogenny system obrony antyoksydacyjnej, na który składa się system enzymatyczny i nieenzymatyczny. System enzymatyczny stanowią enzymy antyoksydacyjne, tj. dysmutaza ponadtlenkowa (SOD), katalaza (CAT), peroksydaza glutationowa (GPx), transferazy glutationowe (GST) oraz reduktaza glutationowa (GR). System nieenzymatyczny to małowcząsteczkowe antyoksydanty, m.in. witamina C, kwas moczowy, glutation (GSH). Komórkowy system obrony antyoksydacyjnej umożliwia zachowanie homeostazy redoks dopóki nie zostanie przekroczony próg wydajności tej obrony, a dawki terapeutyczne promieniowania celowo przekraczają ten próg, aby wywołać zamierzoną toksyczność radiologiczną w komórkach nowotworowych, co prowadzi do jednoczesnego wywołania szeregu niepożądanych skutków ubocznych w komórkach prawidłowych (Zhao i Robbins, 2009) (Citrin i Mitchell 2017) (Nikitaki i wsp., 2016) (Laube i wsp. 2016). Powstałe ROS i RNS, indukowane promieniowaniem jonizującym, prowadzą do uszkodzeń DNA, białek i lipidów (Davies i wsp., 1999) (Headlam i wsp., 2002).

Jednym z efektów oddziaływania promieniowania jonizującego na komórkę jest zatrzymanie cyklu komórkowego, co daje komórce czas na naprawę DNA. Nienaprawione lub źle naprawione uszkodzenia DNA są przyczyną mutacji i niestabilności genomu. Komórka może być także kierowana na jeden ze szlaków śmierci. Na poziomie organizmu, promieniowanie powoduje tzw. wczesny odczyn popromienny (m. in. śmierć komórek układu hematopoetycznego i nabłonka jelita) oraz późny odczyn popromienny (zwłóknienia, uszkodzenia naczyń i organów) (Kuntić i wsp., 2013) (Szejka i wsp., 2016).

2.1. Oddziaływanie promieniowania jonizującego z białkami

Reaktywne formy tlenu powstające podczas radiolizy wody, powodują oksydacyjne modyfikacje i uszkodzenia białek. Białka są biomolekułami najbardziej wrażliwymi na działanie rodnika hydroksylowego (OH^\cdot). Rodnik hydroksylowy, który jest jednym z najbardziej reaktywnych rodników, jest najczęstszym mediatorem procesów utleniania białek (Du i Gebicki, 2004). Rodnik hydroksylowy odrywa atom wodoru od cząsteczki białka (od węgla α szkieletu polipeptydowego i/lub węgla w łańcuchu bocznym aminokwasu), prowadząc do powstania rodnika białkowego (alkilowego; R^\cdot). Rodnik alkilowy reaguje z tlenem tworząc rodnik nadtlenkowy (ROO^\cdot) i ostatecznie rodnik alkoksylowy (RO^\cdot) (Ponczek i Wachowicz 2005). W efekcie wewnątrzcząsteczkowego transferu niesparowanego elektronu dochodzi do fragmentacji białek, poprzez pęknięcia łańcucha polipeptydowego przy rodniku alkoksylowym lub na skutek modyfikacji reszt aminokwasowych (proliny, glutaminianu, czy asparaginianu). Dochodzi do przemian cząsteczek białka i tworzenia nie rodnikowych produktów (np. hydroksylowanych pochodnych). Gdy niesparowany elektron znajduje się na resztach cysteiny lub tyrozyny różnych cząsteczek białkowych lub różnych fragmentów łańcucha polipeptydowego tej samej cząsteczki, następuje rekombinacja wolnych rodników białkowych. W wyniku rekombinacji powstają kowalencyjne dimery białek połączonych mostkami cystynowymi (disiarczkowymi) (a), gdy niesparowany elektron znajduje się na resztach cysteiny lub bis-tyrozyłowymi (b), gdy niesparowany elektron zlokalizowany jest na resztach tyrozyny (Naskalski, Bartosz, 2000) (Puzanowska-Tarasiewicz i wsp., 2008):



(b) Białko (1) – reszta tyrozyny[•] + [•]reszta tyrozyny – Białko (2) →

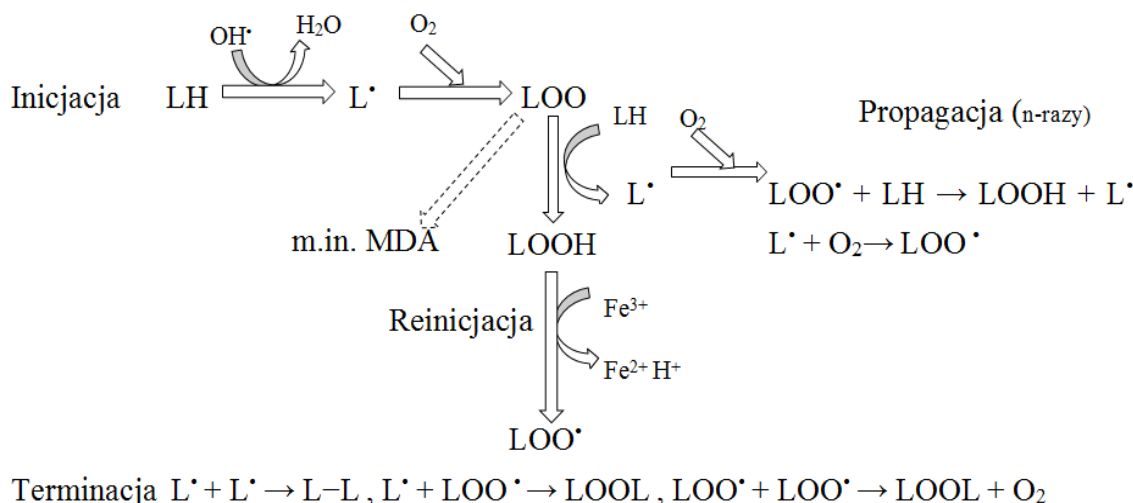
Białko (1) – reszta tyrozyny – reszta tyrozyny – Białko (2)

W warunkach tlenowych pod wpływem działania na białka promieniowania jonizującego powstają rodniki nadtlenkowe białek, a dalsze przemiany prowadzą przede wszystkim do fragmentacji cząsteczek białka. Natomiast przy niedoborze tlenu dochodzi głównie do tworzenia agregatów białkowych. Okres półtrwania rodników białkowych powstających po napromienieniu może być zróżnicowany i zależy od dawki promieniowania oraz wielu innych czynników. Badania przeprowadzone przez Gudkov i wsp. oraz Bruskov i wsp., którzy napromieniali albuminę izolowaną z bydlęcej surowicy krwi dawką 10 i 20 Gy wykazały, że w tych warunkach dochodzi do generowania długo żyjących rodników białkowych (ang. long-lived protein radicals, LLPRs), a ich czas półtrwania wynosi 3-5 godzin. LLPRs *in vivo* indukują mutacje i prowadzą do transformacji komórkowej (Gudkov i wsp., 2010) (Bruskov i wsp., 2012). Anionorodnik ponadtlenkowy i nadtlenek wodoru, powstające podczas radiolizy wody, mogą także powodować modyfikacje oksydacyjne białek, poprzez utlenianie grup tiolowych, natomiast nadltenoazotyn, który powstaje na skutek reakcji anionorodnika ponadtlenkowego z tlenkiem azotu, może powodować nitrowanie białek. Spośród reszt aminokwasowych białek, reszty cysteiny i metioniny (aminokwasy siarkowe), lizyny, argininy i histydyny (zasadowe), tryptofanu, fenyloalaniny i tyrozyny (aromatyczne) oraz proliny wykazują większą wrażliwość na uszkodzenia oksydacyjne. Modyfikacje oksydacyjne białek indukowane promieniowaniem szybko prowadzą do nieodwracalnych uszkodzeń i zmniejszenia, a nawet utraty ich aktywności. Agregaty białkowe mogą hamować aktywność enzymów proteolitycznych, a ich akumulacja w komórce może indukować apoptozę lub prowadzić do nekrozy (Ponczek, Wachowicz, 2005) (Davies, 2005).

2.2. Oddziaływanie promieniowania jonizującego z lipidami

Reaktywne formy tlenu i azotu, generowane przez promieniowanie jonizujące, uszkodzają błonę komórkową, poprzez inicjowanie peroksydacji lipidów. Peroksydacja lipidów (ang. lipid peroxidation; LPO) to wolnorodnikowy proces utleniania nienasyconych kwasów tłuszczowych, wolnych i/lub związanych z błoną, w wyniku którego powstają nadtlutki tych związków, a następnie różnorodne końcowe produkty ich utleniania. W przypadku promieniowania jonizującego inicjatorem LPO jest głównie

rodnik hydroksylowy, który oddziałuje z nienasyconymi kwasami tłuszczowymi fosfolipidów błony komórkowej. W efekcie powstają nadtlenki lipidów, które mogą uszkadzać kolejne kwasy tłuszczowe fosfolipidów błon (Przybyszewski i wsp., 2008) (Pizzimenti i wsp., 2010). Peroksydacja lipidów (nieenzymatyczna) obejmuje wieloetapowy proces składający się z trzech faz: inicjacji, propagacji i terminacji. Schemat ogólny wolnorodnikowej (nieenzymatycznej) LPO przedstawiono na Rycinie 2.



Rycina 2. Schemat ogólny wolnorodnikowej (nieenzymatycznej) LPO (Puzanowska-Tarasiewicz i wsp., 2008) (Kulbacka i wsp., 2009) (Bartosz, 2009) zmodyfikowano

Podczas inicjacji dochodzi do oderwania atomu wodoru od grup metylenowych, znajdujących się pomiędzy dwoma wiązaniami podwójnymi cząsteczki wielonienasyconego kwasu tłuszczowego, najczęściej związanego z fosfolipidami błon lub wolnego. Proces ten może być zapoczątkowany nie tylko przez rodnik $\text{OH}\cdot$, ale także, m.in. przez rodnik nadtlenkowy ($\text{LOO}\cdot$), alkoksylowy ($\text{LO}\cdot$) lub alkilowy ($\text{L}\cdot$). W wyniku inicjacji z cząsteczki kwasu tłuszczowego powstaje wolny rodnik alkilowy (przy atomie węgla pozostał niesparowany elektron). Dochodzi do powstania wiązań sprzężonych w wyniku przegrupowania wiązań podwójnych (Kulbacka i wsp., 2009) (Bartosz, 2009). Podczas etapu propagacji wolne rodniki alkilowe reagują z tlenem i powstają wolne rodniki nadtlenkowe, które mogą odrywać atomy wodoru od kolejnych wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, w konsekwencji dochodzi do powstania wodoronadtlenków lipidowych. Jednak podczas tej reakcji wolny rodnik nie ginie, ponieważ reakcji ulegają kolejne nieuszkodzone cząsteczki kwasu tłuszczowego,

co powoduje, że cykl reakcji jest powtarzany wielokrotnie, aż do reakcji terminacji (Kulbacka i wsp., 2009) (Bartosz, 2009). Podczas etapu terminacji dochodzi do reakcji pomiędzy dwoma rodnikami alkilowymi, albo dwoma rodnikami nadtlenkowymi, lub dwoma różnymi rodnikami. Powstają dimery kwasów tłuszczowych, w błonach biologicznych są to dimery fosfolipidów oraz oksohydroksykwasy i hydroksykwasy tłuszczowe. Peroksydacja lipidów jest procesem zachodzącym w błonie komórkowej, w której obecne są również białka, w związku z tym wolne rodniki powstające podczas LPO reagują również z białkami. Skutkiem tych reakcji są powstające wolne rodniki białkowe uczestniczące w reakcjach terminacji tworzące mieszane połączenia białkowo – lipidowe. Podczas procesu LPO dochodzi również do zjawiska reinicjacji. Nierodnikowe produkty LPO, czyli wodoronadtlenki lipidów mogą ulegać rozkładowi prowadząc ponownie do powstania produktów wolnorodnikowych. Rozpad inicjowany jest przez jony metali przejściowych (głównie Fe i Cu) (Bartosz, 2009). Kolejne przemiany produktów peroksydacji lipidów zachodzą m.in. podczas reakcji β -eliminacji, prowadząc do rozpadu reszt wielonienasyconych kwasów tłuszczowych i utworzenia fragmentów o długości od kilku do kilkunastu atomów węgla. Produktami końcowymi LPO są związki zawierające w swej strukturze grupy aldehydowe, ketonowe, hydroksylowe, karboksylowe, peroksyłowe, epoksydowe grupy funkcyjne i węglowodory m.in. alkany i alkeny. Związki te powodują zmiany metaboliczne oraz w szlakach sygnałowych, co może prowadzić do powstawania mutacji, niestabilności genetycznej, a ostatecznie kancerogenezy. Powstałe dimery fosfolipidów czy fosfolipidy zawierające reszty hydroksylowe i ketonowe wpływają na zaburzenia funkcji błony komórkowej i jej integralność. Wprowadzenie grup polarnych nadtlenków, wodorotlenków czy aldehydów do cząsteczek fosfolipidów skutkuje utratą integralności błony poprzez zmniejszenie hydrofobowości lipidowego wnętrza błon i zmiany organizacji dwuwarstwy lipidowej (Bartosz, 2009). Peroksydacja lipidów skutkuje depolaryzacją błony czyli zmniejszeniem różnicy potencjałów elektrycznych po obu stronach błony i zaburzeniami asymetrii lipidów błon, w wyniku czego dochodzi do ekspozycji fosfadyloseryny (PS) na zewnętrznej powierzchni błony - cechy charakterystycznej dla komórek apoptotycznych. Dochodzi również do hamowania aktywności enzymów błonowych i białek transportujących. Ostatecznym skutkiem LPO jest utrata integralności błon wewnątrzkomórkowych i błony plazmatycznej. Przykładami związków powstałych w procesie peroksydacji lipidów, są m.in. dialdehyd malonowy (MDA), aldehyd akrylowy (akroleina), aldehyd krotonowy, etanodiol (glioksal), tlenek etylenu, eten, propen, trans-4-hydrokso-2-nonenal (4HNE), 4-hydroksoheksanal (4HHE).

Większość z nich, to związki toksyczne. Jednym z produktów LPO o dużej toksyczności jest 4HNE, który odgrywa ważną rolę w regulacji wzrostu komórek, różnicowaniu się komórek, apoptozie, modyfikacji szlaków sygnałowych i ekspresji genów. 4-HNE jest związkiem wysoce genotoksycznym i mutagennym. Jednak najbardziej mutagennym produktem LPO jest MDA, biologiczny marker stresu oksydacyjnego (Bartosz, 2009), (Kulbacka i wsp., 2009) (Niki, 2009) (Przybyszewski i wsp., 2008).

2.3. Oddziaływanie promieniowania jonizującego z DNA

DNA jest strukturą najbardziej wrażliwą na promieniowanie, a produkty toksyczne (ROS/RNS) indukowane przez promieniowanie kumulują się głównie w jądrze komórkowym. Promieniowanie jonizujące oddziałuje z cząsteczką DNA bezpośrednio (30-40%) lub pośrednio (60-70%). Działanie bezpośrednie prowadzi do depozycji energii w cząsteczce DNA i jonizacji. Spośród ROS, głównie rodnik OH^\cdot wywołuje najwięcej uszkodzeń w DNA, który może indukować zmiany w pierścieniu deoksyrybozy i strukturze zasad, pojedyncze i podwójne pęknięcia nici DNA, powstawanie wiązań krzyżowych DNA-DNA oraz DNA-białko (Cooke, 2003).

Najbardziej wrażliwe na działanie rodnika OH^\cdot są reszty tymidyny. W reakcji rodnika OH^\cdot z tymidyną, powstają wolne rodniki, które reagując z tlenem tworzą nadtlenki. W wyniku tych reakcji powstają izomery nadtlenku tyminy z grupą nadtlenkową w pozycji 5 pierścienia pirymidynowego (*cis*-6-hydrokso-5-hydroperokso-5,6-dihydrotymidyna) lub 6 pierścienia pirymidynowego (*cis*-5-hydrokso-6-hydroperokso-5,6-dihydrotymidyna lub grupą nadtlenkową związaną z węglem grupy metylowej (5-hydroperoksymetylo-2'-deoksyurydyna) (Cooke, 2003) (Bartosz, 2009). Powstałe izomery tyminy są trwałe, jednak w obecności substancji redukujących ulegają rozpadowi. Z *cis*-6-hydrokso-5-hydroperokso-5,6-dihydrotymidyny i *cis*-5-hydrokso-6-hydroperokso-5,6-dihydrotymidyny powstaje *cis*-glikol tymidyna, posiadająca dwie grupy hydroksylowe w pozycji 5 i 6 pierścienia z wysyconym wiązaniem między węglami, natomiast 5-hydroperoksymetylo-2'-deoksyurydyna rozpada się na 5-hydroksymetylo-2'-deoksyurynę i 5-formylo-2'-deoksyurydynę. Związki te są dość trwałe lecz kolejne reakcje z ROS mogą skutkować dalszą degradacją glikolu tymidyny. Oksydacyjne modyfikacje pierścienia tyminy sprzyjają przekształceniu glikolu tymidyny w *N'*-formylo-*N*-pirogronylomocznik, który w wyniku cyklizacji pierścienia może tworzyć 5-hydrokso-5-metylohydantoinę lub podlegać dalszej degradacji do *N*-formylomocznika. Rodnik hydroksylowy reaguje

także z cytozyną, tworząc produkty degradacji analogiczne jak w przypadku tyminy (Cooke, 2003) (Bartosz, 2009).

Reakcje rodnika hydroksylogowego z zasadami purynowymi DNA dotyczą wiązania przy węglu C4, C5 lub C8 pierścienia. W wyniku modyfikacji przy węglu 8 pierścienia purynowego powstają produkty, takie jak 8-hydroksy-2'-deoksyguanozyna, a także 8-hydroksyadenina. Oksydacyjne otwarcie pierścienia imidazolowego puryn, utlenionych w pozycji 8, prowadzi do powstania pochodnych pirymidyn, tj. 2,6-diamino-4-hydroksy-5-formamidopirymidyna i 5-formamido-4,6-diaminopirymidyna (Kawanishi i wsp., 2001) (Williams i Jeffrey, 2000) (Cooke, 2003).

Powstawanie utlenionych zasad może prowadzić do mutacji. Głównym mechanizmem naprawy oksydacyjnych uszkodzeń DNA jest naprawa na drodze wycinania zasad azotowych (ang. base excision repair; BER), naprawą wspierającą jest naprawa przez wycięcie nukleotydu (ang. nucleotide excision repair; NER) (Roszkowski i Błaszczyk, 2009) (Hosseinimehr, 2010) (Dizdaroglu i wsp., 2002) (Cooke i wsp., 2003).

Sprzężenie rodników metylocytozyny lub tyminy z sąsiednimi zasadami purynowymi prowadzi do powstania wiązań kowalencyjnych między nukleotydami tej samej nici, powstają wewnętrzne połączenia krzyżowe. Wewnętrzne wiązania krzyżowe naprawiane są poprzez naprawę błędnie sparowanych nukleotydów (ang. mismatch repair; MMR). Naprawa wiązań krzyżowych generuje powstawanie podwójnych pęknięć nici, dlatego też modyfikacje te są niezwykle cytotoksyczne i mutagenne. Rodnik nukleotydowy wytwarzany przez promieniowanie może być kowalencyjnie połączony z deoksyrybozą tego samego nukleotydu lub jego sąsiedniej zasady z wytworzeniem cyklonukleozydów. Rodniki alkilowe reagują z innymi zasadami, w wyniku czego powstaje usieciowany DNA. Zmiany te hamują replikację DNA i transkrypcję (Dizdaroglu i wsp., 2002) (Hosseinimehr, 2010).

Wiązania krzyżowe DNA-białko są wiązaniami kowalencyjnymi powstającymi pomiędzy zasadą azotową lub cukrem, a danym aminokwasem. Białko zostaje unieruchomione na nici DNA. Utworzenie wiązań krzyżowych DNA-białko prowadzi do zablokowania replikacji i transkrypcji DNA (Hosseinimehr, 2010).

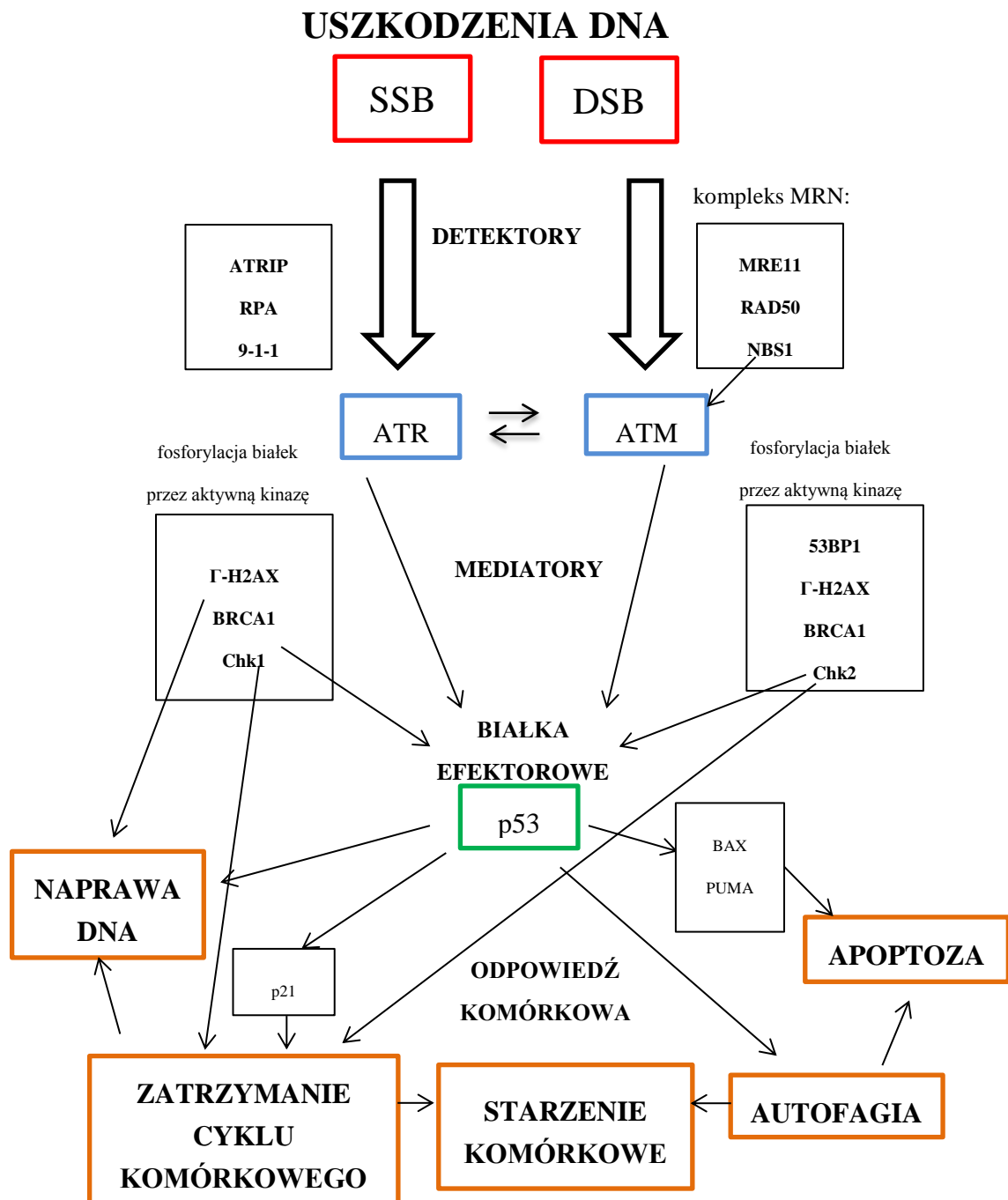
Najbardziej cytotoksycznymi dla komórki uszkodzeniami DNA są podwójne pęknięcia nici (ang. double-strand breaks; DSBs). Pojedyncze pęknięcia nici (ang. single-strand breaks; SSBs) są szybko naprawiane. Do DSBs w DNA dochodzi, wówczas gdy dwie komplementarne nici ulegają uszkodzeniu w tym samym czasie, blisko siebie. Jedno nienaprawione DSB jest wystarczającym czynnikiem do indukcji procesu apoptozy

komórek. Pęknięcia nici DNA naprawiane są poprzez łączenie końców niehomologicznych (ang. non-homologous end joining; NHEJ) lub homologiczną rekombinację. Przy skutecznej naprawie DNA komórka jest zdolna do proliferacji, a komórki potomne są prawidłowe. Skutkiem nieprawidłowej naprawy mogą być liczne aberracje chromosomowe, dochodzi do mutacji i niestabilności genetycznej (Hosseinimehr, 2010) (Podhorecka, 2009).

W komórkach, które nie zostały poddane napromienieniu, a znalazły się w środowisku komórek napromienionych wykazywany jest efekt sąsiedztwa (ang. radiation-induced bystander effect; RIBE). W takich nienapromienionych komórkach obserwowane jest występowanie aberracji chromosomowych, mutacji, apoptozy oraz zmian w ekspresji białek. Przyczyną występowania RIBE jest przesyłanie sygnałów pomiędzy komórkami, poprzez kanały międzykomórkowe. Komórki napromienione uwalniają do środowiska czynniki generujące ROS i RNS. Mediatorem RIBE jest m.in. transformujący czynnik wzrostu $\beta 1$ (ang. transforming growth factor β ; TGF $\beta 1$). Cytokina ta aktywuje w komórkach nienapromienionych enzymatyczny kompleks oksydazy błonowej NADPH (ang. nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego), poprzez receptor kinazy serynowo-treoninowej. NADPH generuje nadtlenek wodoru. Inną cytokiną związaną z RIBE jest interleukina 8 (ang. interleukin 8; IL-8). Wpływa ona na kinazy z rodziny MAPK (ang. mitogen-activated protein kinases; kinazy aktywowane mitogenami) – ERK1/2, JNK, p38 i czynniki transkrypcyjne zależne od kinazy ATM (ang. ataxia telangiectasia mutated) takie jak SP1 i AP1. Białka te aktywują szlaki sygnałowe np. szlak fosfolipazy C γ (ang. phospholipase C γ ; PLC γ), czy szlak cyklooksygenazy-2 (ang. cyclooxygenase-2; COX-2) (Konopacka, 2007) (Widel i wsp., 2009).

DNA komórki jest narażony na działanie wielu czynników uszkodzających, w związku z tym komórki eukariotyczne wykształciły specjalny system, określane jako szlak odpowiedzi na uszkodzenia DNA (ang. DNA damage response, DDR). Szlak DDR działa dzięki aktywacji białek detektorów, wykrywających uszkodzenia DNA (w tym indukowane promieniowaniem gamma SSBs oraz DSBs), następnie mediatorów, czyli białek pośredniczących, które ostatecznie indukują aktywację białek efektorowych – decydujących o specyficznej odpowiedzi komórki (Rycina 3). Aktywacja szlaku DDR uruchamia punkty kontroli cyklu komórkowego i zatrzymania podziałów, uniemożliwiając przekazanie uszkodzonego DNA do komórek potomnych, aktywowane są natomiast mechanizmy naprawy DNA. W przypadku naprawionych uszkodzeń DNA, następuje

wznowienie cyklu komórkowego, a komórka może funkcjonować prawidłowo. W przypadku braku możliwości naprawy, często ze względu na dużą liczbę uszkodzeń, dochodzi do eliminacji komórki na drodze programowanej lub nie programowanej śmierci albo do indukcji procesu starzenia komórkowego – nieodwracalnego zatrzymania cyklu komórkowego i podziałów (Ciccia i Elledge, 2010) (Nagaria i wsp., 2013).



2.4. Rodzaje śmierci komórki indukowanej promieniowaniem jonizującym

Śmierć przy udziale różnych mechanizmów, takich jak: apoptoza, katastrofa mitotyczna, starzenie komórkowe, autofagia oraz nekroza, jest jednym z głównych skutków działania promieniowania na komórki. Apoptoza jest najlepiej poznany mechanizm programowanej śmierci komórkowej, jest najczęściej występującym rodzajem śmierci w przypadku radioterapii stosowanej w leczeniu nowotworów hematologicznych, podatne na apoptozę są także niektóre prawidłowe komórki krwi, m.in. limfocyty oraz komórki grasicy (tymocyty) (Boulton i wsp., 2013) (Eriksson i Stigband, 2010).

Apoptoza jest procesem wieloetapowym, występującym fizjologicznie w komórce. Główną rolą apoptozy jest utrzymywanie równowagi pomiędzy proliferacją komórek, a ich eliminacją. Dzięki apoptozie usuwane są z organizmu komórki patologiczne (nowotworowe, zmutowane, zainfekowane). Charakterystycznymi cechami apoptozy są zmiany morfologiczne polegające na kondensacji chromatyny i umiejscowieniu jej w okolicach błony jądrowej, obkurczenie komórki powodujące utratę kontaktu z sąsiednimi komórkami, fragmentacja jądra komórkowego, rozpad DNA na krótkie odcinki o długości 180-200 par zasad i utrata wody, czego efektem jest zagęszczenie cytoplazmy (Boulton i wsp., 2013) (Eriksson i Stigband, 2010). Zmiany te ostatecznie prowadzą do rozpadu komórki - z uwypukleń błony jądrowej i komórkowej tworzą się ciała apoptotyczne, posiadające wewnątrz prawidłowe morfologicznie organelle oraz fragmenty jądra. Ciała apoptotyczne są następnie usuwane przez komórki żerne (fagocytoza) co zapobiega reakcji zapalnej. Zmiany biochemiczne w apoptozie indukowanej przez promieniowanie jonizujące mogą przebiegać na drodze różnych szlaków, takich jak dwa główne szlaki apoptotyczne, szlak zewnętrzny (receptorowy) i szlak wewnętrzny z udziałem mitochondrium, a także przy udziale innych szlaków, m.in. pseudoreceptorowego, indukowanego stresem (siateczka endoplazmatyczna), czy też sfingomielinowo-ceramidowego (Panganiban i wsp., 2013) (Paduch i wsp., 2015).

Niezależnie od rodzaju wykorzystywanego szlaku aktywacji ulegają kaspazy - proteazy cysteinowe, w zależności od etapu apoptozy, w którym biorą udział, określane jako inicjatorowe (należą do nich kaspaza 2, 8, 9 i 10) lub wykonawcze (kaspaza 3, 6 i 7).

Katastrofą mitotyczną (śmiercią mitotyczną) określana jest śmierć komórki zachodząca w czasie mitozy, na skutek uszkodzenia komórki i niesprawności punktów kontrolnych cyklu komórkowego. Jest to prawdopodobnie główny mechanizm śmierci indukowanej promieniowaniem jonizującym w komórkach nowotworowych guzów litych (Boulton i wsp., 2013) (Eriksson i Stigband, 2010). Podczas katastrofy mitotycznej dochodzi do nieprawidłowej segregacji chromosomów i tworzenia komórek tetraploidalnych lub o większej ploidalności. Katastrofa mitotyczna charakteryzuje się licznymi aberracjami chromosomowymi, fragmentacją jądra komórkowego, jak również formowaniem się dużych komórek zawierających jedno duże jądro komórkowe (ang. mono-nucleated giant cells - MONGC) lub dużych komórek z kilkoma małymi jądrami komórkowymi (ang. multi-nucleated giant cells MONC). MONC (mikrojądra) powstają z błony jądrowej z zamkniętymi fragmentami chromatyny nieprawidłowo rozdzielonej w czasie mitozy (Castedo i wsp., 2004) (Stępień i wsp., 2007).

Starzenie komórkowe (ang. senescence) jest zjawiskiem, które można podzielić na starzenie replikacyjne oraz starzenie przyspieszone zwane też przedwczesnym. Starzenie replikacyjne związane jest z limitem Hayflicka - każda komórka ma maksymalny wiek replikacyjny, ponieważ dysponuje ograniczoną liczbą podziałów, po czym dochodzi do zatrzymania cyklu komórkowego. Starzenie replikacyjne związane jest ze skracaniem się telomerów przy każdym podziale komórkowym, poprzez utratę końcowej sekwencji TTAGGG podczas każdego cyklu komórkowego. Wspecjalizowane komórki somatyczne nie posiadają odpowiedniej ilości odwrotnej transkryptazy – aktywnej telomerazy, która umożliwiałaby *de novo* syntezę utraconych powtórzeń. Natomiast komórki nowotworowe posiadają aktywną telomerazę, dzięki temu mają nieograniczoną liczbą podziałów (Sabin i Anderson, 2011) (Stępień i wsp., 2007). Starzenie przyspieszone jest spowodowane czynnikami stresowymi, np. uszkodzeniem DNA na skutek radioterapii, chemioterapii, a jego przebieg jest niezależny od skracania się telomerów. Starzenie przyspieszone to stan trwałego zatrzymania cyklu komórkowego, czyli zahamowania podziałów, stanowiący ochronę przed powstawaniem mutacji (Sabin i Anderson, 2011) (Stępień i wsp., 2007) (Okada i Mak, 2004).

Promieniowanie jonizujące, szczególnie w dużych dawkach, jest jednym z czynników wywołujących nekrozę. Nekroza jest bierną i patologiczną śmiercią komórkową. Podczas

nekrozy komórki pęcznieją i tracą ciągłość błony komórkowej. W wyniku depolaryzacji błony mitochondrium dochodzi do zaburzenia w transporcie elektronów czego konsekwencją jest istotny spadek ATP. Uszkodzeniom ulegają także, m.in. jądro komórkowe, retikulum endoplazmatyczne, polisomy i lizosomy. Zaburzenia ciągłości błony komórkowej prowadzą do biernego napływu wody i jonów, głównie wapnia i sodu do wnętrza komórki. W cytozolu, co jest charakterystyczne dla nekrozy, obecne są duże ilości jonów wapnia, napływających z zewnątrz oraz wypływających z retikulum endoplazmatycznego. Pod wpływem wzrostu stężenia jonów wapnia i sodu aktywowane są nukleazy, które tną DNA, a jądro komórkowe ulega dezintegracji. Pękające lizosomy uwalniają enzymy hydrolityczne, które niszczą także inne struktury komórkowe. Napęczniała komórka ulega rozpadowi, uwalniając całą jej zawartość do przestrzeni międzykomórkowej, co wiąże się z procesem zapalnym (Davila i wsp., 2018) (Boulton i wsp., 2013) (Stępień i wsp., 2007).

Autofagia jest mniej selektywnym mechanizmem programowanej śmierci komórkowej niż apoptoza. Białka o długim okresie półtrwania i inne składniki organelli są kierowane do lizosomów w celu degradacji. Wyróżnia się dwa typy autofagii, tj.: makroautofagię i mikroautofagię. Makroautofagia polega na formowaniu autofagosomu, który ulega fuzji z pierwotnym lizosomem, tworząc autofagolizosom. Utrzymuje homeostazę komórki poprzez usuwanie zbędnych i nieprawidłowych struktur komórkowych. Mikroautofagia to inwaginacja błony lizosomalnej prowadząca do inkorporacji komponentów cytoplazmatycznych (Wu i wsp., 2017) (Stępień i wsp., 2007) (Cuervo, 2004). Autofagia, obserwowana obok innych typów śmierci komórki po napromienieniu, jest głównie wynikiem uszkodzeń DNA. W przypadku nowotworów następuje spadek intensywności autofagii. Autofagia wywołana promieniowaniem jonizującym była opisywana w różnych typach nowotworów litych i hematologicznych (Kim i wsp., 2009) (Paglin i wsp., 2005). Wyniki innych badań, opisane przez Cuervo 2004 (Cuervo, 2004), świadczą, że autofagia może też zwiększać przeżywalność komórek poddanych działaniu promieniania jonizującego, poprzez eliminowanie uszkodzonych organelli.

3. Związki o działaniu radioochronnym

Radioprotektory są to związki o działaniu radioochronnym, których celem stosowania jest działania profilaktyczne w kierunku zmniejszenia skutków napromienienia

oraz zabezpieczenie nienowotworowych komórek przed uszkodzeniami spowodowanymi promieniowaniem podczas radioterapii klinicznej. Radioprotektory można podzielić na dwie grupy, tj. radioprotektory pochodzenia syntetycznego oraz naturalnego (Koukourakis, 2012).

Bardzo trudno dokonać jednoznacznej klasyfikacji związków o działaniu radioochronnym, ze względu na ich ogromne zróżnicowanie pod względem struktury oraz mechanizmów działania. W literaturze można znaleźć klasyfikacje według różnych kryteriów. W odniesieniu do zastosowania w radioterapii, związki o działaniu radioochronnym, ze względu na czas ich zastosowania, można podzielić na trzy grupy radioprotektory, „mitygatory” (ang. mitigators) oraz leki (Citrin i wsp., 2010) (Rycina 1). Radioprotektorami, wg tych kryteriów, określa się związki, które są podawane przed i w trakcie ekspozycji na promieniowanie. „Mitygatory” są związkami łagodzącymi podawanymi w trakcie napromieniania lub bezpośrednio po nim, w celu łagodzenia późnej toksyczności w tkankach prawidłowych (Citrin i wsp., 2010). Leki są podawane po zakończeniu serii napromieniania, w celu łagodzenia dolegliwości podczas leczenia oraz w celu poprawy jakości życia po zakończeniu radioterapii (Szejka i wsp., 2016) (Kuntić i wsp., 2013).

3.1. Radioprotektory

3.1.1. Syntetyczne radioprotektory – wybrane przykłady

Od połowy XX. wieku prowadzone są badania nad opracowaniem skutecznego związku radioochronnego. Zsyntetyzowano ponad 4400 związków (WRAMC w USA) zawierających w swej strukturze aminotiole. Najważniejszym z tej grupy syntetycznych radioprotektorów, zatwierdzonym do użytku klinicznego przez amerykańską Agencję do Spraw Żywności i Leków (Food and Drug Administration, FDA), jest amifostyna.

Amifostyna (2-[(3-aminopropyl) amino]ethylphosphorothioic amid, WR2721; ethiophos; Ethiol®) jest analogiem cystaminy. Amifostyna jest organicznym prolekiem tiofosforanowym, który ulega defosforylacji katalizowanej przez enzym fosfatazę alkaliczną z wytworzeniem wolnego tiolu. Powstaje aktywny metabolit o nazwie WR-1065 z grupą -SH stanowiącą miejsce aktywne cząsteczki, której działanie polega na usuwaniu wolnych rodników lub przekształcaniu ich w mniej toksyczne cząsteczki stabilne. Ze względu na znacznie wyższą zawartość fosfatazy alkalicznej w komórkach

prawidłowych niż w komórkach nowotworowych, WR1065 kumuluje się w prawidłowych komórkach (Kuntić i wsp., 2013). Chroni komórki prawidłowe, przede wszystkim poprzez neutralizację i eliminację ROS (zwłaszcza rodnika hydroksylogowego), poprzez zwiększanie aktywności dysmutazy ponadtlenkowej, reduktazy i peroksydazy glutationowej oraz katalazy, a także poprzez indukcję naprawy DNA. Mimo niekorzystnych skutków ubocznych, spośród których można wymienić, m.in. hipotensję (spadek ciśnienia tętniczego), nudności, zawroty głowy, czy rumień twarzy, amifostyna zmniejsza istotnie częstość występowania ostrej i późnej kserostomii (suchość błony śluzowej jamy ustnej z powodu uszkodzenia ślinianek) u chorych na raka głowy i szyi poddawanych radioterapii (Błasiak i wsp., 2002) (Kuntić i wsp., 2013).

Przykładami innych związków, zawierających siarkę, w innej formie niż tiole (ang. non-thiol radioprotectors), zsyntetyzowanych i zbadanych pod względem właściwości radioprotekcyjnych, są aminosulfidy, tiomocznik, tiosiarczany, tiofosforany, dietyloditiokarbaminiany i tiazole, w tym niektóre biogenne aminy i ich pochodne (Weiss i Landauer, 2009) (Kuntić i wsp., 2013).

Nitroksydy są kolejną grupą małowcząsteczkowych związków, które zyskują zwiększoną uwagę jako potencjalne środki lecznicze ze względu na ich właściwości przeciwutleniające i niską toksyczność. Największe znaczenie pod kątem zastosowania mają nitroksydy w formie związków o strukturze heterocyklicznej pięcio- lub sześcioczłonowe, charakteryzujące się obecnością grupy nitroksylowej z niesparowanym elektronem. Wykazano, że największy poziom radioochrony zapewniały nitroksydy, t.j.: Tempamina (4-amino-2,2,6,6-tetrametylopiperydyno-1-oksyl) i 3-karbamoilo-2,2,5,5-tetrametylopirolidyno-1-oksyl) oraz Tempol (4-hydroksy-2,2,6,6-tetrametylopiperydyno-1-oksyl) (Kuntić i wsp., 2013). Nitroksydy pełnią funkcję mimetyków dysmutazy ponadtlenkowej, ponieważ posiadają zdolność do katalizowania procesu dysmutacji anionorodnika ponadtlenkowego. Chronią komórki przed stresem oksydacyjnym, hamując peroksydację lipidów i zapobiegając uszkodzeniom DNA. Działanie radioochronne nitroksydów jest wybiórcze, ponieważ chronią tylko komórki prawidłowe, co może wynikać z szybkiej bioredukcji nitroksydu w warunkach hipoksji tkanki guza, a działanie radioochronne wykazują tylko nitroksydy, natomiast ich metabolity nie mają już takich właściwości (Maimona i wsp., 2018) (Tabaczar i wsp., 2011).

Przykładem kolejnego, badanego syntetycznego radioprotektora jest chlorowodorek tetracykliny, który wykazuje właściwości przeciwutleniające, wychwytuje rodniki

hydroksylowe indukowane promieniowaniem. Badania przeprowadzone na myszach C57BL/6 (Alok i Chaudhury, 2016), wykazały skuteczność radioprotekcyjną chlorowodoru tetracykliny, jednak doniesienia te wymagają potwierdzeń w kolejnych badaniach na modelach zwierzęcych (Alok i Chaudhury, 2016).

3.1.2. Radioprotektory pochodzenia naturalnego – wybrane przykłady

Przykładem związku o pochodzeniu naturalnym, badanego jako potencjalnego środka radioochronnego, jest hormon 5-androstendion. Hormon ten u człowieka jest wytwarzany przez korę nadnerczy i należy do grupy androgenów. Androstendion stymuluje mielopoiezę, podwyższając liczbę neutrofilii i płytek krwi. Hormon wykazuje silne działanie radioprotekcyjne i ma niską toksyczność, jednak wykazano problemy z drogą podawania leku. Skuteczność działania androstendionu jest niewielka po podaniu doustnym, a po iniekcji często występuje miejscowa odpowiedź (tj. obrzęk, ból, zaczerwienienie) (Kuntić i wsp., 2013) (Stickney i wsp., 2006). Natomiast oxymetholon, steroid anaboliczno-androgenowy, zapewnia dobry efekt ochronny po podaniu doustnym oraz wykazuje szeroki indeks terapeutyczny i niską toksyczność (Kuntić i wsp., 2013) (Stickney i wsp., 2006) (Singh i wsp., 2008).

Znaczący efekt radioprotekcyjny obserwuje się w przypadku witamin A, C i E (Kanachi i wsp., 2017) (Ramírez-Cahero i Valdivia-López, 2017) (Kuntić i wsp., 2013). Potwierdzono radioprotekcyjne działanie witaminy E (α - tokoferolu) i rozpuszczalnej w wodzie pochodnej - monoglukozydu tokoferolu (Singh i wsp., 2006) (Kuntić i wsp., 2013) (Kanachi i wsp., 2017), jak również bursztynianu α - tokoferolu, który indukuje wytwarzanie cytokin i powstawanie płytek krwi u myszy CD2F1 (Singh i wsp., 2006).

Wyniki wielu badań potwierdziły efekt radioprotekcyjny pochodnej tryptofanu, melatoniny (N-acetylo-5-metoksytryptamina). Melatonina zmiata ROS, głównie rodnik hydroksylowy, a także aniony nadtlenoazotynowe (Shirazi i wsp., 2013) (Pevet i wsp., 2017). Przeprowadzone próby terapii skojarzonej amifostyny z melatoniną, wykazały efekt ochronny przed indukowanymi przez promieniowanie uszkodzeniami DNA w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej *in vitro*, z uzyskaniem zwiększonego działania radioprotekcyjnego i zmniejszonej toksyczności (Kopjar i wsp., 2006).

3.1.3. Radioprotektory pochodzenia roślinnego - mechanizmy działania

Interesującą grupą związków o działaniu radioprotekcyjnym są substancje pochodzenia roślinnego, ponieważ w odróżnieniu od syntetycznych radioprotektorów (m.in. tiolowych) są mniej toksyczne, a dzięki temu bezpieczniejsze, a także są tańsze w pozyskaniu. Przede wszystkim związki pochodzenia roślinnego charakteryzują się różnorodnością mechanizmów działania, zwykle dłuższym okresem półtrwania w porównaniu z syntetycznymi i wykazują akceptowalny profil stabilności (Arora i wsp., 2005).

Związki roślinne wpływają na cały organizm człowieka wykazując wiele różnych właściwości biologicznych, które mogą być istotne z punktu widzenia radioochrony, t.j.: działanie przeciwzapalne, przeciwbakteryjne, przeciwmutagenne, immunostymulacyjne, czy przeciwwymiotne (Arora i wsp., 2005) (Kuntić i wsp., 2013). Dobrymi przykładami związków roślinnych o różnorodnym działaniu i właściwościach radioochronnych są: kwasy fenolowe (w tym kwasy hydroksybenzoesowe i hydroksycynamonowe i ich pochodne), flawonoidy (flawony, flawonole, flawanony, flawanole, izoflawony, antocyjany), stilbeny, taniny, czy lignany (Arora i wsp., 2005) (Jagetia, 2007) (Hosseinimehr, 2010) (Fischer i wsp., 2017) (George i wsp., 2017).

Głównym mechanizmem radioochronnego działania większości substancji roślinnych jest ich aktywność antyoksydacyjna. Związki te zmiatają reaktywne formy tlenu powstające podczas radiolizy wody, a także różnorodne rodniki wtórne generowane przez promieniowanie jonizujące. Przykładami związków syntetyzowanych przez rośliny o właściwościach antyoksydacyjnych są m.in.: związki azotowe, pochodne chlorofilu, związki fenolowe, cukry, lipidy i fosfolipidy, hormony, witaminy np. hydrofobowe tokoferole i karotenoidy lub rozpuszczalny w wodzie kwas askorbinowy (Fischer i wsp., 2017) (Szejka i wsp., 2016). Związki roślinne chronią DNA zapobiegając głównie pośrednim skutkom promieniowania, poprzez zmiatanie rodnika hydroksylowego i innych ROS. Flawonoidy, polisacharydy, kofeina wpływają na zmniejszenie liczby uszkodzeń DNA (SSBs i DSBs, modyfikacje oksydacyjne zasad azotowych) po napromieniowaniu (Hosseinimehr, 2010) (Fischer i wsp., 2017). Polifenole zwiększają ekspresję genów kodujących enzymy naprawy DNA (m.in. glikozylaz DNA) zwiększają tym efektywność naprawy uszkodzeń DNA indukowanych przez promieniowanie jonizujące (Arora i wsp., 2005). Niektóre substancje polifenolowe, np. kwercetyna, katechina, rutyna, wykazują aktywność antyoksydacyjną pośrednio, poprzez chelatowanie jonów metali przejściowych (zapobieganie reakcji Fentona i Habera Weissa), zmniejszając odsetek uszkodzeń DNA

i modyfikacji oksydacyjnych białek oraz lipidów wywołanych promieniowaniem jonizującym. Polifenole roślinne wspomagają też komórkowy system obrony antyoksydacyjnej poprzez podnoszenie poziomu zredukowanego glutationu (GSH) i ochronę aktywności enzymów antyoksydacyjnych, m.in. indukując wzrost ekspresji genów dla enzymów antyoksydacyjnych i utrzymanie ich stałego poziomu (Hosseinimehr, 2010) (Arora i wsp., 2005) (Jagetia, 2007) (Maurya i wsp., 2006). Odpowiednie stężenie GSH w komórkach umożliwia utrzymanie równowagi redoks. Związki fenolowe biorą udział w regulacji wielu szlaków sygnalizacyjnych związanych z toksycznością popromienną, m.in. hamują szlak sygnałowy zależny od czynnika NF- κ B (ang. nuclear factor κ B), czynnika transkrypcyjnego wrażliwego na stres oksydacyjny oraz związane z nim szlaki sygnałowe uczestniczące w inicjacji procesów zapalnych (np. szlak zależny od MAPK/ERK, czy PI3K/Akt) (Hussain i wsp., 2016). Związki roślinne mogą także hamować ekspresję niektórych genów, które są odpowiedzialne za indukcję uszkodzeń popromiennych, np. cytochromu P-450, kinazy białkowej C (PKC), kinaz aktywowanych miogenami (MAPK) i innych genów (Jagetia, 2007) (Szejka i wsp., 2016) (Yun i Wang, 2017).

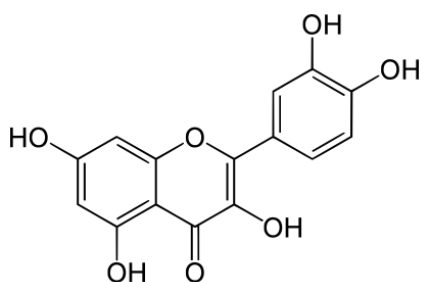
W radioterapii oprócz stosowania radioprotektorów, równie istotną strategią może być użycie radiouczulaczy, czyli związków, które zwiększałyby radioczułość komórek nowotworowych (przeciwdziałanie radiooporności). Wykazano, że związki, tj. kwercetyna, apigenina i genisteina zwiększają promienioczułość hepatocytów (w obecności tych związków obserwowano większą śmiertelność hepatocytów indukowaną promieniowaniem). Efekt ten może wynikać z inhibicji topoizomerazy II, enzymu zaangażowanego w replikację, transkrypcję i naprawę DNA (Raviraj i wsp., 2014). W literaturze jest wiele przykładów potwierdzających radiouczulające działanie polifenoli w różnych liniach komórek nowotworowych (Fang i wsp., 2013) (Lin i wsp., 2012) (Hosseinimehr i Hosseini, 2014) (Hillmam i Singh-Gupta, 2011). Wykazano, że resweratrol wzmacniał śmierć komórek raka tarczycy indukowaną przez radioaktywny jod (I^{131}), natomiast polifenol ten chronił przed cytotoksycznością jodu fibroblasty skóry (linia nie nowotworowa HFFF2) (Hosseinimehr i Hosseini 2014). Resweratrol jest także czynnikiem uczulającym na promieniowanie komórki czerniaka SK-Mel-5 i HTB-65 poprzez hamowanie proliferacji i promowanie apoptozy (Fang i wsp. 2013). Badania *in vitro* oraz *in vivo* wykonane przez Lin i wsp. dowiodły, że kwercetyna uwrażliwia na działanie promieniowania zmniejszając przeżywalność komórek raka jelita grubego DLD1, raka szyjki macicy HeLa i raka piersi MCF-7, poprzez hamowanie aktywności kinazy

ATM, jednego z kluczowych białek odpowiedzialnych za reakcje na uszkodzenia DNA (Lin i wsp., 2012). Izoflawony sojowe hamują szlaki sygnalizacyjne niezbędne dla przeżycia komórek raka prostaty, poprzez zmienioną aktywację APE1/Ref-1, NF- κ B i HIF-1 α , blokując naprawę DNA indukowaną podczas radioterapii (Hillman i Singh-Gupta, 2011).

3.1.4. Radioprotektory pochodzenia roślinnego - wybrane przykłady

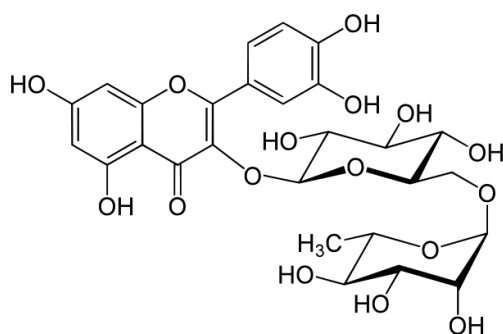
Wiele scharakteryzowanych ekstraktów oraz substancji o działaniu radioochronnym pochodzi z roślin endemicznych występujących na terenach Azji i Ameryki Południowej, związki te znajdują liczne zastosowania w medycynie chińskiej i ajurwedycznej (Szejka i wsp., 2016). Dobrymi przykładami związków o udowodnionych właściwościach radioprotekcyjnych są związki o strukturze fenoli oraz polisacharydy, powszechnie występujące w roślinach jadalnych i leczniczych, tj.: kwercetyna, rutyna, kwas chlorogenowy, kurkumina, galusan epigallokatechiny, czy β -glukan.

Kwercetyna (3,5,7,3',5' pentahydroksy flawon) jest organicznym wielopierścieniowym związkiem aromatycznym, należącym do grupy flawonoli, występującym w owocach i warzywach, m.in. w jabłkach, cebuli czy czosnku (Lin i wsp., 2012) (Fischer i wsp., 2017). Kwercetyna wykazuje właściwości antybakteryjne, antywirusowe, antynowotworowe i przeciwzapalne (Lin i wsp., 2012) (Bonechi i wsp., 2018) oraz radioochronne (Benkovic, 2009) (Manzoli i wsp., 2015) (Horton i wsp., 2013). Wyniki badań wykazały, że kwercetyna wykazuje niską genotoksyczność i zmniejsza liczbę uszkodzeń DNA leukocytów po napromienieniu (Benkovic, 2009). Badania Manzolii i wsp. wykazały, że kwercetyna zmniejsza fosforylację γ -H2AX i białka p53 w komórkach ludzkiego włókniakomięsa HT1080 (Manzoli i wsp., 2015). Kwercetyna redukuje zwłóknienie skóry, które jest późnym skutkiem napromieniania. U samic myszy C3H/ HeN kwercetyna zmniejszyła przykurcze kończyn tylnych oraz zmniejszyła gromadzenie się kolagenu i ekspresję TGF- β w napromienionej skórze (Horton i wsp., 2013).



Rycina 4. Wzór strukturalny kwercecytyny

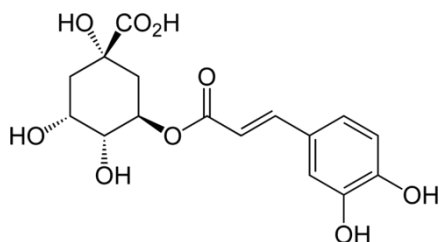
Rutyna należy do grupy glikozydów flawonoidowych, jest glikozydem kwercecytyny. Pozyskiwana jest z kwiatów perłkowca japońskiego (*Styphnolobium japonicum*) i z ziela gryki (*Fagopyrum esculentum*). Rutyna występuje w wielu owocach i warzywach, m.in. aroni czarnej, eukaliptusie, szczawiu oraz w wysokim stężeniu w fiołku trójbarwnym (*Viola tricolor*) (Fischer i wsp., 2017). Rutyna wykazuje właściwości przeciwkrotoczne, przeciwzapalne (Bonechi i wsp., 2018) oraz radioochronne (Sunada i wsp., 2014) (Patil i wsp., 2014). Monoglukozyd rutyny, który jest lepiej rozpuszczalny w wodzie niż rutyna, w niskich stężeniach (0,3%) zwiększa przeżywalność komórek CHO10B2 po napromienieniu, wykazano też jego zdolność do hamowania powstawania wolnych rodników (Sunada i wsp., 2014). Doustne podawanie kombinacji rutyny (10 mg /kg masy ciała) i kwercecytyny (20 mg /kg masy ciała) myszom rodzaju szwajcarskich albinosów przez 5 dni przed napromienianiem całego ciała (3 Gy) zmniejszyło redukcję polichromatycznych i normochromatycznych erytrocytów (Patil i wsp., 2014).



Rycina 5. Wzór strukturalny rutyny

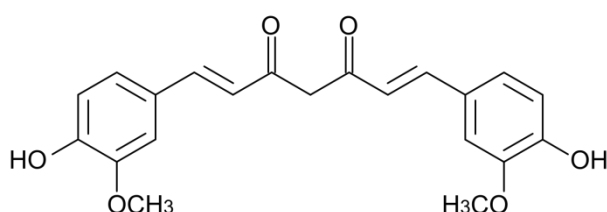
Kwas chlorogenowy jest estrem kwasu chinowego i kwasu kawowego, należy do grupy kwasów hydroksycynamonowych. Występuje, m.in. w sałacie, pomidorach, głogu, liściach i owocach kawowca. Wyniki badań przeprowadzonych przez Cinkilic

i wsp. (Cinkilic i wsp., 2013) wskazują, że kwas chlorogenowy jest skutecznym radioprotektorem, ponieważ chroni nienowotworowe limfocyty ludzkie przed szkodliwym działaniem promieniowania rentgenowskiego. Kwas chlorogenowy wykazuje właściwości antyoksydacyjne, zmiata ROS, chelatuje jony metali przejściowych, zmniejsza indukcję wolnych rodników, m.in. poprzez hamowanie aktywności oksydazy ksantynowej (Cinkilic i wsp., 2013) (Kołodziejczyk-Czepas i wsp., 2015).

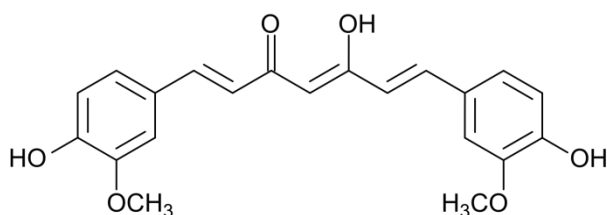


Rycina 6. Wzór strukturalny kwasu chlorogenowego

Kurkumina jest polifenolem zbudowanym z dwóch reszt feruloilowych połączonych atomem węgla. Stosowana jest jako barwnik spożywczy, m.in. składnik curry. Występuje w kłączach *Curcuma longa* (Ostryż długi). Kurkumina wykazuje działanie antyproliferacyjne, ponieważ zatrzymuje cykl komórkowy w fazie S/G2M. Badania na myszach wykazały, że podanie kurkuminy (100 mg/kg masy ciała) przed napromienianiem dawką 2-8 Gy, znacznie przyspiesza procesy gojenia się ran (Akpolat i wsp., 2009). Podanie zwierzętom kurkuminy przed lub po napromienianiu zmniejszało poziom aberracji chromosomowych, stres oksydacyjny i związane z nim uszkodzenia hepatocytów oraz zaobserwowano wzrost stężenia GSH i GSH-Px (Tawfik i wsp., 2013). Kurkumina posiada właściwości antyoksydacyjne, antynowotworowe i przeciwzapalne, nie wykazuje genotoksyczności oraz może redukować poziom uszkodzeń DNA oraz hamować peroksydację lipidów (Tawfik i wsp., 2013).

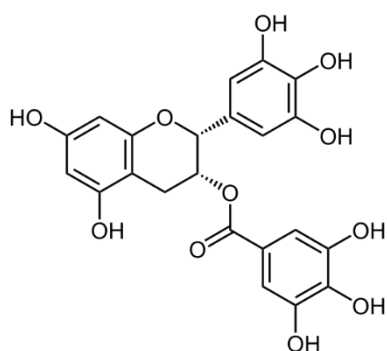


Rycina 7 A. Wzór strukturalny kurkuminy, forma ketonowa



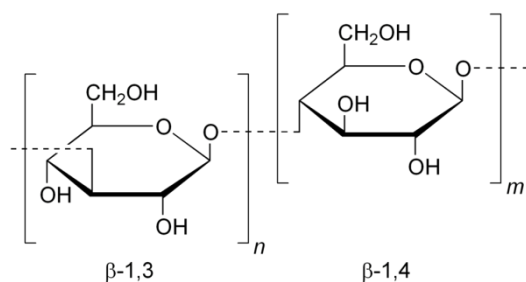
Rycina 7 B. Wzór strukturalny kurkuminy, forma enolowa

Galusan epigallokatechiny (EGCG), jest polifenolem z grupy flawonoidów, wchodzącym w skład zielonej herbaty (*Camellia sinensis*), jest estrem kwasu galusowego i epigallokatechiny. EGCG jest antyoksydantem, który zmiata ROS i zapobiega translokacji jądrowego NF- κ B (Das i wsp., 2013). Badania wykazały, że podanie dootrzewnowe EGCG przed napromienianiem samców zwierząt doświadczalnych (myszy), istotnie zmniejszało poziom stresu oksydacyjnego w jądrach samców i chroniło plemniki przed szkodliwym działaniem promieniowania, natomiast dłuższe podawanie EGCG (przez 21 dni) stymulowało spermatogenezę (Ding i wsp., 2015).



Rycina 8. Wzór strukturalny galusanu epigallokatechiny

Polisacharyd β -glukan, składnik budulcowy ścian komórkowych drożdży, grzybów i zbóż, wykazuje działanie immunomodulujące, antyoksydacyjne, zapewniając silną ochronę radiologiczną. Stymuluje endogenne wytwarzanie cytokin (interleukiny IL-1 i IL 6). Zwiększa liczbę komórek szpiku kostnego, neutrofilii, limfocytów i płytek krwi u myszy poddanych napromienianiu (Shah i wsp., 2015) (Kuntić i wsp., 2013).



Rycina 9. Wzór strukturalny β -glukanu (β -1,3/1,4-glukan)

3.2. „Mitygatory”- wybrane przykłady

„Mitygatory” mają na celu łagodzenie objawów późnej toksyczności w komórkach prawidłowych, zanim pojawią się objawy kliniczne. Do „mitygatorów” zaliczane są substancje o zróżnicowanych mechanizmach działania, takie jak czynniki wzrostu, enzymy i inhibitory aktywności enzymatycznej, związki modulujące szlaki przekazywania sygnałów oraz substancje o działaniu przeciwutleniającym.

Do grupy tej należy, m.in. inhibitor proteazowy Bowmana-Birka, stosowany jako czynnik przeciwzwłóknieniowy i chemioprewencyjny, który stymuluje procesy naprawy DNA (Dittman i wsp., 2005).

Kolejna grupa „mitygatorów” to substancje zaliczane do niesteroidowych leków przeciwzapalnych (np. celecoxib, kwas acetylosalicylowy, ibuprofen), które hamują aktywność cyklooksygenazy 2 (COX-2) i ograniczają syntezę prostaglandyn po napromienianiu oraz łagodzą stany zapalne błony śluzowej (Laube i wsp., 2016) (Szejka i wsp., 2016) (Kuntic i wsp., 2013) (Dittmann i wsp., 2005).

Natomiast inne „mitygatory”, t.j.: kaptopryl, enalapril i ramipril aktywują inhibitory konwertazy angiotensynowej, czyli hamują tworzenie angiotensyny II z angiotensyny I. Regulują objętość i ciśnienie krwi przez układ renina-angiotensyna-aldosteron. Ich działanie polega na zapobieganiu popromiennej nefropatii, neuropatii nerwu wzrokowego oraz zapaleniu płuc (Cohen i wsp., 2003) (Wu i Zeng, 2009) (Saavedra, 2017).

Dostępne są również „mitygatory” odpowiedzialne za detoksykację i antyoksydacyjną ochronę organizmu, do których należy oltipraz, pochodna ditiolotionu (5- (2-pirazynylo) - 4-metylo-1,2-ditiolo-3-tion). Oltipraz działa jako induktor enzymów II fazy, a także wykazuje działanie chemioprewencyjne, ponieważ zwiększa stężenie małych cząsteczkowych tioli w komórkach i stymuluje ekspresję indukowalnej S-transferazy

glutationowej oraz mikrosomalnej hydrolazy epoksydowej (Miao i wsp., 2003).

Genisteina jest izoflawonoidem czyli „mitygatorem” pochodzenia naturalnego o właściwościach inhibitorów kinaz tyrozynowych, ma działanie antyoksydacyjne i chemioprewencyjne (Jackson i wsp., 2017) (Grace i wsp., 2007).

Z kolei statyny działają jako inhibitory reduktazy 3-hydroksy-3-metyloglutarylo-koenzymu A (reduktaza HMG-CoA), hamują kaskadę białka RhoCCN2/macierz zewnątrzkomórkowa. Białka Rho odpowiadają, m.in. za reorganizację cytoszkieletu komórki i tworzenie połączeń międzykomórkowych, CCN2 są białkami międzykomórkowego przekazywania sygnałów. Statyny blokują przekazywanie sygnału tym szlakiem i zmniejszają częstość występowania enteropatii popromiennych oraz hamują proces zwłóknienia płuc (Haydont i wsp., 2007).

„Mitygatory” t.j. halofuginon, 1D11 (przeciwciała anty-TGF- β) i SM16 (small molecule TGF- β signalling inhibitor) są inhibitorami szlaków zależnych od transformującego czynnika wzrostu TGF- β , które ograniczają procesy zwłóknienia płuc (Szejka i wsp., 2016).

Część doświadczalna

4. Cel pracy

Celem pracy była ocena czy preparaty roślinne o strukturze glikokoniugatów polifenolowych (ang. polyphenolic glycoconjugates; PGs) i ich aglikony, wyizolowane z wybranych roślin leczniczych z rodziny *Rosaceae* oraz *Asteraceae*, wykazują właściwości radioochronne *in vitro*, a także wyjaśnienie mechanizmów ich działania.

Zadania badawcze obejmowały:

1. ocenę cytotoksyczności PGs i ich aglikonów wobec fibroblastów mysich L929 oraz komórek jednojądrzastych krwi obwodowej człowieka (ang. peripheral blood mononuclear cells; PBMC)
2. określenie udziału PGs i ich aglikonów w ochronie komórek jednojądrzastych krwi obwodowej oraz elementów osocza krwi człowieka przed indukowanymi promieniowaniem gamma:
 - stresem oksydacyjnym
 - genotoksycznością
 - apoptozą
3. określenie wpływu wybranych PGs na indukowany promieniowaniem gamma stres oksydacyjny oraz apoptozę komórek białaczkowych linii K562

5. Materiał i metody

5.1. Materiał

Materiał biologiczny do badań stanowiły:

- krew pełna pobrana do zestawu z antykoagulantem CPD (cytrynian trisodowy, fosforan, glukoza) oraz świeżo mrożone osocze, uzyskiwane od zdrowych dawców z Regionalnego Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Łodzi; z krwi pełnej izolowano komórki jednojądrzaste,
- fibroblasty mysie linii L929, które są standardowymi i uznanymi międzynarodowo komórkami, służącymi do oceny cytotoksyczności *in vitro* wyrobów medycznych; komórki linii L929 zakupiono w European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC),
- komórki ludzkiej przewlekłej białaczki szpikowej linii K562, zakupione w American Type Culture Collection (ATCC).

Preparaty roślinne do przeprowadzonych badań stanowiły:

- PGs oraz ich aglikony, uzyskane z Zakładu Chemii Medycznej i Mikrobiologii Politechniki Wrocławskiej, wyizolowane oraz scharakteryzowane pod względem chemicznym, w ramach współpracy, przez tę jednostkę naukową; preparaty roślinne otrzymano w postaci liofilizatów.

PGs oraz ich aglikony pochodziły z wybranych czterech gatunków roślin:

- z rodziny *Rosaceae*:
 - z kwiatostanów krwiściągu lekarskiego – *Sanguisorba officinalis L.*,
 - z liści poziomki pospolitej – *Fragaria vesca L.*,
 - z liści jeżyny fałdowanej – *Rubus plicatus Whe. et N. E.*,
- z rodziny *Asteraceae*:
 - z kwiatostanów przymiotna kanadyjskiego – *Erigeron canadensis L.*

Sposób otrzymywania preparatów roślinnych został opatentowany przez Politechnikę Wrocławską (patent 216635, o udzieleniu patentu ogłoszono 30.04.2014).

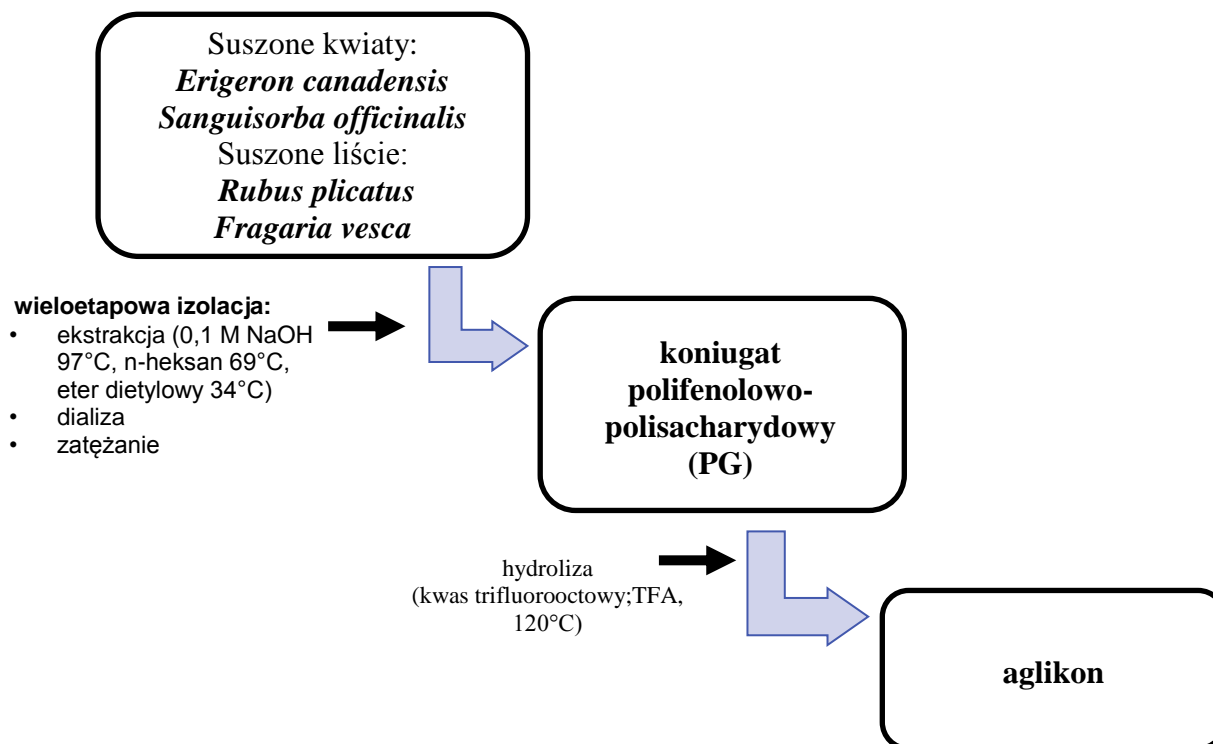
Ich zastosowanie w ochronie przed promieniowaniem jonizującym jest przedmiotem zgłoszenia patentowego (No. P.412248, 6.05. 2015).

5.1.1. Izolacja i charakterystyka chemiczna preparatów roślinnych

Preparaty roślinne oraz ich charakterystykę chemiczną, w ramach współpracy, uzyskano z Zakładu Chemii Medycznej i Mikrobiologii Politechniki Wrocławskiej. Z uwagi na fakt, że izolacja i charakterystyka chemiczna preparatów roślinnych nie były wykonywane w ramach pracy doktorskiej zagadnienia te zostały opisane w bardzo skróconej formie.

Suszone kwiaty *Sanguisorba officinalis* L. (voucher No. 004990) i *Erigeron canadensis* L. (Voucher No. 019361), pochodziły z roślin zebranych z typowych siedlisk naturalnych występujących na terenie Dolnego Śląska, natomiast suszone liście *Fragaria vesca* L. (voucher No. 004954) oraz *Rubus plicatus* Whe. et N. E. (voucher No. 013914) zakupiono w miejscowym sklepie. Tożsamość roślin została poświadczona przez prof. dr hab. Krystynę Kromer i mgr inż. Jolantę Kochanowską z Ogrodu Botanicznego Uniwersytetu Wrocławskiego, a pozyskane okazy zielne zostały zdeponowane w Ogrodzie Botanicznym we Wrocławiu.

Glikokoniugaty polifenolowe były izolowane zgodnie z metodą opracowaną, opatentowaną (Gancarz i wsp, Patent RP No 216 635) i opublikowaną przez zespół prof. Romana Gancarza i dr Izabeli Pawlaczyk-Graja (Pawlaczyk i wsp., 2011) (Pawlaczyk, 2009). Ogólny schemat izolowania PGs i ich aglikonów przedstawiono na Rycinie 10.



Rycina 10. Schemat izolowania PGs i ich aglikonów (Gancarz i wsp, Patent RP No 216 635) (Pawlaczyk i wsp., 2011) (Pawlaczyk, 2009).

Suszone części kwiatów lub liści (250 g), po zmieleniu zawieszano w 0,1 M NaOH i pozostawiano w temperaturze pokojowej na 24 godz., po czym mieszaninę ogrzewano przez 6 godz. (97°C). Po odwirowaniu (1900 x g, 15 min), osad usuwano, a supernatant zubożniano za pomocą 1 M HCl, zateżano do mniejszej objętości i 2-krotnie przeprowadzano ekstrakcję z użyciem n-heksanu (frakcja rozpuszczalna w wodzie: n - heksan 1:1, v/v) w ciągu 6 godz. (69°C), a następnie 3-krotnie eterem dietylowym (frakcja rozpuszczalna w wodzie: eter dietylowy 1:1, v/v) przez 6 godz. (34°C). Z pozostałego roztworu wodnego odparowywano frakcję wodną w wyparce obrotowej pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość, o konsystencji pasty, zawieszano w 4 litrach metanolu i mieszano przez 24 godz. w temperaturze pokojowej, a na koniec odsączano na lejku Buchnera. Otrzymany osad suszono w temperaturze pokojowej, następnie rozpuszczano w wodzie destylowanej i dializowano wobec wody przez 5 dni (punkt odcięcia dla błony dializacyjnej Spectra/Por 4 Dialysis Membrane wynosił 12 000-14 000 Da), po czym retentat zateżano pod zmniejszonym ciśnieniem.

Analizę chemiczną preparatów wyizolowanych z *Sanguisorba officinalis*, *Erigeron*

canadensis, *Fragaria vesca* i *Rubus plicatus* wykonano w zespole Pawlaczyk i wsp., (Pawlaczyk i wsp., 2009) (Pawlaczyk i wsp., 2011) (Pawlaczyk i wsp., 2012). Zawartość węglowodanów oznaczano metodą Dubois z użyciem fenolu i kwasu siarkowego (Dubois i wsp., 1956), jako wzorzec do przygotowania krzywej kalibracyjnej stosowano roztwór glukozy. Zawartość kwasów heksuronowych oznaczano w reakcji z karbazolem (Dische, 1947), stosując kwas galakturonowy jako związek referencyjny. Stężenie fenoli oznaczano metodą Folin-Ciocalteu, z zastosowaniem kwasu galusowego jako standardu (Singleton i wsp., 1999). Zawartość białka oznaczano metodą Lowry'ego (Lowry i wsp., 1951), stosując jako związek wzorcowy albuminę bydlęcą. Wszystkie pomiary kolorymetryczne wykonywano na aparacie UV-VIS Spektrofotometr 1800 (Shimadzu, Japan). Glikokoniugaty roślinne poddawano hydrolizie przy użyciu 2 M kwasu trifluorooctowego w ciągu 3 godzin, w temperaturze 120°C (uzyskanie aglikonu). Po kwasowej hydrolizie substancji roślinnych zawartość poszczególnych monosacharydów w kwaśnym hydrolizacie oznaczano na podstawie stężenia ich acetylowanych pochodnych, to jest octanów alditoli powstających po redukcji borowodorkiem sodu według metody Bierrmann i McGinnis 1989 (Bierrmann i McGinnis, 1989), z zastosowaniem chromatografii gazowo-cieczowej i spektrometrii mas, przy użyciu chromatografu Hewlett-Packard model 5891A Series II, wyposażonego w kolumnę HP-1 (0,22 mm x 25 m), stosując program w zakresie temperatur 150 - 250°C (8 °C/min) do 270°C).

Wszystkie cztery glikokoniugaty polifenolowe są substancjami wielkocząsteczkowymi (>12 kDa), stanowiącymi tylko około 0,9-2,0% wyjściowej masy suchego materiału roślinnego (Tabela 1). Są to ciemnobrązowe substancje, rozpuszczalne w wodzie oraz w roztworach alkalicznych, nierozpuszczalne w rozpuszczalnikach organicznych, takich jak metanol, etanol, aceton, chloroform, eter dietylowy i heksan, z wyjątkiem DMSO (Pawlaczyk i wsp, 2011) (Pawlaczyk i wsp., 2009). Oznaczony skład chemiczny części polisacharydowej badanych preparatów oraz całkowitą zawartość fenoli przedstawiono w Tabeli 1.

Tabela 1. Wydajność, całkowita zawartość fenoli oraz skład części polisacharydowej (Zbikowska i wsp., 2016)

Nazwa rośliny	Wydajność w procesie oczyszczania (% wagowy)	Wydajność części polisacharydowej (% wagowy)	Zawartość octanów alditoli dla poszczególnych monocukrów, oznaczonych metodą GLC-MS (% wagowy)						UA (% wagowy)	Zawartość białka (% wagowy)	Zawartość fenoli [mM]
			Rha	Ara	Xyl	Man	Glc	Gal			
<i>Fragaria vesca</i>	1,4	15,2	10,0	6,8	1,4	0,9	8,6	19,3	53,0	0,4	1,06
<i>Rubus plicatus</i>	2,0	8,0	2,4	9,8	1,1	2,9	25,8	16,1	41,9	1,0	1,55
<i>Erigeron canadensis</i>	0,9	34,1	0,9	9,4	1,6	2,4	10,8	4,5	70,4	1,2	1,66
<i>Sanguisorba officinalis</i>	1,8	21,0	4,5	11,1	0,1	1,4	3,6	8,8	70,5	0,7	1,37

UA - zawartość kwasów heksuronowych w mieszaninie cukrów prostych. Zawartość fenolu w częściach fenolowych analizowanej substancji roślinnej, wyrażona jako równoważnik kwasu galusowego. Zawartość fenoli wyrażona jako mM ekwiwalentu kwasu galusowego w 1 g preparatu roślinnego [GAE]. Ara – arabinoza; Xyl – ksyloza; Man – mannoza; Glc – glukoza; Gal – galaktoza

Największą zawartość cząsteczek UA, bogatych w karboksylowe grupy funkcyjne, stwierdzono w preparatach wyizolowanych z *Erigeron canadensis* (70,4%) i *Sanguisorba officinalis* (70,5%). Analiza GLC-MS węglowodanowych fragmentów wszystkich badanych preparatów wykazała, że oprócz heksoz, takich jak Glc (glukoza), Gal (galaktoza) i Man (mannoza), w otrzymanym materiale roślinnym obecne są również inne cukry proste, typowe dla kwaśnych polisacharydów ścian komórkowych roślin wyższych, takie jak Ara (arabinoza), Rha (ramnoza), i Xyl (ksyloza) (Côté i Hahn, 1994). Fragment węglowodanowy w preparacie z *Fragaria vesca* może stanowić polisacharyd typu ramno-galakto-uronian, na co wskazuje wysoka zawartość Rha i Gal (10,0 i 19,3%, odpowiednio). W przypadku preparatu z *Rubus plicatus* część węglowodanową może stanowić arabino-gluko-galakturonian, ze względu na obecność dużych ilości tych monosacharydów (25,8% Glc i 9,8% Ara), podobnie jak w przypadku preparatu otrzymanego z *Erigeron canadensis* (10,8% Glc i 9,4% Ara). Natomiast skład fragmentu węglowodanowego oznaczony dla preparatu uzyskanego z *Sanguisorba officinalis* sugeruje obecność arabino-galakt-uronianu, ze względu na wysoką zawartość Ara (11,1%).

Jak wynika z przeprowadzonych analiz, każdy z badanych preparatów roślinnych zawiera w swojej części węglowodanowej znaczną ilość Gal, co jest typowe dla pektyn bogatych w kwasy heksuronowe, głównie kwas galakturonowy (Côté i Hahn, 1994).

Wynik wskazujący na obecność białka w badanych preparatach (zakresie 0,4-1,2% wagowych) (Tabela 1) może wynikać z interferencji związków fenolowych zawartych w preparatach roślinnych z odczynnikiem Lowry'ego, a nie z faktu występowania białek w badanym materiale (Lindeboom i Wanasundara, 2007).

W skład części polifenolowej wybranych do badań preparatów roślinnych wchodzi, m.in. związki zawierające w swojej strukturze pierścień fenolu (kwas hydroksybenzoesowy, kwas kumarowy), pierścień gwajakolu (gwajakol, pochodne eugenolu, wanilina, kwas wanilinowy, kwas ferulowy i dihydroferulowy), czy pierścień syryngolu (syryngol, metylo- i propenylosyryngol, kwas syryngowy) (Tabela 2A, B, C). Największą zawartość związków o strukturze fenoli stwierdzono w PGs z *Fragaria vesca* i *Rubus plicatus*, PG z *Eigeron canadensis* charakteryzuje się największą zawartością związków o strukturze gwajakolu, natomiast największą zawartość związków o strukturze syryngolu posiada PG z *Sanguisorba officinalis* (Szejka i wsp., 2017).

Tabela 2. Względna zawartość monomerycznych pochodnych fenolowych uwalnianych podczas pirolitycznej metylacji glikokoniugatów polifenolowych (wyrażona jako procent sumy związków uzyskanych z chromatogramu całkowitego prądu jonowego GC/MS)

Tabela 2A

Nazwa związku	Grupa funkcyjna w podjednostce strukturalnej	Źródło glikokoniugatów polifenolowych			
		<i>Erigeron canadensis</i>	<i>Sanguisorba officinalis</i>	<i>Rubus plicatus</i>	<i>Fragaria vesca</i>
Związki o strukturze fenoli [%]					
fenol	-H	3,13		4,50	12,88
4-metylofenol	-CH ₃	4,99	4,18	4,88	12,11
4-winylofenol	-CH=CH ₂	1,62	1,43	3,99	7,36
4-etylofenol	-CH ₂ -CH ₃	1,85	0,72	2,28	5,26
4-hydroksybenzaldehyd	-COH				1,41
4-hydroksyacetofenon	-CO-CH ₃	3,14		2,28	
kwas 4-hydroksybenzoesowy	-COOH	2,09		4,55	5,92
kwas 4-hydroksyfenylooctowy	-CH ₂ -COOH			3,77	
kwas p-kumarowy	-CH=CH-COOH	2,66		3,57	3,46
kwas 3-(4-hydroksyfenylo)propionowy	-CH ₂ -CH ₂ -COOH		0,85		
Suma		19,48	7,18	29,82	48,40

Tabela 2B

Nazwa związku	Grupa funkcyjna w podjednostce strukturalnej	Źródło glikokoniugatów polifenolowych			
		<i>Erigeron canadensis</i>	<i>Sanguisorba officinalis</i>	<i>Rubus plicatus</i>	<i>Fragaria vesca</i>
Związki o strukturze gwajakolu [%]					
gwajakol	-H	8,82		18,96	4,12
4-metylogwajakol	-CH ₃	4,18	15,77	10,54	15,58
4-winylogwajakol	-CH=CH ₂	4,24		2,83	5,35
4-etylogwajakol	-CH ₂ -CH ₃	2,11			
<i>trans</i> -izoeugenol	-CH=CH-CH ₃	6,37	6,91	0,94	
4-propylogwajakol	-CH ₂ -CH ₂ - CH ₃		6,42		5,23
wanilina	-COH		1,98	1,13	1,77
alkohol wanilinowy	-CH ₂ -OH			0,54	
acetogwajakol	-CO-CH ₃	3,06	5,82	4,34	1,04
kwas wanilinowy	-COOH	3,16	4,21	8,09	6,25
kwas homowanilinowy	-CH ₂ -COOH			1,13	2,00
kwas ferulowy	-CH=CH- COOH	38,93		4,17	1,41
kwas dihydroferulowy	-CH ₂ -CH ₂ - COOH	1,15			
Suma		72,02	40,57	52,67	42,75

Tabela 2C

Nazwa związku	Grupa funkcyjna w podjednostce strukturalnej	Źródło glikokoniugatów polifenolowych			
		<i>Erigeron canadensis</i>	<i>Sanguisorba officinalis</i>	<i>Rubus plicatus</i>	<i>Fragaria vesca</i>
Związki o strukturze syringolu [%]					
syringol	-H	4,10	8,13	7,63	4,46
4-metylosyringol	-CH ₃	2,04	20,02		
4-(1-propenilo)-syringol	-CH=CH-CH ₃	1,06			
kwas syringowy	--COOH	1,30	24,10	9,88	4,39
Suma		8,50	52,25	17,51	8,85

5.2. Odczynniki

- Sigma-Aldrich, St. Louis, MO USA: ABTS (ang. 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid; kwas 2,2'-azino-bis(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonowy), Trolox (kwas 6-hydroksy-2,5,7,8-tetrametylchroman-2-karboksyłowy), kwercetyna, rutyna, DMSO (ang. dimethyl sulfoxide; dimetylosulfotlenek), DTNB (ang. 5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid); kwas 5,5-ditio-bis-(2-nitrobenzoesowy)), TBA (ang. thiobarbituric acid; kwas barbiturowy), RPMI 1640 (ang. Roswell Park Memorial Institute medium; medium wzrostowe) bez glutaminy, DAPI (ang. 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride; dichlorowodorek 4',6-diamidyno-2-fenylindolu), H2DCFDA (ang. 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate; dioctan 2', 7'-dichlorodihydrofluoresceina), agarozą LMP (ang. low melting point; niska temperatura topnienia) i NMP (ang. normal melting point; normalna temperatura topnienia), błękit trypanu, Triton X-100, Histopaque-1077, GSH (ang. glutathione; zredukowany glutation), nadsiarczan potasu, nadtlenuk wodoru, DTPA (ang. diethylenetriaminepentaacetic acid; kwas pentetynowy), NEM (ang. N-thylmaleimide; N-etylomaleimid), OPA (ang. o-Phthalaldehyde / ortho-phthalaldehyde) orto-ftalaldehyd, metanol, EDTA (ang. ethylenediaminetetraacetic acid; kwas tylenodiaminotetraoctowy), komercyjny zestaw do oznaczania SOD - Assay Kit-WST 19160
- Life Technologies, Waltham, MA, USA: błękit trypanu, DMEM z czerwieni

fenolową (ang. Dulbecco's Modified Eagle Medium; medium wzrostowe) bez czerwieni fenolowej, FBS (ang. fetal bovine serum; płodowa surowica bydlęca), antybiotyki penicylina/streptomycyna, L-glutamina

- New England Biolabs, UK: hOGG1 (ang. human 8-oxoguanine DNA glycosylase 1; ludzka 1 glikozylaza DNA 8-oksoguaniny), BSA(ang. bovine serum albumin; surowica albuminy wołowej), NEBbuffer
- Lonza, Bazylea, Szwajcaria: RPMI z glutaminą, HBSS (ang. Hank's Buffered Salt Solution; zbuforowany roztwór Hanksa)
- Biowest, Nualille, Francja: FBS
- POCH, Gliwice, Polska: nadtlenek wodoru, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, Na_2HPO_4 , CDNB (ang. 1-Chloro-2,4-dinitrobenzene; 1-chloro-2,4-dinitrobenzen)
- HyClone, USA: 0,25% trypsyna, PBS (ang. phosphate buffered saline; zbuforowany roztwór soli fizjologicznej) bez wapnia i magnezu
- Invitrogen, Waltham, MA USA: cDMEM
- TaKaRa Bio, USA: LDH Cytotoxicity Detection Kit – komercyjny zestaw do oznaczania cytotoksyczności
- Chempur, Piekary Śląskie, Polska: TCA (ang. trichloroacetic acid; kwas trichlorooctowy), NaOH, HCl, NaCl, Na_2HPO_4 , SDS (ang. sodium dodecyl sulfate; siarczanowy siarczan dodecylowy)
- BioVision, Kalifornia, USA: The Annexin V-FITC Apoptosis Kit – komercyjny zestaw do oznaczania apoptozy
- Digital Bio, Seul, Korea: komercyjny zestaw do oznaczania żywotności komórek

5.3. Aparatura

- Nikon, Tokyo, Japonia: Eclipse E600W mikroskop fluorescencyjny
- Olympus, Tokyo, Japonia: mikroskop Olympus IX 70
- Beckton Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA: cytometr przepływowy BDUS LSR II
- Bio-Rad, Hercules, USA: czytnik mikroplątek UV-Vis Bio-Rad 550
- BMG LABTECH, Ortenberg, Niemcy: czytnik mikroplątek UV-Vis SPECTROstar Nano
- BioTek, Winooski, VT, USA: czytnik mikroplątek UV-Vis/ fluorescencja
- Unicam, Cambridge, Wielka Brytania: spektrofotometr Helios UV-Vis

- Thermo Scientific Heraeus, Osterode, Niemcy: wirówka Biofuge fresco
- MPW, Warszawa, Polska: wirówka MPW 370
- Digital Bio, Seul, Korea: automatyczny licznik komórek ADAM MC
- Kucharczyk, Warszawa, Polska: blok grzejno-chłodzący Hot Winter 3
- Kucharczyk, Warszawa, Polska: aparat do elektroforezy kometowej
- ZZUJ Polon, Poznań, Polska: bomba kobaltowa radiator BK-10000
- Servo - D Izotop, Węgry: kobaltowa komora radiacyjna Panoramic OB

5.4. Metody

5.4.1. Izolacja komórek jednojądrzastych krwi obwodowej (PBMC)

Krew pełną nawarstwiano na Histopaque-1077 w stosunku objętościowym 1:1 i wirowano przy prędkości 540 x g przez 30 min, w temperaturze 25°C (Böyum, 1968). Zebrano warstwę bogatą w komórki jednojądrzaste, a następnie przemywano dwa razy 10 mM PBS (10 mM bufor fosforanowy z 0,9% NaCl, pH 7,4). Komórki jednojądrzaste zawieszano w 10 mM PBS lub w medium RPMI 1640 bez glutaminy. Komórki po izolacji barwiono błękitem trypanu (1:1), nanoszono na komorę Thoma[®] i zliczano pod mikroskopem świetlnym.

Obliczano liczbę komórek na 1 ml według wzoru: $4 \times 10^6 \times a \times n$

a - średnia liczba komórek w małym kwadracie komory; n - rozcieńczenie badanej próby.

Następnie przygotowywano zawiesinę komórek o odpowiednią gęstości. Żywotność komórek po izolacji wynosiła 99±5%.

5.4.1. Przygotowanie osocza

Świeżo mrożone osocze (ang. fresh frozen plasma) ludzkie rozmrażano, poprzez umieszczenie w 37°C na około 1,5 godziny. Następnie wirowano przy 810 x g, 5 minut, w temperaturze 15°C aby uzyskać klarowność osocza.

5.4.2. Hodowla komórek L929

Hodowlę komórek L929 – linia komórkowa fibroblastów mysich - prowadzono w pożywce DMEM z czerwienią fenolową o niskiej zawartości glukozy (1000 mg/l), z 5% cielecą surowicą płodową, z dodatkiem penicyliny (10 U/ml) i streptomycyny (10 µg/ml) oraz 2 mM L-glutaminą (cDMEM). Komórki hodowano w inkubatorze w 37°C, 5% CO₂ i wilgotnością 90%. Po osiągnięciu stanu bliskiego konfluencji, usuwano podłoże

i przepłukiwano komórki buforem PBS bez Ca^{2+} i Mg^{2+} . W celu odklejenia komórek od podłoża dodano do butelki z hodowlą 0,25% roztwór trypsyny – EDTA. Po opłukaniu komórek usuwano połowę trypsyny, a hodowlę z pozostałą trypsyną inkubowano 30-60 sekund w 37°C, 5% CO_2 i 90% wilgotnością. Następnie do zawiesiny dodawano cDMEM w celu spłukania i odklejenia komórek od podłoża. Całość przenoszono do probówki i wirowano przy $500 \times g$, 5 minut w temperaturze pokojowej. Komórki zawieszano w medium, a następnie barwiono błękitem trypanu (1:1), nanoszono na komorę Thoma® i zliczano pod mikroskopem świetlnym. Obliczano liczbę komórek na 1 ml według wzoru:

$$4 \times 10^6 \times a \times n$$

a - średnia liczba komórek w małym kwadracie komory; n - rozcieńczenie badanej próby
Przygotowywano rozcieńczenia w cDMEM aby uzyskać zawiesinę komórek o odpowiedniej gęstości.

5.4.3. Hodowla komórek K562

Komórki K562 hodowano w pożywce RPMI 1640 z dodatkiem 10% FBS, penicyliny (100 U/ml) i streptomycyny (100 mg/ml). Komórki hodowano w inkubatorze w 37°C, 5% CO_2 i wilgotnością 90%. Komórki pasażowano trzy razy w tygodniu, do badań wykorzystywano komórki w wykładniczej fazie wzrostu. Wykonywano barwienie błękitem trypanu (1:1), nanoszono na komorę Thoma® i zliczano pod mikroskopem świetlnym. Obliczano liczbę komórek na 1 ml według wzoru: $4 \times 10^6 \times a \times n$

a - średnia liczba komórek w małym kwadracie komory; n - rozcieńczenie badanej próby.
Następnie przygotowywano zawiesinę komórek o odpowiednią gęstości. Żywotność komórek po izolacji wynosiła $99 \pm 5\%$.

5.4.4. Przygotowanie roztworów macierzystych PGs i ich aglikonów

Glikokoniugaty polifenolowe rozpuszczano w wodzie dejonizowanej, otrzymując roztwór o stężeniu wyjściowym 10 mg/ml. W przypadku związków stanowiących kontrolę pozytywną (kwercetyna, rutyna) oraz doświadczeń mających na celu porównanie GPs z ich aglikonami, rozpuszczalnik stanowił 50% roztwór DMSO z uwagi na trudną rozpuszczalność aglikonów w wodzie dejonizowanej. Końcowe stężenie DMSO w badanych próbkach było $\leq 0,25\%$.

5.4.5. Inkubacja osocza i komórek z PGs i ich aglikonami, napromienianie

Badane związki roślinne o odpowiednich stężeniach dodawano do komórek lub osocza (w proporcji 1:100) i inkubowano przez 1 godz. w temperaturze 37°C, a następnie napromieniano odpowiednią dawką promieniowania gamma (20°C ± 1°C). W przypadku niektórych doświadczeń związki badane dodawano 15 minut po napromienieniu. Jednocześnie przygotowywano kontrole stanowiące komórki lub osocze bez badanych związków (zawierające PBS lub 50% DMSO). Przy każdym doświadczeniu przygotowywano jednocześnie identyczny zestaw prób (komórek i/lub osocza), których nie poddawano napromienianiu. Napromienianie prób wykonywano w Międzyresortowym Instytucje Techniki Radiacyjnej Wydziału Chemii Politechniki Łódzkiej. Napromienianie dawkami 10 i 15 Gy wykonano w bombie kobaltowej (moc dawki 0,392±0,027 Gy/min) radiator BK-10000 ZZUJ Polon, Poznań, Polska. Natomiast napromienianie dawkami 100 i 200 Gy wykonano w komorze radiacyjnej Panoramic Radiator OB – Servo – D (Izotop, Węgry) (moc dawki 430 Gy/h).

Analizy biochemiczne wykonywano 30-60 min po napromienieniu (czas konieczny na przewiezienie próbek z PŁ), przeżywalność i apoptozę PBMC i komórek K562 oznaczano po dodatkowej 2-godzinnej inkubacji w inkubatorze (37°C). W przypadku komórek przed inkubacją próby wirowano (500 x g, 15 min, 25°C), usuwano supernatant, a osad komórek zawieszano w świeżym medium lub 10 mM PBS.

W niektórych oznaczeniach wykorzystywano lizat komórek, który stanowił supernatant uzyskany poprzez zawieszenie komórek w 10 mM PBS, zamrożeniu (-20°C), rozmrożeniu (37°C) i odwirowaniu (500 x g, 4°C, 15 min).

5.4.6. Cytotoksyczność PGs i ich aglikonów wobec komórek L929

Cytotoksyczność GPs i ich aglikonów wobec fibroblastów mysich (komórki L929), oznaczano poprzez pomiar aktywności dehydrogenazy mleczanowej (LDH). Oznaczenia wykonywano za pomocą komercyjnego zestawu - LDH Cytotoxicity Detection Kit, Code MK 40l - zgodnie z metodą opisaną przez producenta (TaKaRa Bio). Test ten służy do oznaczania aktywności LDH w supernatancie, która jest miarą toksyczności badanej substancji względem komórek w hodowli. LDH jest enzymem cytozolowym, który w warunkach fizjologicznych nie jest uwalniany do środowiska. Uwolnienie LDH

z komórek do środowiska może być spowodowane m.in.: mechanicznymi uszkodzeniami błony plazmatycznej, czy śmiercią komórki w wyniku działania czynników szkodliwych np. substancji chemicznych. W pierwszym etapie reakcji mleczan jest przekształcany do pirogronianu, a katalizatorem jest LDH uwolniona z komórek. LDH przenosi H^+ z mleczanu na NAD^+ . Drugi etap obejmuje przeniesienie H^+ z $NADH/H^+$ na tetrazolinę, która ulega redukcji do formazanu, a katalizatorem reakcji jest diaforaza. W wyniku reakcji enzymatycznych powstaje barwny produkt, który można oznaczać spektrofotometrycznie.

Wybrane PGs, pochodzące z *Erigeron canadensis*, *Sanguisorba officinalis*, *Rubus plicatus*, *Fragaria vesca* oraz aglikony z *Erigeron canadensis* i *Sanguisorba officinalis*, a także związek referencyjny kwercetynę, po przygotowaniu roztworów początkowych, rozcieńczano za pomocą DMEM (bez czerwieni fenolowej i surowicy), aby uzyskać końcowe stężenia związków w próbie: 1, 6 i 30 $\mu\text{g/ml}$. Komórki L929 uzyskane z hodowli, policzono i rozcieńczono w cDMEM w celu uzyskania gęstości $1-4 \times 10^4$ komórek/ml. Przed wykonaniem oznaczenia testem LDH naniesiono po 100 μl zawiesiny komórkowej do odpowiednich dołków na płytce 96-dołkowej. Tak przygotowane komórki inkubowano przez 24 godziny w 37°C , 5% CO_2 i 90% wilgotnością. Po inkubacji usunięto medium z nad komórek. Następnie dodano do wszystkich dołków płytki po 100 μl świeżego medium bez czerwieni fenolowej z 2% FBS. Kolejno do odpowiednich dołków na płytce dodano po 100 μl kontroli i prób badanych na studzienkę. Kontrole stanowiły: I (tło) - 200 μl medium, II (spontaniczne uwalnianie LDH) - 100 μl medium i 100 μl zawiesiny komórek, III (maksymalne uwalnianie LDH) - 100 μl roztworu Triton-X (stężenie końcowe 1%) w medium i 100 μl zawiesiny komórek, próby badane zawierały 100 μl zawiesiny komórek i 100 μl badanej substancji. Przygotowano dwie płytki 96-dołkowe z taką samą zawartością studzienek i inkubowano odpowiednio 4 i 24 godziny, w 37°C , 5% CO_2 i 90% wilgotnością. Po upływie czasu inkubacji płytkę wirowano ($500 \times g$, 10 minut, w temperaturze pokojowej). Następnie przeniesiono po 100 μl supernatantu z każdej studzienki na nową płytkę 96-dołkową. Do studzienek dodano po 100 μl roztworu C, przygotowanego bezpośrednio przed dodaniem, mieszając ze sobą roztwór A i roztwór B (roztwory A i B - komercyjne roztwory znajdujące się w zestawie do oznaczania). Płytkę inkubowano w temperaturze pokojowej 30 minut, bez dostępu światła. Pomiar absorbancji przeprowadzono przy $\lambda=490$ nm na czytniku mikropłytek (BioTek, czytnik mikropłytek UV-Vis/ fluorescencja).

Stopień cytotoksyczności obliczono odejmując od każdej wartości absorbancji wartość kontroli zawierającej tylko medium (kontrola I), a otrzymane wartości przeliczano według wzoru:

$$\text{Cytotoksyczność [\%]} = \frac{\text{absorbancja badanej próby} - \text{absorbancja II kontroli}}{\text{absorbancja III kontroli} - \text{absorbancja II kontroli}}$$

5.4.7. Żywotność PBMC po inkubacji z PGs i ich aglikonami

Wpływ PGs i ich aglikonów oraz kwercetyny na przeżywalność PBMC oznaczano za pomocą barwienia komórek barwnikiem fluorescencyjnym - jodkiem propidyny. Jodek propidyny barwi DNA wnikając do uszkodzonej komórki. Oznaczenie wykonano stosując komercyjny zestaw odczynników i automatyczny licznik komórek ADAM-MC Digital Bio. Zestaw zawiera gotowy odczynnik AccuStain Solution T™ do zliczenia całkowitej liczby komórek, dodawany w celu całościowego uszkodzenia komórek oraz wybarwienia komórek jodkiem propidyny i gotowy odczynnik AccuStain Solution N™ dla wybarwienia komórek martwych jodkiem propidyny. Każdą badaną próbkę należy wyznakować AccuStain Solution T™ i równolegle AccuStain Solution N™, a urządzenie dokonuje automatycznego zliczenia i wyświetla na ekranie wynik żywotności [%], który jest obliczony wg wzoru:

$$\text{Żywotność [\%]} = \frac{\text{całkowita liczba komórek} - \text{liczba martwych komórek}}{\text{całkowita liczba komórek}} \times 100$$

Do PBMC o gęstości 1×10^6 komórek/ml dodano roztwory badane (PGs, z *Erigeron canadensis*, *Sanguisorba officinalis*, *Rubus plicatus*, *Fragaria vesca* oraz ich aglikony, a także związek referencyjny kwercetynę) aby uzyskać końcowe stężenie 25 µg/ml, następnie inkubowano 4 godziny w 37°C. Pobierano po 10 µl próby i przeprowadzono barwienie 1:1 znacznikami dołączonymi do zestawu, według instrukcji producenta urządzenia ADAM-MC. Następnie wprowadzano po 10 µl wyznakowanej próby na płytki Accuchip, również zawarte w zestawie producenta. Płytki umieszczano w czytniku ADAM-MC i odczytano odsetek żywych komórek (żywotność [%]).

5.4.8. Całkowity potencjał antyoksydacyjny PGs i ich aglikonów

Całkowity potencjał antyoksydacyjny (TAC) preparatów z wybranych roślin leczniczych oznaczano według metody Re i wsp. (Re i wsp., 1999). Zielononiebieski chromofor kationorodnika ABTS^{•+} powstaje poprzez utlenianie ABTS nadsiarczanem potasu. Zielononiebieski kationorodnik ABTS^{•+} pod wpływem przeciwutleniaczy obecnych w badanej próbce ulega redukcji (odbarwieniu). Zmiana (spadek) absorbancji przy $\lambda=414$ nm (lub 645 nm, 734 nm, 815 nm), jest miarą TAC.

Wybrane PGs, z *Erigeron canadensis*, *Sanguisorba officinalis* oraz ich aglikony, a także związki referencyjne, kwercetynę i rutynę rozpuszczano w 50% DMSO (uzyskiwano roztwory o stężeniu 5 mg/ml), a następnie kolejno rozcieńczano tym samym roztworem w celu otrzymania roztworów o stężeniach 0,075-1,25 mg/ml..

ABTS rozpuszczano w 10 mM buforze sodowo fosforanowym o pH 7,4, następnie dodawano nadsiarczan potasu i roztwór przechowywano przez około 12 godz., w ciemności, w temperaturze pokojowej. Uzyskany roztwór macierzysty kationorodnika ABTS^{•+} porcjowano i zamrażano (-20°C). Bezpośrednio przed pomiarem, roztwór macierzysty kationorodnika ABTS^{•+} rozcieńczano 10mM buforem sodowo fosforanowym o pH 7,4 do osiągnięcia absorbancji 1,0 przy $\lambda=414$ nm. Do kuwety pomiarowej dodawano 995 μ l roboczego roztworu kationorodnika ABTS^{•+}, mierzono absorbancję (A0) na spektrofotometrze UV/Vis, $\lambda=414$ nm (BMG LABTECH, SPECTROstar Nano). Następnie dodawano po 5 μ l próby badanej o określonym stężeniu (0,075-1,25 mg/ml) i mierzono spadek absorbancji po minucie (A). Wykonano również próbę kontrolną, zawierającą 5 μ l rozpuszczalnika (50% DMSO) zamiast próby badanej. Otrzymane absorbancje przeliczano na wartości RSA według wzoru:

$$\text{RSA [\%]} = \frac{A_0 - A}{A_0} \times 100$$

Analogicznie wykonano oznaczenie TAC wybranych PGs, z: *Erigeron canadensis*, *Sanguisorba officinalis*, *Rubus plicatus*, *Fragaria vesca*, po rozpuszczeniu ich w wodzie, dla różnych stężeń w zakresie 0,075-1,25 mg/ml. Do kuwety pomiarowej dodawano 995 μ l roboczego roztworu kationorodnika ABTS^{•+}, mierzono absorbancję (A0) na spektrofotometrze UV/Vis Helios alfa, $\lambda=414$ nm. Następnie dodawano po 5 μ l próby badanej i mierzono spadek absorbancji po minucie (A). Różnica absorbancji: A – A0 jest miarą całkowitego potencjału antyoksydacyjnego. Wykonywano też próbę kontrolną, dla której mierzono absorbancję A0' (995 μ l roboczego roztworu kationorodnika ABTS^{•+}) oraz A' (pomiar po minucie, po dodaniu 5 μ l wody zamiast próby badanej). Spadek

absorbancji próby kontrolnej (spontaniczna redukcja kationorodnika $ABTS^{\cdot+}$) odejmowano od każdej wartości $A - A_0$). Sporządzano krzywą wzorcową dla Troloxu (0,008 – 1 mmol/l). TAC wyrażano w jednoelektronowych równoważnikach Troloxu, wyliczone na podstawie krzywej wzorcowej, stosując wzór (aby uzyskać wynik w jednoelektronowych równoważnikach Troloxu uzyskaną wartość mnożono przez 2 ponieważ każda cząsteczka Troloxu reaguje z dwoma wolnymi rodnikami):

$$TAC = 2 \times cx$$

cx - równoważniki Troloxu w mmol/l z krzywej wzorcowej

5.4.9. Całkowity potencjał antyoksydacyjny osocza po napromienieniu

Wpływ PGs na całkowity potencjał antyoksydacyjny (TAC) osocza po ekspozycji na promieniowanie gamma oznaczano według metody Erel (Erel, 2004). Metoda opiera się na redukcji kationorodnika $ABTS^{\cdot+}$ powstającego w wyniku reakcji bezbarwnego, zredukowanego $ABTS$ z nadtlenkiem wodoru (H_2O_2) w środowisku kwaśnym. Antyoksydanty mają zdolność redukcji kationorodnika $ABTS^{\cdot+}$ odbarwiając zielononiebieski roztwór do formy pierwotnej, wprost proporcjonalnie do ich zawartości. Obserwowany spadek absorbancji jest miarą ilości antyoksydantów obecnych w próbce. Przygotowywano macierzysty roztwór kationorodnika $ABTS^{\cdot+}$ - sporządzano 10 mM roztwór $ABTS$ w 30 mM buforze octanowym o pH 3,6, zawierający 2 mM H_2O_2 i inkubowano przez 1 godz. w temperaturze pokojowej, do pojawienia się zielononiebieskiego zabarwienia charakterystycznego dla powstałego kationorodnika $ABTS^{\cdot+}$.

Do osocza ludzkiego dodawano roztwory badanych PGs, z *Erigeron canadensis*, *Sanguisorba officinalis*, *Rubus plicatus*, *Fragaria vesca*, do końcowego stężenia 6, 30 i 150 $\mu\text{g/ml}$ (do osocza kontrolnego dodawano 10mM PBS), inkubowano przez 1 godz., a następnie napromieniano dawką 100 Gy. Analogicznie przygotowane były próbki osocza, które nie były napromieniane. Na płytkę 96 – dołkową naniesiono po 200 μl 0,4 mol/l buforu octanowego o pH 5,8 i dodawano po 5 μl próbek osocza, a także 205 μl buforu octanowego, pH 5,8 (próba kontrolna w celu oznaczenia spontanicznej redukcji kationorodnika $ABTS^{\cdot+}$). Mierzono absorbancję (A_0) przy $\lambda=415$ nm na czytniku płytek (czytnik mikropłytek UV/Vis BMG LABTECH, SPECTROstar Nano). Kolejno do każdej studzienki dodawano po 20 μl roztworu macierzystego kationorodnika $ABTS^{\cdot+}$. Próby

inkubowano 5 min w temperaturze pokojowej i mierzono absorbancję (A) przy $\lambda=415$ nm. Wykonano również krzywą wzorcową dla Troloxu (0,008 – 1 mmol/l). Różnica absorbancji: A – A₀ (po odjęciu różnicy absorbancji A' - A₀' - odpowiadającej spontanicznej redukcji kationorodnika ABTS^{•+}) jest miarą całkowitego potencjału antyoksydacyjnego. TAC, wyliczoną na podstawie krzywej wzorcowej, wyrażono w jednoelektronowych równoważnikach Troloxu, stosując wzór:

$$\text{TAC} = 2 \times cx$$

cx - równoważniki Troloxu w mmol/l z krzywej wzorcowej; 2 - ponieważ każda cząsteczka Troloxu reaguje z dwoma wolnymi rodnikami

5.4.10. Oznaczanie peroksydacji lipidów osocza

Poziom peroksydacji lipidów osocza oznaczano, poprzez pomiar stężenia substancji reagujących z kwasem tiobarbiturowym (ang. thiobarbituric acid reactive substances; TBARS) (Rice-Evans i wsp. 1991). Metoda polega na pomiarze spektrofotometrycznym, przy $\lambda=532$ nm, barwnego produktu, powstającego na skutek kondensacji 2 cząsteczek kwasu tiobarbiturowego z 1 cząsteczką dialdehydu malonowego (MDA). Reakcja zachodzi w podwyższonej temperaturze, w środowisku kwaśnym. Reakcja ta nie jest specyficzna, ponieważ z TBA, oprócz MDA, reagują inne związki, tworząc addukty, które pochłaniają światło w zakresie fal około 532 nm.

Do osocza ludzkiego dodawano roztwory wybranych PGs, z *Erigeron canadensis* i *Sanguisorba officinalis*, oraz ich aglikony, a także związki referencyjne (kwercetynę i rutynę) do końcowego stężenia 1, 6 i 30 $\mu\text{g/ml}$, inkubowano (1 godz., 37°C), a następnie osocze napromieniano dawką 100 Gy, taki sam zestaw prób osocza poddano napromienianiu dawką 200 Gy. W analogiczny sposób przygotowywano zestaw prób osocza, które nie było napromieniane.

Do próbek wprowadzono 0,6 ml próbek osocza, 0,6 ml 15% (m/V) TCA w 0,25 M HCl i 0,6 ml 0,37% (m/V) TBA w 0,25 M HCl. Probówki wytrząsano na wortexie przez 1 minutę, następnie inkubowano (95°C, 10 minut). Po schłodzeniu, probówki wirowano (7000 x g, 10 minut, 20°C). Pobierano supernatant i mierzono absorbancję przy $\lambda= 532$ nm na spektrofotometrze (Helios UV/Vis). Stężenie TBARS obliczano na podstawie molowego współczynnika absorpcji dla MDA ($\epsilon = 156\ 000\ \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), według wzoru:

$$\text{TBARS } [\mu\text{mol MDA/l}] = \frac{\text{Absorbancja}}{0,156} \times \frac{1,8}{0,6}$$

Wyniki przedstawiono jako % kontroli, gdzie jako 100% przyjęto stężenie TBARS powstających w osoczu po napromienieniu (wcześniej od każdej wartości stężenia TBARS w osoczu napromienionym odejmowano ich stężenie w odpowiednim osoczu nienapromienionym).

5.4.11. Oznaczanie peroksydacji lipidów w PBMC

Poziom peroksydacji lipidów PBMC oznaczano poprzez pomiar stężenia TBARS wg Halliwell i Gutteridge (Halliwell i Gutteridge, 1981). Zasadę metody opisano w podrozdziale 5.4.11.

Do PBMC o gęstości 1×10^6 komórek/ml dodawano roztwory badanych GPs, z *Erigeron canadensis*, *Sanguisorba officinalis*, *Rubus plicatus*, *Fragaria vesca*, do końcowego stężenia 1, 5 i 25 $\mu\text{g/ml}$, komórki inkubowano (1 godz, 37°C), a następnie napromieniano dawką 15 Gy. Równolegle przygotowywano taki sam zestaw komórek, które nie były napromieniane.

Do próbek wprowadzono 0,5 ml lizatu komórkowego badanych prób (sposób przygotowania lizatu został opisany w podrozdziale 5.4.5 – Inkubacja osocza i komórek z PGs i ich aglikonami, napromienianie), 0,5 ml 15% (m/V) TCA w 0,25 M HCl i 0,5 ml 0,37% (m/V) TBA w 0,25 M HCl. Probówki wytrząsano na wortexie przez 1 minutę, następnie inkubowano (95°C , 10 minut). Po schłodzeniu, probówki wirowano (500 x g, 10 minut, 20°C). Pobierano supernatant i mierzono absorbancję przy $\lambda = 532$ nm na spektrofotometrze (Helios UV/Vis). Stężenie TBARS obliczano na podstawie molowego współczynnika absorpcji dla MDA ($\epsilon = 156\,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), według wzoru:

$$\text{TBARS } [\mu\text{mol/l}] = \frac{\text{Absorbancja}}{0,156} \times \frac{1,5}{0,5}$$

5.4.12. Oznaczanie aktywności transferazy glutationowej

Aktywność transferazy glutationowej (GST) oznaczano w lizacie PBMC, z 1-chloro-2,4-dinitrobenzenem jako substratem (Habig i wsp. 1974). GST katalizuje reakcję koniugacji zredukowanego glutationu z substratem (CDNB), powstaje barwny koniugat (2,4-dinitrofenylo-S-glutation), który oznacza się spektrofotometrycznie przy długości fali $\lambda = 340$ nm. Szybkość powstawania koniugatu (wzrost absorbancji) jest miarą aktywności enzymu.

- a) Do PBMC o gęstości 1×10^6 komórek/ml dodawano roztwory badanych GPs, z *Erigeron canadensis*, *Sanguisorba officinalis*, *Rubus plicatus*, *Fragaria vesca*, do końcowego stężenia 1, 5 i 25 $\mu\text{g/ml}$ lub kwercetynę (25 $\mu\text{g/ml}$), komórki inkubowano (1 godz, 37°C), a następnie napromieniano dawką 15 Gy. Równolegle przygotowywano taki sam zestaw komórek, które nie były napromieniane.
- b) PBMC o gęstości 1×10^6 komórek/ml napromieniano dawką 15 Gy, a następnie po 15 minutach od napromienienia, do komórek dodawano roztwory badanych GPs, z *Erigeron canadensis*, *Sanguisorba officinalis*, *Rubus plicatus*, *Fragaria vesca*, do końcowego stężenia 25 $\mu\text{g/ml}$ lub kwercetynę (25 $\mu\text{g/ml}$), komórki inkubowano (1 godz., 37°C).

Aktywność GST oznaczano w lizacie komórkowym (sposób ich przygotowania został opisany w podrozdziale 5.4.5 – Inkubacja osocza i komórek z PGs i ich aglikonami, napromienianie). Na płytkę 96-dołkową dodawano 85 μl 0,1 M buforu fosforanowy, pH 6,5, i 5 μl 20 mM roztworu GSH oraz 5 μl 20 mM roztworu CDNB. Zainicjowano reakcję, dodając 5 μl próbki badanej (lizat). Mierzono przyrost absorbancji przy $\lambda = 340 \text{ nm}$, na czytniku płytek (czytnik mikroplatek UV/Vis BMG LABTECH, SPECTROstar Nano) z termostatem, przy zapewnieniu temperatury 30°C. Wykonywano też pomiar dla próby kontrolnej (zawierającej 90 μl buforu fosforanowego i nie zawierającej lizatu). Wyznaczano szybkość przyrostu absorbancji w ciągu 1 min. Aktywność transferazy glutationowej (ilość jednostek w ml wyjściowego preparatu) obliczano według wzoru:

$$A = \frac{\Delta A/\text{min}(\text{próba badana}) - \Delta A/\text{min}(\text{próba kontrolna})}{9,6 \times 20}$$

9,6 – (9,6 mmol/cm) wartość milimolowego współczynnika absorpcji powstającego koniugatu; 20 - rozcieńczenie

Aktywność enzymatyczną przeliczono i wyrażono jako % kontroli (za 100% przyjmowano aktywność enzymu w odpowiedniej grupie nienapromienionych PBMC).

5.4.13. Oznaczanie aktywności dysmutazy ponadtlenkowej

Dysmutaza ponadtlenkowa (SOD) jest enzymem katalizującym reakcję dysmutacji anionorodnika ponadtlenkowego do nadtlenku wodoru i cząsteczki tlenu. Oznaczanie aktywności SOD w lizacie PBMC wykonano za pomocą komercyjnego zestawu SOD Assay Kit-WST 19160, zgodnie z instrukcją opisaną przez producenta (Sigma - Aldrich). Metoda ta pozwala na oznaczanie aktywności SOD przy zastosowaniu soli tetrazolowej – WST-1 (sól sodowa 2-(4-jodofenylo)-3-(nitrofenylo)-5-(2,4-disulfofenylo)-2-tetrazolu),

ulegającej redukcji pod wpływem anionorodnika ponadtlenkowego do barwnego formazanu. Szybkość redukcji O₂ jest liniowo związana z aktywnością oksydazy ksantynowej (XO), która hamuje aktywność SOD. Hamująca aktywność SOD można oznaczyć poprzez pomiar zmiany barwy przy długości fali λ=440 nm.

Na płytkę 96-dołkową dodawano po 20 μl lizatów prób badanych (sposób ich przygotowania został opisany w podrozdziale 5.4.5 – Inkubacja osocza i komórek z PGs i ich aglikonami, napromienianie) oraz 3x po 20 μl wody dejonizowanej (do trzech rodzajów prób ślepych), do wszystkich dołków dodawano po 200 μl WST Working Solution i mieszano. Następnie dodano 20 μl Dilution Buffer do próby ślepej nr 2 i 3. Kolejno dodano 20 μl Enzyme Working Solution do prób badanych oraz do próby ślepej nr 1. Inkubowano w 37°C, 20 minut i mierzono na czytniku płytek przy λ= 450 nm (czytnik mikropłytek UV/Vis BMG LABTECH, SPECTROstar Nano). WST Working Solution, Dilution Buffer, Enzyme Working Solution – dołączono przez producenta do zestawu. Aktywność SOD (wsółczynnik zahamowania %) obliczano według wzoru:

$$\text{SOD [\%]} = \frac{(A \text{ pr. ślepa 1} - A \text{ pr. ślepa 3}) - (A \text{ pr. badana} - A \text{ pr. ślepa 2})}{(A \text{ pr. ślepej 1} - A \text{ pr. ślepej 3})} \times 100$$

Aktywność enzymatyczną przeliczono i wyrażono jako % kontroli (za 100% przyjmowano aktywność enzymu w odpowiedniej grupie nienapromienionych PBMC).

5.4.14. Oznaczanie grup –SH w osoczu

Całkowitą zawartość grup tiolowych w osoczu oznaczano za pomocą odczynnika Ellmana (Rice-Evans i wsp., 1991). Metoda ta polega na reakcji kwasu 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoesowego) (DTNB) z grupami -SH (białek i związków małowcząsteczkowych) i uwalnianiu się intensywnie żółtego anionu 5 tio-2-nitrobenzoesowego, który oznacza się spektrofotometrycznie przy długości fali λ=412.

- a) Wybrane PGs: *Erigeron canadensis*, *Sanguisorba officinalis*, *Rubus plicatus*, *Fragaria vesca* oraz kwercetynę, po otrzymaniu roztworów początkowych, rozcieńczano w celu uzyskania w próbie badanej stężenia 6, 30 i 150 μg/ml GP i kwercetyny o stężeniu 30 μg/ml. Do osocza dodano roztwory badane, inkubowano, a następnie napromieniano dawką 100 Gy.

- b) Wybrane PGs: *Erigeron canadensis*, *Sanguisorba officinalis*, *Rubus plicatus*, *Fragaria vesca*, po otrzymaniu roztworów początkowych, rozcieńczano w celu uzyskania w próbie badanej stężenia 30, 150 i 750 µg/ml. Do osocza dodano roztwory badane, inkubowano, a następnie napromieniano dawką 500 Gy.

Do 250 µl 4-krotnie rozcieńczonego osocza dodawano równą objętość 10 mM buforu fosforanowego (Na), pH 8,0 zawierającego 10% (m/V) SDS. Mierzono absorbancję przy $\lambda=412$ nm (A0). Następnie dodawano 250 µl 0,04% (m/V) DTNB w 10 mM buforze fosforanowym, pH 8,0. Po inkubacji (1 godz., 37°C) mierzono absorbancje (A) przy $\lambda=412$ nm (spektrofotometr Helios UV-Vis). Różnica absorpcji (A-A0) jest miarą zawartości grup –SH w próbie. Molowy współczynnik absorpcji dla anionu kwasu tio-2-nitrobenzoesowego, przy $\lambda=412$ nm, powstałego w reakcji, na podstawie którego obliczano stężenie tioli, wynosi $\epsilon = 13600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

5.4.15. Uszkodzenia DNA w PBMC

Test kometowy pozwala na analizę uszkodzeń DNA, na podstawie rozdziálu elektroforetycznego w żelu agarozowym pojedynczej komórki. Obraz mikroskopowy komórek przypomina kometę, ponieważ zawiera „głowę”, która odpowiada miejscu unieruchomienia komórki przed lizą oraz „ogon” stanowiący pętle i fragmenty nici DNA, które zostały uwolnione ze struktur jądrowych w wyniku pęknięć DNA. Uszkodzenia DNA w PBMC wykonano testem kometowym w wersji alkalicznej według metody Singh (Singh i wsp., 1988) z kilkoma modyfikacjami (Klaude i wsp., 1996). Elektroforeza przeprowadzona w wersji alkalicznej umożliwia pomiar m.in. jednoniciowych i dwuniciowych pęknięć DNA. Poziom uszkodzeń DNA określany jest jako % DNA zawartego w „ogonie” (Czubaszek i wsp., 2014). Do PBMC o gęstości 1×10^5 komórek/ml dodawano roztwory badanych PGs, z *Erigeron canadensis*, *Sanguisorba officinalis*, *Rubus plicatus*, *Fragaria vesca* oraz ich aglikony, a także związki referencyjne (kwercetynę i rutynę) do końcowego stężenia 25 µg/ml, komórki inkubowano (1 godz, 37°C), a następnie napromieniano dawką 15 Gy. Równolegle przygotowywano taki sam zestaw komórek, które nie były napromieniane.

- b) Do PBMC o gęstości 1×10^5 komórek/ml dodawano roztwory badanych PGs, z *Erigeron canadensis*, *Sanguisorba officinalis*, *Rubus plicatus*, *Fragaria vesca* do końcowego stężenia 1, 5 i 25 µg/ml lub kwercetynę (25 µg/ml), komórki inkubowano (1 godz, 37°C), a następnie napromieniano dawką 10 i 15 Gy. Równolegle przygotowywano taki sam zestaw komórek, które nie były

napromieniane.

- c) Zawiesinę PBMC o gęstości 1×10^5 komórek/ml napromieniano dawką 15 Gy, a następnie po 15 minutach od napromienienia, do komórek dodawano roztwory badanych PGs, z *Erigeron canadensis*, *Sanguisorba officinalis*, *Rubus plicatus*, *Fragaria vesca* lub kwercetynę do końcowego stężenia 25 $\mu\text{g/ml}$. Równolegle przygotowywano taki sam zestaw komórek, które nie były napromieniane.

W celu wykonania testu komórki zawieszano w agarozie LMP i umieszczano na opłaczonym agarozą NMP szkiełku mikroskopowym. Kontrolę pozytywną stanowiły PBMC eksponowane na 10 μM H_2O_2 przez 10 minut na lodzie. Komórki poddawano lizie w buforze lizującym (zawierającym 2,5M NaCl, 100 mM EDTA, 1% Triton X-100, 10 mM Tris pH10,; 1 godzina, 4°C), następnie umieszczano na 20 min w buforze rozwijającym (3M NaOH, 1mM EDTA) i poddawano elektroforezie (20 min, 21 mV, 28 mA w buforze elektroforetycznym: 300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH>13) (Czubatka i wsp., 2015). Komórki barwiono DAPI, a następnie zliczano pod mikroskopem fluorescencyjnym wyposażonym w kamerę COHU 4910, wykorzystując program komputerowy Lucia-Comet v. 4.51. Z każdego preparatu zliczano po 100 przypadkowo wybranych komet. Uszkodzenia DNA przedstawiano jako % kontroli, gdzie za 100% przyjęto % DNA w „ogonie” w komórkach napromienionych bez związków roślinnych.

5.4.16. Uszkodzenia oksydacyjne zasad DNA w PBMC

Uszkodzenia DNA w PBMC wykonano testem kometowym w wersji alkalicznej według metody Singh (Singh i wsp., 1988) z kilkoma modyfikacjami (Klaube i wsp., 1996). Poziom uszkodzeń DNA określa się jako % DNA zawartego w „ogonie” (Czubaszek i wsp., 2014). Stosując enzym OGG1 (glikozylaza 8-oksoguaniny) za pomocą testu kometowego można również ocenić stopień modyfikacji oksydacyjnych zasad azotowych DNA (Boiteux i Radicella, 1999). Enzym OGG1 rozpoznaje miejsca utlenionych zasad, głównie purynowych, powodujących pęknięcia nici DNA. Głównym produktem utlenienia zasad purynowych jest 8-oksoguanina, która jest rozpoznawana przez enzym OGG1 i usuwana w procesie naprawy DNA z udziałem enzymu. Enzym rozpoznaje też 2,6-diamino-4-hydroksy-5-formamido-pirymidynę (Fapy-Gua), 4,6-diamino-4-hydroksy-5-formamido-pirymidynę (Fapy-Ade) oraz niewielkie ilości 8-oxoadeniny. Usunięcie zmodyfikowanych zasad przez OGG1 prowadzi do utworzenia

miejsc apurynowych lub apirymidynowych, które są następnie cięte przez enzym (dzięki jego aktywności AP-liazy), co powoduje utworzenie luk w nici DNA, wykrywanych za pomocą testu kometowego (Poplawski i wsp., 2010).

- a) Do PBMC o gęstości 1×10^5 komórek/ml dodawano roztwory badanych PGs, z *Erigeron canadensis*, *Sanguisorba officinalis*, *Rubus plicatus*, *Fragaria vesca* lub kwercetynę do końcowego stężenia 25 $\mu\text{g/ml}$, komórki inkubowano (1 godz, 37°C), a następnie napromieniano dawką 15 Gy. Równolegle przygotowywano taki sam zestaw komórek, które nie były napromieniane.
- b) Zawiesinę PBMC o gęstości 1×10^5 komórek/ml napromieniano dawką 15 Gy, a następnie po 15 minutach od napromienienia do komórek dodawano roztwory badanych PGs, z *Erigeron canadensis*, *Sanguisorba officinalis*, *Rubus plicatus*, *Fragaria vesca* lub kwercetynę do końcowego stężenia 25 $\mu\text{g/ml}$. Równolegle przygotowywano taki sam zestaw komórek, które nie były napromieniane.

Komórki zawieszano w agarozie LMP i umieszczano na opłaczonym agarozą NMP szkiełku mikroskopowym. Komórki poddawano lizie w buforze lizującym (zawierającym 2,5M NaCl, 100 mM EDTA, 1% Triton X-100, 10 mM Tris pH10,; 1 godzina, 4°C), a następnie przemwano wodą dejonizowaną i osuszano preparaty. Dodawano mieszaninę enzymu hOGG1 z buforem, BSA i wodą dejonizowaną lub sam bufor z wodą dejonizowaną (kontrola) na preparaty komórkowe znajdujący się na szkiełku oraz inkubowano przez 30 min w temperaturze 37°C. Kontrolę pozytywną stanowiły PBMC inkubowane z 10 μM H₂O₂ przez 10 minut na lodzie. Następnie preparaty umieszczano na 20 min w buforze rozwijającym (3M NaOH, 1mM EDTA) i poddawano elektroforezie, przez 20 min, przy 21 mV, 28 mA (bufor elektroforetyczny: 300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH>13) (Czubatka, Sarnik, Lucent, Blasiak, Witczak i Poplawski, 2015). Komórki barwiono za pomocą DAPI, a następnie zliczano pod mikroskopem fluorescencyjnym wyposażonym w kamerę COHU 4910, wykorzystując program komputerowy Lucia-Comet v. 4.51. Z każdego preparatu zliczano po 100 przypadkowo wybranych komet. Zmiany oksydacyjne zasad DNA przedstawiano jako % kontroli, gdzie za 100% przyjęto % DNA w „ogonie” w komórkach napromienionych bez związków roślinnych. Na wykresach przedstawiano tylko poziom modyfikacji oksydacyjnych zasad DNA, czyli od uszkodzeń DNA komórek inkubowanych z enzymem hOGG1 poddanych napromienianiu odejmowano uszkodzenia DNA komórek nie traktowanych enzymem.

5.4.17. Przeżywalność PBMC i komórek K562 po napromienieniu

Do zawiesiny PBMC lub komórek K562 o gęstości 1×10^6 komórek/ml dodawano roztwory badanych PGs, z *Erigeron canadensis*, *Sanguisorba officinalis*, *Rubus plicatus*, *Fragaria vesca* do końcowego stężenia 5, 10, 25 i 50 $\mu\text{g/ml}$ lub kwercetynę (25 $\mu\text{g/ml}$), komórki inkubowano (1 godz, 37°C), a następnie napromieniano dawką 15 Gy. Równolegle przygotowywano taki sam zestaw komórek, do których nie dodawano związków roślinnych. Przeżywalność PBMC i komórek K562 po napromienieniu oznaczano za pomocą barwienia komórek barwnikiem fluorescencyjnym, jodkiem propidyny, stosując zestaw akcesoriów i urządzenie ADAM-MC Digital Bio. Zasadę metody oraz sposób barwienia komórek i oznaczenia na urządzeniu opisano w rozdziale 5.4.8. – Żywotność PBMC po inkubacji z PGs i ich aglikonami.

5.4.18. Wewnątrzkomórkowy poziom ROS w PBMC i K562

Oznaczanie wewnątrzkomórkowego poziomu reaktywnych form tlenu wykonano metodą spektrofluorescencyjną przy użyciu diacetanu 2',7'-dichlorodihydrofluoresceiny (ang. 2',7'-dichloro- dihydro fluorescein diacetate; H2DCF-DA). H2DCF-DA jest zredukowaną chemicznie formą fluoresceiny. Sonda swobodnie przenika przez błonę komórkową do wnętrza komórki, następnie w komórce w wyniku działania esteraż ulega hydrolizie (deacetylacji) do niefluoryzującej 2',7'- dichlorodihydrofluoresceiny. Kolejnym etapem przekształceń chemicznych sondy jest jej utlenienie przez wewnątrzkomórkowe ROS, powstaje ostateczny produkt reakcji 2',7'-dichlorofluoresceina (ang. 2',7'-dichlorofluorescein; DCF), charakteryzująca się silną fluorescencją. Związek ten pozostaje w cytozolu komórek, wykazując maksimum wzbudzenia przy długości fali $\lambda=495$ nm i emisji $\lambda=529$ nm. Intensywność fluorescencji sondy jest wprost proporcjonalna do ilości reagujących z nią ROS, obecnych w komórce (Balcerczyk i wsp., 2005).

Do PBMC lub K562 o gęstości 1×10^5 komórek/ml dodawano roztwory badanych PGs, z *Erigeron canadensis*, *Sanguisorba officinalis*, *Rubus plicatus*, *Fragaria vesca*, do końcowego stężenia 25 $\mu\text{g/ml}$, komórki inkubowano (1 godz, 37°C), a następnie napromieniano dawką 15 Gy. Równolegle przygotowywano taki sam zestaw komórek, które nie były napromieniane. Do zawiesiny PBMC i komórek K562 dodawano 10 μM H2DCF-DA i inkubowano przez 30 min, w temp. 37°C, a następnie przemywano buforem HBSS (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 0,8 mM MgCl₂, 1,8 mM CaCl₂, 1 mM Na₂HPO₄, 10 mM HEPES and 1% glukoza). Kontrolę pozytywną stanowiły komórki narażone

na 10 μM H_2O_2 przez 10 minut na lodzie. Po 2 godzinach mierzono sygnały fluorescencyjne za pomocą czytnika fluorescencji przy 485/530 nm (BioTek, fluorescencyjny czytnik mikropłytek). Wewnątrzkomórkowy poziom ROS przedstawiono jako zmiana krotności (ang. fold change), którą obliczano według wzoru:

$$\text{ROS (zmiana krotności)} = \frac{\text{DCF fl. w komórkach napromienianych} - \text{DCF fl. w komórkach nienapromienianych}}{\text{DCF fl. w komórkach nienapromienianych}}$$

5.4.19. Oznaczenie poziomu zredukowanego glutationu w PBMC i w komórkach K562

Poziom zredukowanego glutationu oznaczano metodą spektrofotometryczną, polegającą na reakcji GSH z orto-ftalaldehydem (OPA), w której powstaje fluoryzujący produkt (Senft i wsp., 2000).

Do PBMC lub K562 o gęstości 1×10^6 komórek/ml dodawano roztwory badanych PGs, z *Erigeron canadensis*, *Sanguisorba officinalis*, *Rubus plicatus*, *Fragaria vesca*, do końcowego stężenia 25 $\mu\text{g/ml}$, komórki inkubowano (1 godz, 37°C), a następnie napromieniano dawką 15 Gy. Równolegle przygotowywano taki sam zestaw komórek, które nie były napromieniane.

Do lizatu PBMC lub komórek K562 dodawano 15 μl roztworu RQB-TCA (20 mM HCl, 5 mM DTPA, 10 mM kwas askorbinowy, 5% TCA). Zawiesinę odwirowywano przy 500 x g, 10 minut. Do supernatantu dodawano 2 μl NEM (7,5 mM) w RQB (20 mM HCl, 5 mM DTPA, 10 mM kwas askorbinowy) i 25 μl 1,0 M buforu fosforanowo-potasowego (pH 7,0). Inkubowano 5 minut w temperaturze pokojowej i dodawano 100 μl 0,1 M buforu fosforanowo potasowego (pH 6,9), a następnie dodawano 15 μl roztworu OPA w metanolu (5,0 mg/ml) i inkubowano 30 minut w ciemności w temperaturze pokojowej. Fluorescencję mierzono przy wzbudzenia $\lambda=355$ nm i emisji $\lambda=430$ nm (BioTek, fluorescencyjny czytnik mikropłytek). Równolegle wykonywano krzywą wzorcową dla GSH (0,2-20 $\mu\text{mol l}^{-1}$), z której odczytywano stężenie GSH w badanych próbach. Wyniki wyrażono jako % kontroli, gdzie za 100% przyjmowano stężenie GSH w komórkach nienapromienionych.

5.4.20. Apoptoza w PBMC i w komórkach K562

Do oceny apoptozy zastosowano zestaw Annexin V-FITC Apoptosis Kit (BioVision, Kalifornia, USA). Wkrótce po zainicjowaniu apoptozy, dochodzi do przemieszczenia fosfatydyloseryny (PS) z warstwy wewnętrznej na powierzchnię błony komórkowej. Do PS przyłącza się kompleks aneksyny V sprzężonej z fluochromem FITC, która wykazuje wysokie powinowactwo do błonowej PS. Analiza cytometryczna przy wzbudzenia $\lambda=488$ nm i emisji $\lambda=530$ nm pozwala na rozróżnienie komórek żywych i apoptotycznych.

Do PBMC lub K562 o gęstości 1×10^6 komórek/ml dodawano roztwory badanych PGs, z *Erigeron canadensis*, *Sanguisorba officinalis*, *Rubus plicatus*, *Fragaria vesca*, do końcowego stężenia 25 $\mu\text{g/ml}$, komórki inkubowano (1 godz, 37°C), a następnie napromieniano dawką 15 Gy. Równolegle przygotowywano taki sam zestaw komórek, które nie były napromieniane.

Osad komórek zawieszano w buforze (dołączony do zestawu przez producenta) następnie dodano Annexin V-FITC, inkubowano 15 minut w ciemności w temperaturze pokojowej. Mierzono natężenie fluorescencji w 30 000 komórek przy użyciu cytometru przepływowego (Becton Dickinson LSR II), przy $\lambda= 488/530$ nm. Dane analizowano za pomocą oprogramowania (Flowing Software ver. 2.5.0 firmy Perttu Terho, Turku, Finlandia). Wyniki przedstawiono jako index apoptotyczny, który obliczano według wzoru:

$$\text{index apoptotyczny} = \frac{\text{liczba komórek apoptotycznych}}{\text{całkowita liczba komórek}}$$

5.4.21. Analiza statystyczna

Uzyskane wyniki przedstawiano jako wartości średnie \pm odchylenie standardowe (SD). W każdym doświadczeniu wykonano minimum 3 niezależne eksperymenty (n), każdy w dwóch powtórzeniach. Wyliczenia wykonano przy użyciu programu Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation, USA).

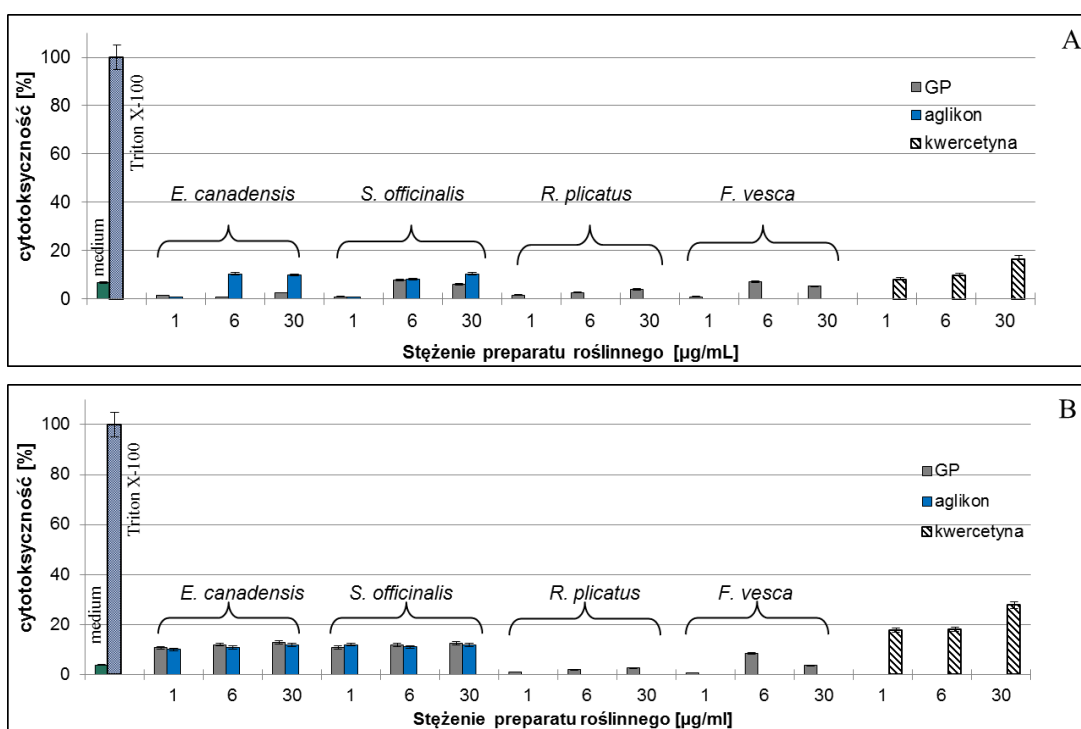
Analizę statystyczną wykonano przy użyciu oprogramowania Statistica v.10 (StatSoft, USA). W pierwszym etapie zweryfikowano normalność rozkładu wyników testem Kołmogorowa-Smirnowa. Dokonano analizy różnic między grupami metodą wariancji jednoczynnikowej ANOVA, a następnie wykonano test post-hoc Tukeya lub nieparametryczny test Kruskala-Wallisa. Różnice pomiędzy wartościami uzyskanymi

w wyniku napromieniania prób, a próbami nienapromienionymi analizowano sparowanym testem t-Studenta. Wartość $p < 0,05$ uznawano jako poziom statystycznie istotny.

6. Wyniki

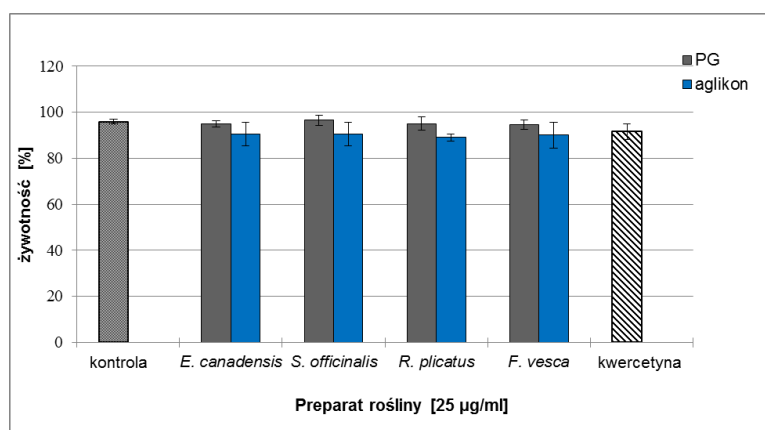
6.1. Cytotoksyczność oraz zdolność antyoksydacyjna GPs i aglikonów roślinnych

Pierwszym etapem realizacji celu badawczego była ocena cytotoksyczności *in vitro* wybranych PGs wyizolowanych z: *Erigeron canadensis*, *Sanguisorba officinalis*, *Rubus plicatus*, *Fragaria vesca* oraz porównanie z cytotoksycznością ich aglikonów (w przypadku dwóch z PGs, z *Erigeron canadensis* i *Sanguisorba officinalis*). Określono wpływ badanych związków na fibroblasty mysie linii L929, które są standardowymi i uznanymi międzynarodowo komórkami służącymi do oceny cytotoksyczności *in vitro* wyrobów medycznych. Kwercetyna była związkiem referencyjnym, z którym porównano badane związki roślinne. Rutyny nie zastosowano w tym doświadczeniu, ponieważ z danych literaturowych wiadomo, że nie wykazuje toksyczności wobec hodowlanych komórek prawidłowych (Matsuo i wsp., 2005). Wyniki przedstawione na Rycinie 11A i B wskazują, że PGs z: *Erigeron canadensis*, *Sanguisorba officinalis*, *Rubus plicatus*, *Fragaria vesca* oraz aglikony z *Erigeron canadensis*, *Sanguisorba officinalis*, w stężeniach zastosowanych w doświadczeniu (1, 6, 30 µg/ml), nie są toksyczne dla komórek L929. Zgodnie z polskimi i europejskimi normami (ISO 10993-5: 2009), ponieważ cytotoksyczność nie przekraczała 15%, związki takie są uznawane za nietoksyczne. Jednakże kwercetyna o stężeniu 30 µg/ml, po 4 godzinach inkubacji z komórkami L929 wykazała cytotoksyczność powyżej 15% (Rycina 11A). Ponadto prawie 20 oraz 30% komórek L929 było martwych po 24-godzinnej inkubacji z kwercetyną o stężeniu, odpowiednio, 1 i 6 µg/ml oraz 30 µg/ml (Rycina 11B).



Rycina 11. Cytotoksyczność PGs i aglikonów oraz kwercetyny, względem fibroblastów mysich L929 po (A) 4 i (B) 24 h inkubacji; wartości średnie \pm SD; n=3

Następnie dokonano oceny wpływu wybranych PGs z: *Erigeron canadensis*, *Sanguisorba officinalis*, *Rubus plicatus*, *Fragaria vesca* oraz ich aglikonów na przeżywalność PBMC (Rycina 12). Wykazano, że badane związki, zarówno PGs, ich aglikony, jak i kwercetyna nie zmieniają istotnie przeżywalności PBMC po 4 godzinach inkubacji, przy optymalnym stężeniu - 25 μ g/ml ($p > 0,05$).



Rycina 12. Żywotność PBMC po 4 h inkubacji z PGs, ich aglikonami lub kwercetyną; wartości średnie \pm SD; n=3.

Kolejno porównano całkowity potencjał antyoksydacyjny PGs z *Erigeron canadensis* i *Sanguisorba officinalis* z ich aglikonami, a także rutyny i kwercetyny. Wyniki, wyrażone

jako zdolność zmiatania kationorodnika ABTS⁺ (% RSA), przedstawiono w Tabeli 3. Zdolności przeciwutleniające glikokoniugatów polifenolowych były niewiele mniejsze w porównaniu z RSA ich aglikonów, w przypadku PG z *Erigeron canadensis* o około 20%, a z *Sanguisorba officinalis* o około 30%. Zdolność antyoksydacyjna kwercetyny jest prawie dwukrotnie wyższa niż jej glukozydu rutyny, co jest zgodne z doniesieniami innych autorów (Apak i wsp., 2004).

Tabela 3. Całkowita zdolność antyoksydacyjna PGs i ich aglikonów oraz rutyny i kwercetyny; wartości średnie ± SD; n=5

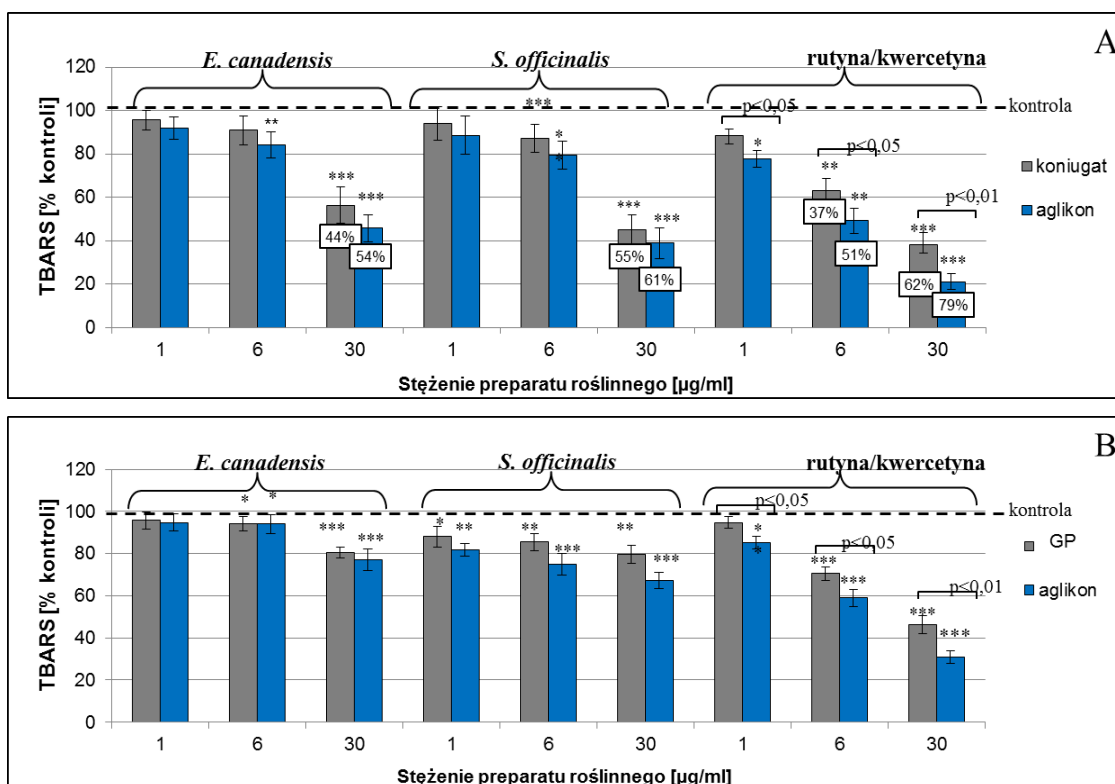
		RSA [%]			
<i>Erigeron canadensis</i>	<i>Erigeron canadensis</i>	<i>Sanguisorba officinalis</i>	<i>Sanguisorba officinalis</i>		
PG	aglikon	PG	aglikon	rutyna	kwercetyna
49,3±2,4	69,0±13,6	92,5±14,5	118,3±30,3	66,8±22,1	124,6±40,3

6.2. Porównanie wybranych aktywności radiochronnych PGs z ich aglikonami

6.2.1. Peroksydacja lipidów osocza

W celu porównania radiochronnego działania PGs z ich aglikonami oznaczano poziom, indukowanej promieniowaniem gamma, peroksydacji lipidów osocza, poprzez pomiar stężenia TBARS. Peroksydację lipidów mierzono w osoczu inkubowanym z PGs z *Erigeron canadensis*, *Sanguisorba officinalis* lub ich aglikonami, a następnie napromienianym dawką 100 i 200 Gy. Stężenie TBARS w osoczu kontrolnym wynosiło $0,993 \pm 0,033 \mu\text{mol/l}$. Napromienianie dawką 100 Gy i 200 Gy spowodowało znaczny wzrost stężenia TBARS, dla 100 Gy wartość ta wynosiła $1,589 \pm 0,027$, a dla 200 Gy $2,052 \pm 0,031 \mu\text{mol/l}$ ($p < 0,05$). Wyniki, przedstawione na Rycinie 13 A, B, wyrażano jako TBARS [% kontroli], gdzie za 100% przyjęto stężenie TBARS, generowanych po napromienieniu, w osoczu bez badanych związków. Wykazano, że zarówno PGs i ich aglikony, jak i rutyna i kwercetyna, dodawane do osocza przed napromieniowaniem, hamują peroksydację lipidów w zależności od stężenia (Rycina 13A i B). Skuteczność kwercetyny (aglikon) była znacznie większa w porównaniu z działaniem jej glukozydu rutyny, przy każdym ze stosowanych stężeń (przy niższej dawce promieniowania 17%

wyższy stopień hamowania przy stężeniu 30 µg/ml ($p < 0,01$). Natomiast nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic w hamowaniu peroksydacji lipidów osocza pomiędzy PGs, a ich aglikonami.

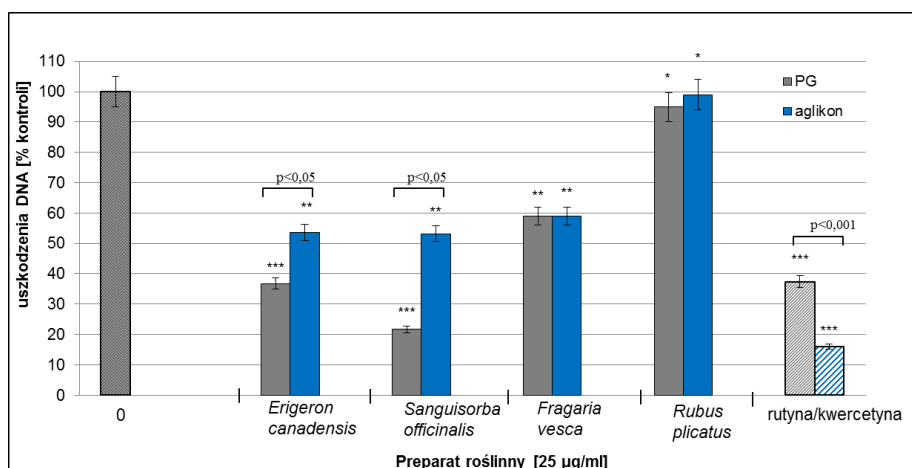


Rycina 13. Peroksydacja lipidów osocza ludzkiego inkubowanego z wybranymi PGs i ich aglikonami oraz rutyną i kwercetyną, a następnie poddanego działaniu promieniowania gamma (A)100 Gy i (B)200 Gy; wartości średnie \pm SD; $n=6$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs kontrola. Liczby przedstawione na słupkach wykresu A przedstawiają % hamowania peroksydacji lipidów

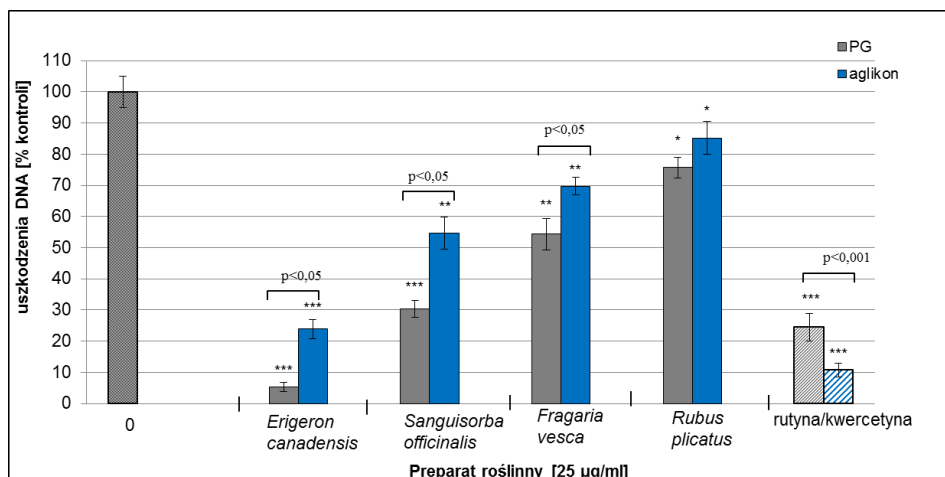
6.2.2. Uszkodzenia DNA w PBMC

W celu dalszej analizy i porównania aktywności radioochronnej PGs z ich aglikonami, wykonano alkaliczną wersję testu kometowego. W PBMC oceniano poziom indukowanych promieniowaniem uszkodzeń DNA (uszkodzenia całkowite, obejmujące jedno- i dwuniciowe pęknięcia DNA oraz miejsca alkalicznie labilne) (Rycina 14A) i uszkodzeń oksydacyjnych zasad azotowych (głównie purynowych, rozpoznawanych przez enzym hOGG1) (Rycina 14B). Komórki jednojądrzaste krwi obwodowej inkubowano z PGs z: *Erigeron canadensis*, *Sanguisorba officinalis*, *Rubus plicatus*, *Fragaria vesca* i ich aglikonami, o optymalnym stężeniu 25 µg/ml, a następnie napromieniano dawką 15 Gy. Wyniki przedstawiono jako % kontroli, gdzie za 100% przyjęto % DNA w „ogonie” w komórkach napromienionych bez związku roślinnego.

Inkubacja komórek z PGs z *Erigeron canadensis* i *Sanguisorba officinalis* znacznie zmniejszała odsetek DNA w „ogonie” dla całkowitych uszkodzeń DNA (bez enzymu hOGG1), o ponad 60 i 80%, odpowiednio dla PG z *Erigeron canadensis* i *Sanguisorba officinalis* ($p < 0,001$) (Rycina 14A). W przypadku uszkodzeń oksydacyjnych DNA (z enzymem hOGG1) inkubacja z PG z *Erigeron canadensis* zmniejszała odsetek DNA w „ogonie” o około 95% i 70% dla PG z *Sanguisorba officinalis* ($p < 0,001$) (Rycina 14B). W mniejszym stopniu zapobiegały uszkodzeniom DNA aglikony z *Erigeron canadensis* i *Sanguisorba officinalis*, a oksydacyjnym uszkodzeniom zasad DNA aglikony z *Erigeron canadensis*, *Sanguisorba officinalis* i *Fragaria vesca*. PG z *Sanguisorba officinalis* zapewniał niemal dwukrotnie większą skuteczność ochrony DNA niż jego forma aglikonowa, w przeciwieństwie do związków referencyjnych gdzie lepszy efekt ochronny wykazano dla kwercetyny. W przypadku napromieniania komórek w obecności preparatów z *Fragaria vesca* i *Rubus plicatus* nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w ochronnym działaniu PGs i ich aglikonów (ocenianym na podstawie poziomu uszkodzeń DNA) (Rycina 14A).



Rycina 14A. Uszkodzenia DNA w PBMC inkubowanych z PGs i ich aglikonami oraz kwercetyną i rutyną, eksponowanych na promieniowanie gamma 15 Gy; poziom uszkodzeń DNA oznaczano testem kometowym w wersji alkalicznej (bez enzymu), wartości średnie \pm SD; $n=6$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs bez glikokoniugatu polifenolowego (0)



Rycina 14B. Uszkodzenia oksydacyjne zasad DNA w PBMC inkubowanych z PGs i ich aglikonami oraz kwercetyną i rutyną, eksponowanych na promieniowanie gamma 15 Gy; poziom oksydacyjnych uszkodzeń zasad DNA oznaczano testem kometowym w wersji alkalicznej w obecności hOGG1, wartości średnie \pm SD; n=6; *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 vs bez glikokoniugatu polifenolowego (0)

Na podstawie uzyskanych wyników wstępnych, spośród 8 preparatów roślinnych (4 PGs i 4 aglikony), do dalszych badań wybrano glikokoniugaty polifenolowe, ze względu na:

- rozpuszczalność PGs w wodzie, w przeciwieństwie do ich aglikonów, które rozpuszczają się, m.in. w DMSO, ale nie są rozpuszczalne w wodzie
- porównywalną skuteczność działania radioochronnego (hamowanie indukowanej promieniowaniem gamma peroksydacji lipidów osocza, zmniejszanie poziomu uszkodzeń DNA i oksydacyjnych modyfikacji zasad azotowych DNA w napromienionych komórkach jedonajdrzastych krwi obwodowej).

6.3. Całkowita zdolność antyoksydacyjna PGs

W Tabeli 4 przedstawiono całkowitą zdolność antyoksydacyjną PGs z *Erigeron canadensis*, *Sanguisorba officinalis*, *Rubus plicatus* i *Fragaria vesca*, oznaczaną metodą redukcji kationorodnika ABTS⁺⁺, w roztworach o stężeniu 25 µg/ml, wyrażoną w jednoelektronowych równoważnikach Troloxu [mmol ekwiwalent Troloxu/l]. Najsilniejsze działanie antyoksydacyjne, choć nieco mniejsze niż kwercetyna, wykazuje PG z *Sanguisorba officinalis*. Najniższą zdolność antyoksydacyjną wykazuje PG z *Fragaria vesca*.

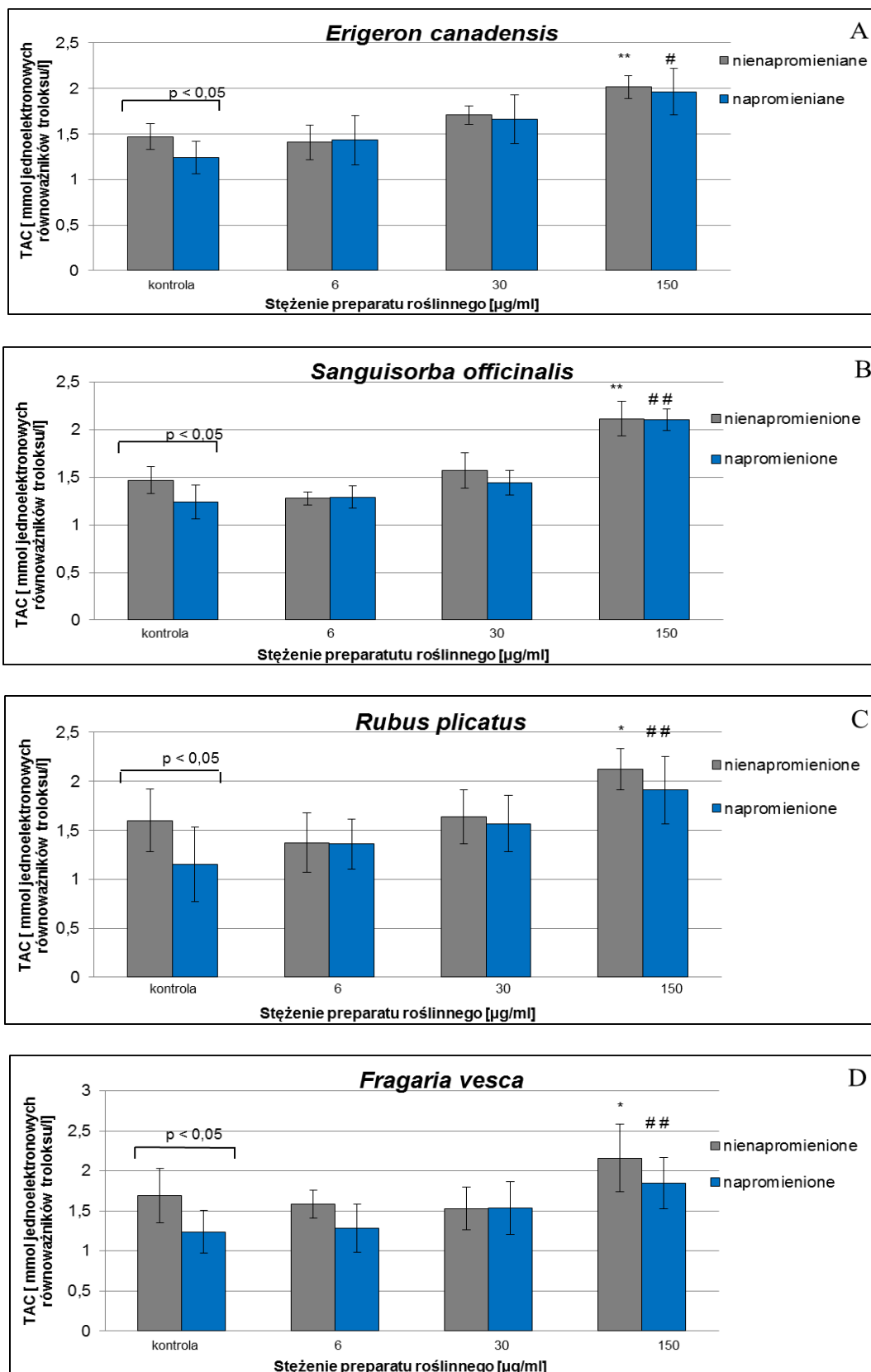
Tabela 4. Całkowita zdolność antyoksydacyjna (TAC) PGs i kwercetyny (25µg/ml); wartości średnie ± SD; n=3

TAC [mmol ekwiwalent Troloxu/l]				
<i>Erigeron canadensis</i>	<i>Sanguisorba officinalis</i>	<i>Rubus plicatus</i>	<i>Fragaria vesca</i>	
PG	PG	PG	PG	kwercetyna
5,3±1,73	6,33±1,27	5,53±1,72	4,05±1,61	8,85±1,63

6.4. Antyoksydacyjne działanie PGs roślinnych w osoczu

6.4.1. Całkowita zdolność antyoksydacyjna osocza po napromienieniu

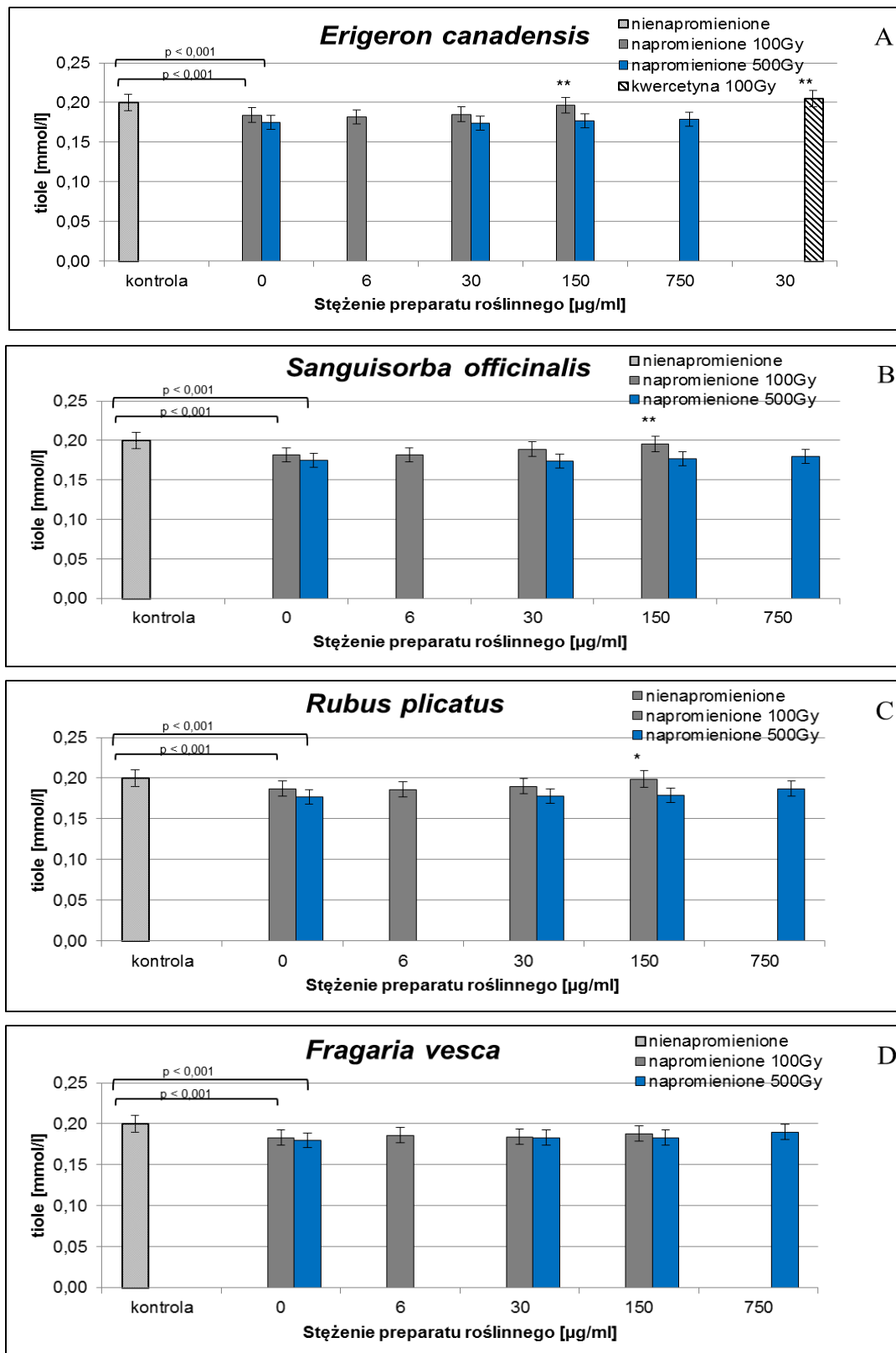
Oznaczano całkowitą zdolność antyoksydacyjną osocza ludzkiego inkubowanego z PGs, z *Erigeron canadensis*, *Sanguisorba officinalis*, *Rubus plicatus* i *Fragaria vesca* w stężeniach 6, 30 i 150 µg/ml, a następnie napromienianego dawką 100 Gy. Wyniki przedstawione na Rycinie 15 wskazują, że promieniowanie zmniejsza TAC osocza (o 15-25%) na skutek utleniania endogennych przeciwutleniaczy. Dodane do osocza (egzogenne) PGs zwiększają TAC (szczególnie przy stężeniu 150 µg/ml) zarówno osocza nie napromieniowanego, jak i napromieniowanego. Największe działanie wykazuje PGs pochodzący z *Sanguisorba officinalis* (Rycina 15B), natomiast najmniejsze działanie wykazał PGs z *Fragaria vesca* (Rycina 15C).



Rycina 15. Całkowita zdolność antyoksydacyjna osocza ludzkiego inkubowanego z wybranymi GPs z (A) *Erigeron canadensis* (B) *Sangisorba officinalis* (C) *Rubus plicatus* (D) *Fragaria vesca*, ekspozowanego na promieniowanie gamma 100 Gy; wartości średnie ± SD; n=4; *p<0,05, **p<0,01 vs kontrola nienapromieniona, #p<0,05, ##p<0,01 vs kontrola napromieniona

6.4.2. Indukowane promieniowaniem gamma utlenianie grup tiolowych osocza

Określano całkowity poziom grup tiolowych w osoczu ludzkim inkubowanym z wybranymi GPs, z *Erigeron canadensis*, *Sanguisorba officinalis*, *Rubus plicatus* i *Fragaria vesca*, w stężeniu 6, 30 i 150 $\mu\text{g/ml}$, a następnie napromienianym dawką 100 Gy oraz większą dawką 500 Gy, przy zastosowanych wyższych stężeniach GPs (30, 150 i 750 $\mu\text{g/ml}$). Stężenia GPs były dostosowane (wyznaczone eksperymentalnie) do dawki promieniowania zastosowanej w układzie eksperymentalnym – ponieważ skuteczność działania radioprotektora zależy od dawki promieniowania, napromienianie większą dawką wymaga większego stężenia radioprotektora w badanym układzie, aby uzyskać porównywalny efekt ochronny. Wyniki przedstawione na Rycinie 16 pokazują, że promieniowanie powoduje utlenienie grup $-\text{SH}$ w osoczu, na co wskazuje statystycznie istotny spadek stężenia całkowitego grup $-\text{SH}$ w osoczu napromienionym (100 Gy), w porównaniu z osoczem nie poddanym napromienieniu. Utlenianie tioli w wyniku działania wysokiej dawki promieniowania (500 Gy) jest nieco bardziej wyraźne (spadek poziomu grup $-\text{SH}$ o ponad 8% przy 100 Gy i 12% przy 500 Gy, $p < 0,001$). Wyniki wykazują, że trzy badane związki o stężeniu 150 $\mu\text{g/ml}$ zapobiegają utlenianiu tioli (białek i małowcząsteczkowych) pod wpływem dawki promieniowania 100 Gy – w osoczu napromienionym w obecności GPs z *Erigeron canadensis*, *Sanguisorba officinalis* i *Rubus plicatus*, poziom tioli jest bliski poziomowi w kontroli. Natomiast GPs, nawet przy wysokim stężeniu (750 $\mu\text{g/ml}$), nie wykazały ochronnego działania wobec osocza napromienionego dawką 500 Gy. Dla kwercetyny skuteczną ochronę tioli uzyskano przy 5-krotnym niższym stężeniu (30 $\mu\text{g/ml}$).

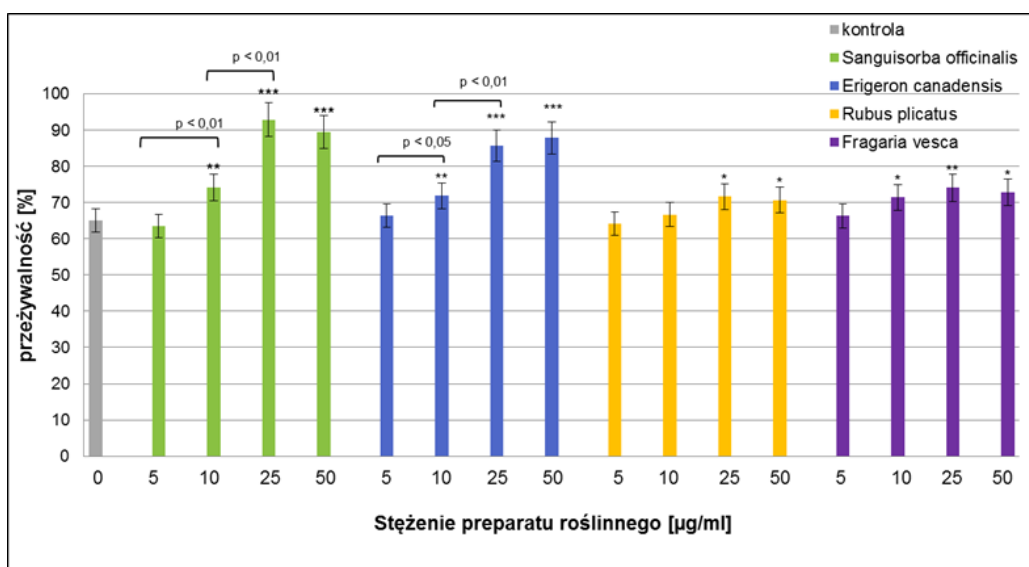


Rycina 16. Utlenianie tioli osocza ludzkiego inkubowanego z wybranymi GPs (A) *Erigeron canadensis* (B) *Sangisorba officinalis* (C) *Rubus plicatus* (D) *Fragaria vesca*, eksponowanego na promieniowanie gamma 100 Gy i 500 Gy; wartości średnie \pm SD; n=6; *p<0,05, **p < 0,01 vs napromieniane 100 Gy bez glikokoniugatu polifenolowego (0)

6.5. Ocena radiochronnego działania PGs roślinnych w PBMC

6.5.1. Przeżywalność PBMC

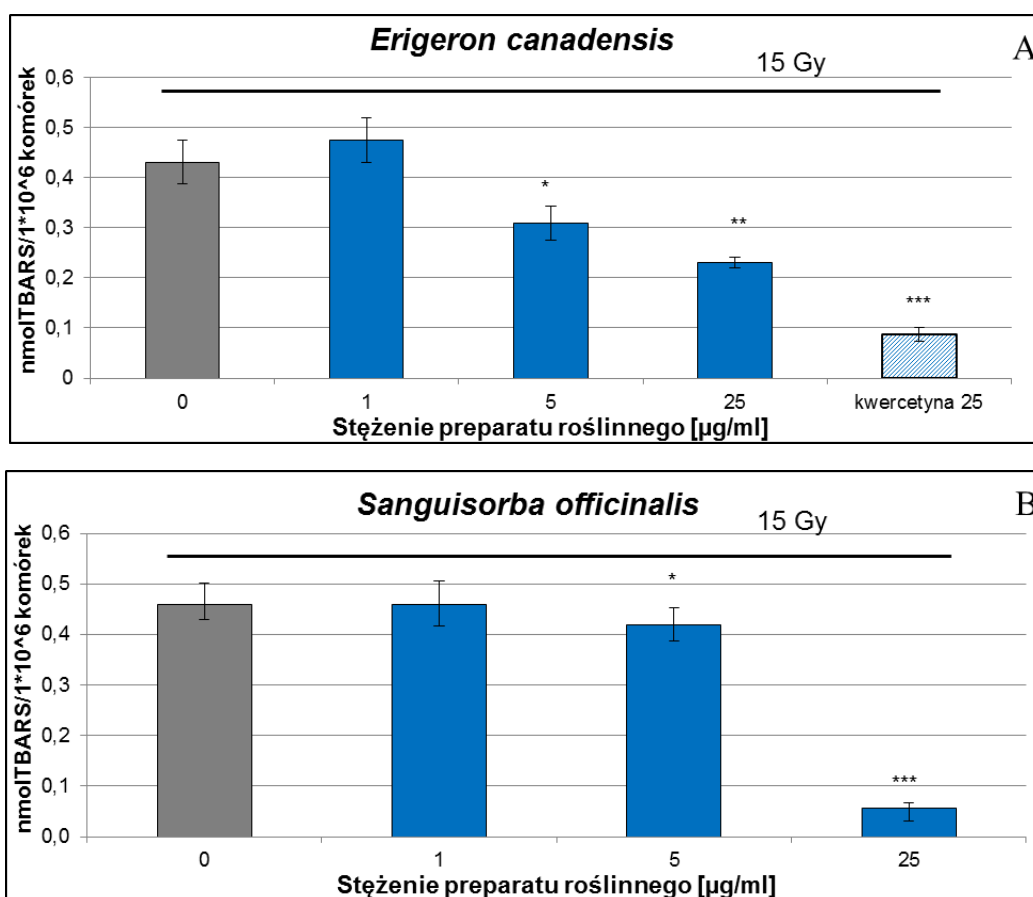
Promieniowanie jest czynnikiem cytotoksycznym. Dokonano oceny przeżywalności PBMC inkubując je z PGs pochodzącymi z *Erigeron canadensis*, *Sanguisorba officinalis*, *Rubus plicatus* i *Fragaria vesca* w stężeniu 5, 10, 25 i 50 $\mu\text{g/ml}$, a następnie napromieniając dawką 15 Gy. Po 2 godzinach po napromienieniu wykonano pomiar przeżywalności na czytniku fluorescencyjnym ADAM MC. Wyniki przedstawiono na Rycinie 17. W wyniku napromieniania przeżywalność PBMC spada do około 65%, a pre-inkubacja z PGs z *Erigeron canadensis* i *Sanguisorba officinalis* zwiększa przeżywalność komórek do około 90 % ($p < 0,001$) przy stężeniach 25 i 50 $\mu\text{g/ml}$. Natomiast inkubacja z PGs z *Rubus plicatus* i *Fragaria vesca* o tych samych stężeniach zwiększa przeżywalność PBMC tylko do około 70% ($p < 0,01$ i $p < 0,05$). Różnice pomiędzy stężeniami 25 i 50 $\mu\text{g/ml}$ nie są istotne statystycznie (Rycina 17).

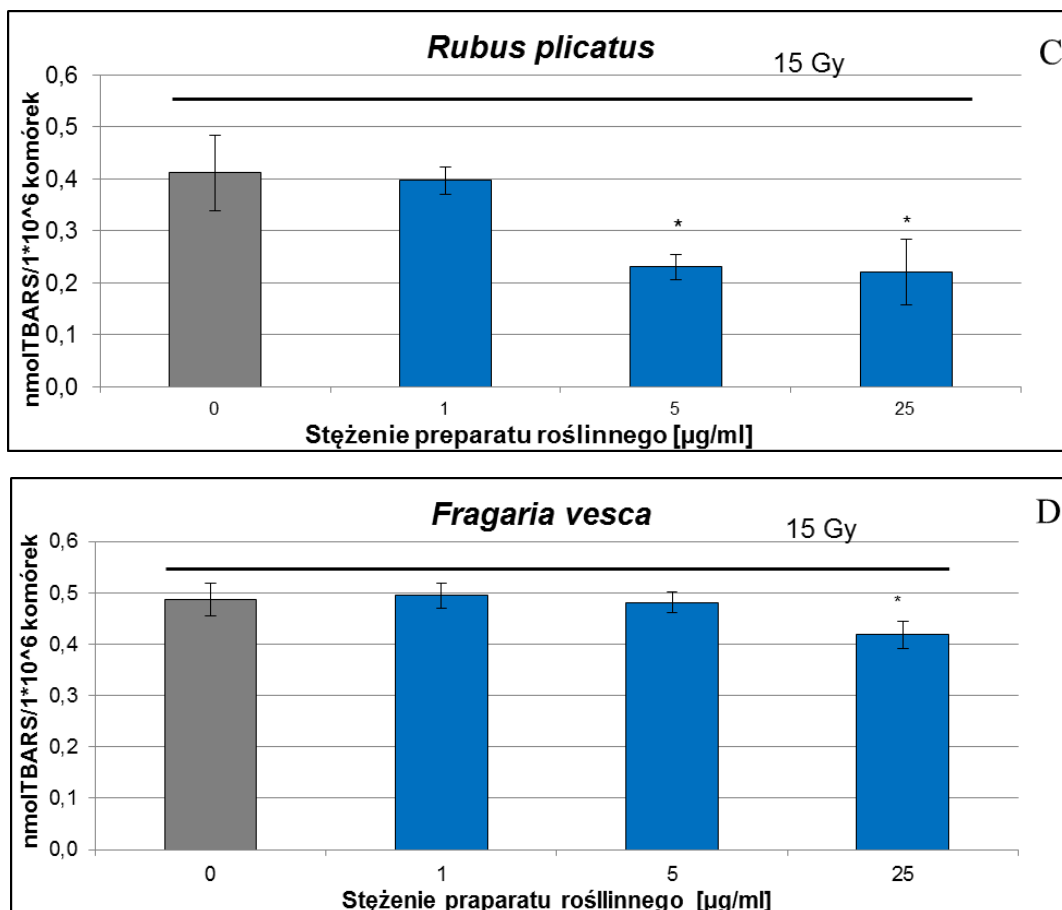


Rycina 17. Przeżywalność PBMC inkubowanych z PGs z *Erigeron canadensis*, *Sanguisorba officinalis*, *Rubus plicatus*, *Fragaria vesca*, eksponowanych na promieniowanie gamma 15 Gy; wartości średnie \pm SD; $n=3$; * $p > 0,05$ ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs bez glikokoniuugatu polifenolowego (0)

6.5.2. Peroksydacja lipidów PBMC

Promieniowanie gamma indukuje peroksydację lipidów w PBMC. Stężenie TBARS w komórkach po napromienieniu wynosiło średnio 0,4-0,5 nmoli MDA/1x10⁶ komórek (Rycina 17). Traktowanie komórek glikokoniugatami w stężeniach 5 i 25 µg/ml, przed napromienieniem, hamuje peroksydację lipidów (zmniejszenie poziomu TBARS, w porównaniu do kontroli (bez PGs). Przy najwyższym ze stosowanych stężeń PGs (25 µg/ml) stężenie TBARS istotnie się zmniejsza - o 50% (p <0,01) dla PG z *Erigeron canadensis*, 88% (p <0,001) z *Sanguisorba officinalis*, 44% (p <0,05) z *Rubus plicatus* oraz 78% (p <0,001) dla kwercetyny (Rycina 18A, B, C). Podczas gdy poziom TBARS w PBMC napromieniowanych w obecności PG z *Fragaria vesca* (25 µg/ml) zmniejszył się o około 15% (p <0,05), w porównaniu z kontrolą (bez PG) (Rycina 18D).



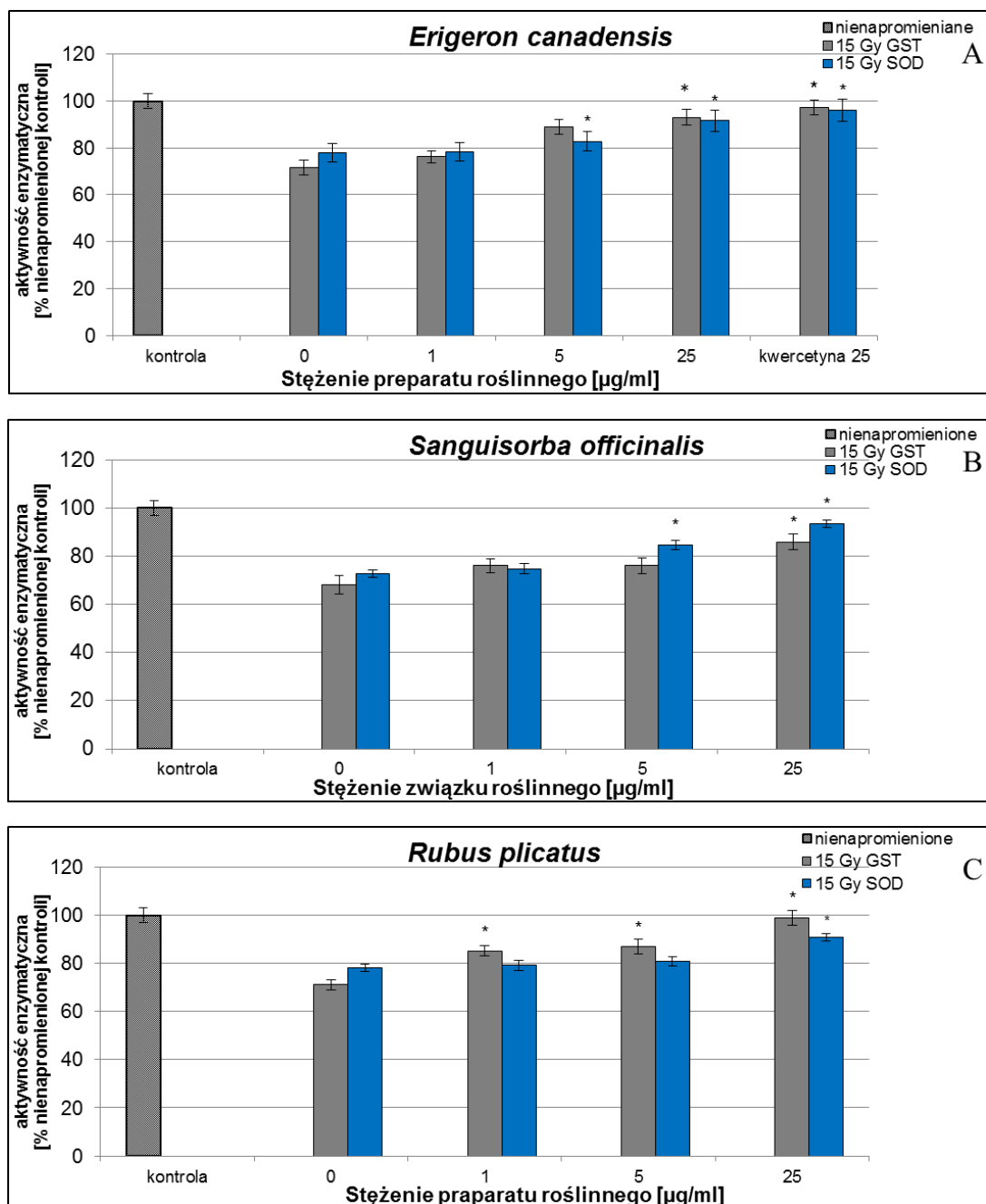


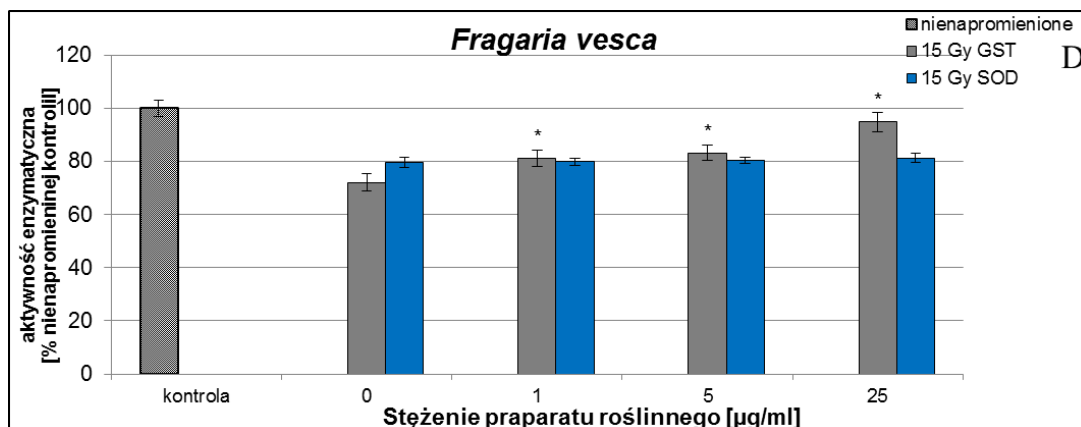
Rycina 18. Peroksydacja lipidów PMBC inkubowanych z wybranymi PGs z (A) *Erigeron canadensis* (B) *Sanguisorba officinalis* (C) *Rubus plicatus* (D) *Fragaria vesca* oraz (A) kwercetyną, ekspozowanych na promieniowanie gamma 15 Gy; wartości średnie \pm SD; n=6; *p<0,05 **p<0,01; ***p<0,001 vs bez glikokoniugatu polifenolowego (0)

6.5.3. Aktywność enzymów antyoksydacyjnych

W celu określenia udziału PGs w ochronie komórkowych enzymów antyoksydacyjnych oznaczano aktywność dwóch wybranych enzymów, dysmutazy ponadtlenkowej i transferazy glutationowej. Inkubowano PBMC z PGs pochodzącymi z *Erigeron canadensis*, *Sanguisorba officinalis*, *Rubus plicatus* i *Fragaria vesca* (1, 5 i 25 µg/ml) oraz kwercetyną (25 µg/ml), a następnie komórki poddawano napromienianiu dawką 15 Gy, wyniki przedstawiono na Rycinie 19. W PBMC poddanych działaniu promieniowania jonizującego aktywności SOD i GST istotnie się zmniejszyły (o około 30 i 20%), w porównaniu z nie napromienioną kontrolą). PGs z *Erigeron canadensis* i *Sanguisorba officinalis* chroniły przed spadkiem aktywności enzymów, podobnie jak kwercetyna. W przypadku SOD skuteczne działanie radioochronne odnotowano przy stężeniu 5 i 25µg/ml, a w przypadku GST przy stężeniu 25µg/ml.

Działanie ochronne PGs z *Rubus plicatus* i *Fragaria vesca* wykazano przede wszystkim wobec aktywności GST, natomiast SOD była chroniona jedynie przy stężeniu 25µg/ml w przypadku PG z *Rubus plicatus*. Glikokoniugat z *Fragaria vesca* nie chronił przed spadkiem aktywności SOD, indukowanym promieniowaniem gamma.

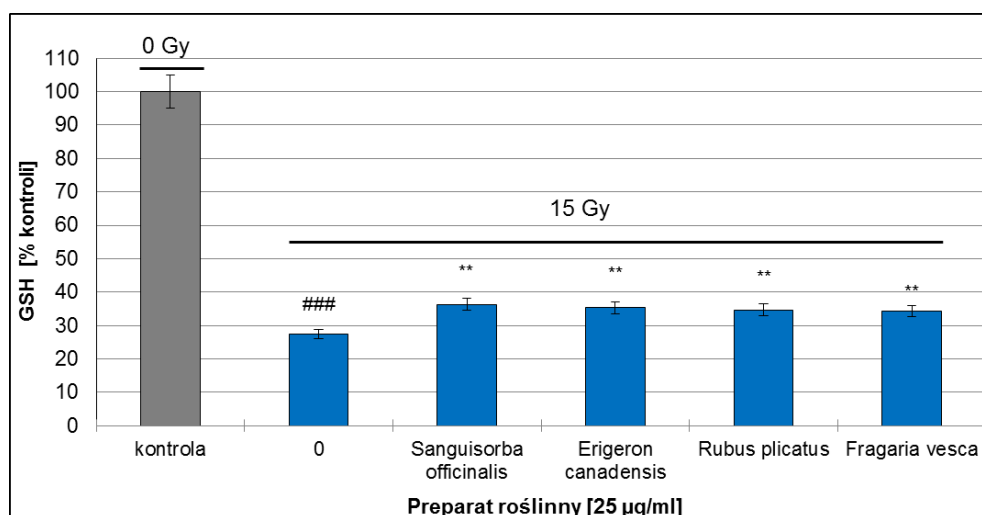




Rycina 19. Aktywność SOD i GST w PBMC inkubowanych z PGs z (A) *Erigeron canadensis* (B) *Sanguisorba officinalis* (C) *Rubus plicatus* (D) *Fragaria vesca* oraz kwercetyną i ekspozowanych na promieniowanie gamma 15 Gy; wartości średnie \pm SD; n=6; *p<0,05, **p < 0,01 vs bez glikokoniugatu polifenolowego (0)

6.5.4. Poziom zredukowanego glutationu w PBMC

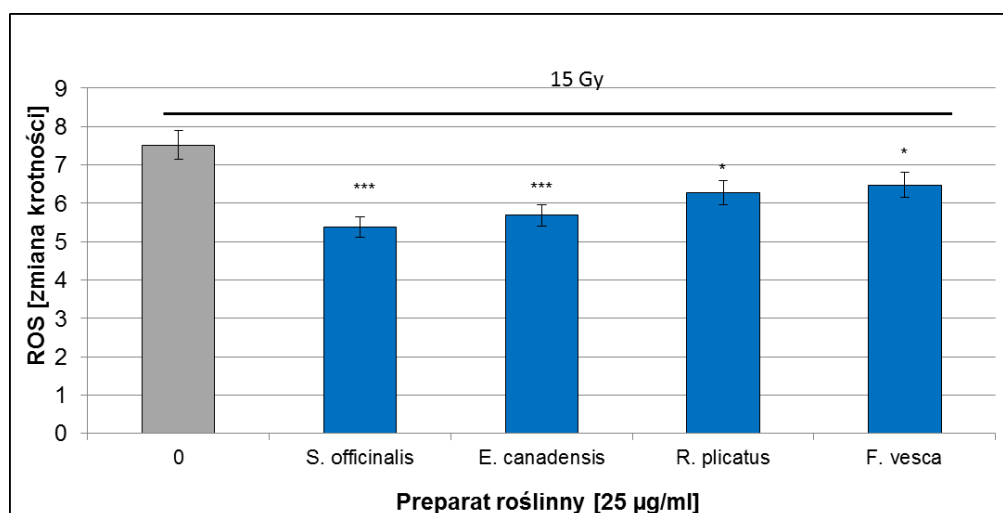
Promieniowanie powoduje drastyczny spadek poziomu zredukowanego glutationu w PBMC (o ponad 70 % w porównaniu do kontroli) (Rycina 20). Kiedy komórki inkubowano z PGs z *Erigeron canadensis*, *Sanguisorba officinalis*, *Rubus plicatus* i *Fragaria vesca*, w stężeniu 25 µg/ml, a następnie napromieniano dawką 15 Gy, odnotowano, istotny statystycznie (p<0,01), nieco wyższy poziom GSH, w porównaniu z komórkami napromienianymi bez PG.



Rycina 20. Poziom zredukowanego glutationu w PBMC, inkubowanych z PGs z *Erigeron canadensis*, *Sanguisorba officinalis*, *Rubus plicatus*, *Fragaria vesca*, ekspozowanych na promieniowanie gamma 15 Gy; wartości średnie \pm SD; n=3; **p<0,01 vs bez glikokoniugatu polifenolowego (0); ###p<0,001 vs kontrola

6.5.5. Wewnątrzkomórkowy poziom ROS w PBMC

Promieniowanie gamma, poprzez produkty radiolizy wody, jak i działanie bezpośrednie, inicjuje wzmożoną produkcję ROS wewnątrz komórki. Poziom generowanych wewnątrzkomórkowych ROS można oznaczać przy użyciu sondy fluorescencyjnej H₂DCF-DA. Metodę tę zastosowano w celu ustalenia czy PGs bezpośrednio zmiatają ROS w napromienionych PBMC. Inkubowano komórki z PGs z *Erigeron canadensis*, *Sanguisorba officinalis*, *Rubus plicatus*, *Fragaria vesca* w stężeniu 25 µg/ml, a następnie napromieniano dawką 15 Gy. Poziom ROS oceniano na podstawie intensywności fluorescencji DCF. Wyniki na Rycinie 21 przedstawiono jako ROS [zmiana krotności]. Wykazano, że po napromienieniu poziom ROS w PBMC wzrasta ponad 7-krotnie, a wszystkie cztery PGs mają zdolność ich zmiatania, przy czym znacznie skuteczniejsze w zmiataniu ROS okazały się PGs z *Erigeron canadensis* i *Sanguisorba officinalis* w porównaniu z działaniem PGs z *Rubus plicatus* i *Fragaria vesca*.

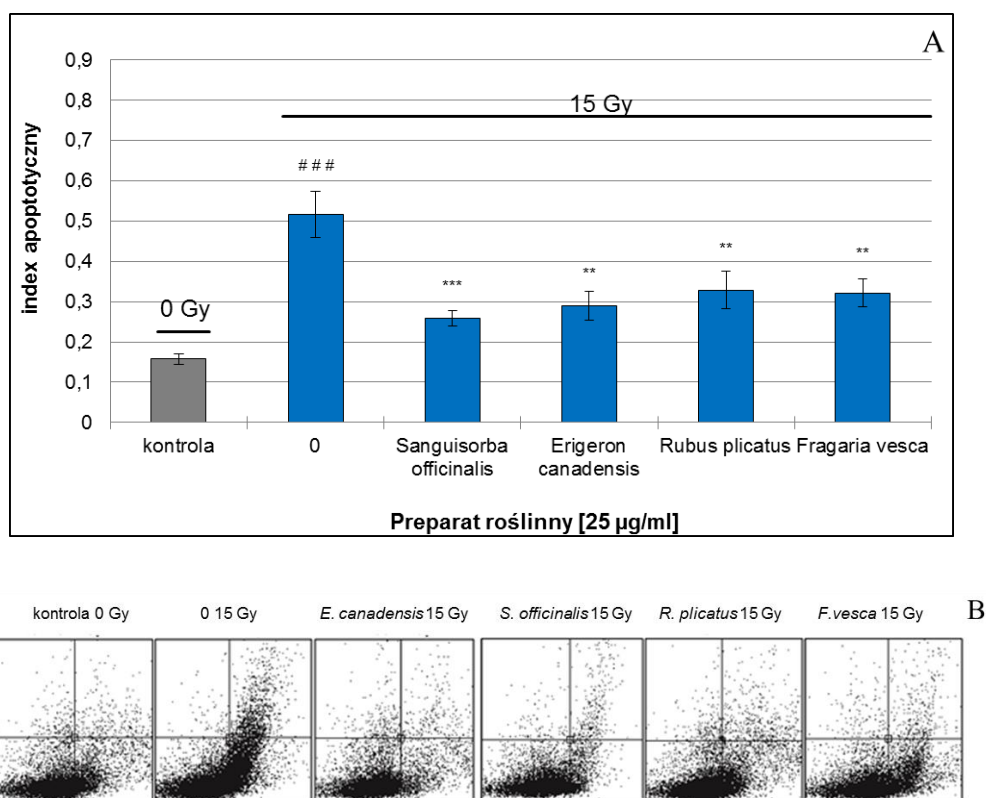


Rycina 21. Wewnątrzkomórkowy poziom ROS w PBMC inkubowanych z PGs z *Erigeron canadensis*, *Sanguisorba officinalis*, *Rubus plicatus*, *Fragaria vesca* i eksponowanych na promieniowanie gamma 15 Gy, wyrażony jako zmiana krotności (ang. fold change); wartości średnie ± SD; n=3, *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 vs bez glikokoniugatu polifenolowego (0)

6.5.6. Apoptoza PBMC

ROS powstające w komórce po napromienieniu, mogą być odpowiedzialne za indukującą apoptozę, toteż w kolejnym etapie pracy dokonano oceny wpływu PGs na apoptozę PBMC metodą cytometrii przepływową. PBMC inkubowano z PGs z *Erigeron canadensis*, *Sanguisorba officinalis*, *Rubus plicatus* i *Fragaria vesca*,

w stężeniu 25 µg/ml, a następnie napromieniano dawką 15 Gy. Wyniki przedstawiono na Rycinie 22. Na podstawie uzyskanych wyników wykazano, że promieniowanie istotnie zwiększa liczbę komórek apoptotycznych. Zaobserwowano, że poziom apoptozy PBMC znacznie się zmniejsza po pre-inkubacji z PGs, przede wszystkim z PG z *Sanguisorba officinalis*, w nieco mniejszym stopniu zPGs z *Erigeron canadensis*, *Rubus plicatus* i *Fragaria vesca* (Rycina 22).

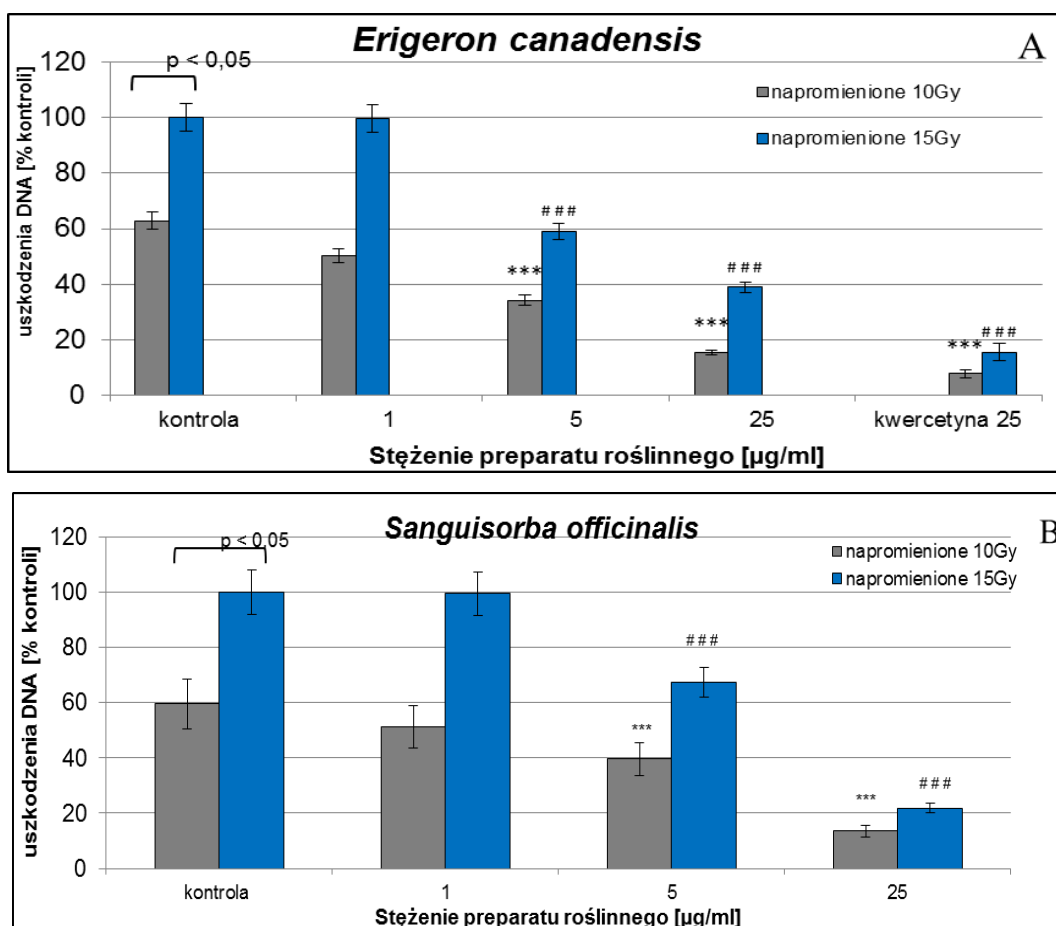


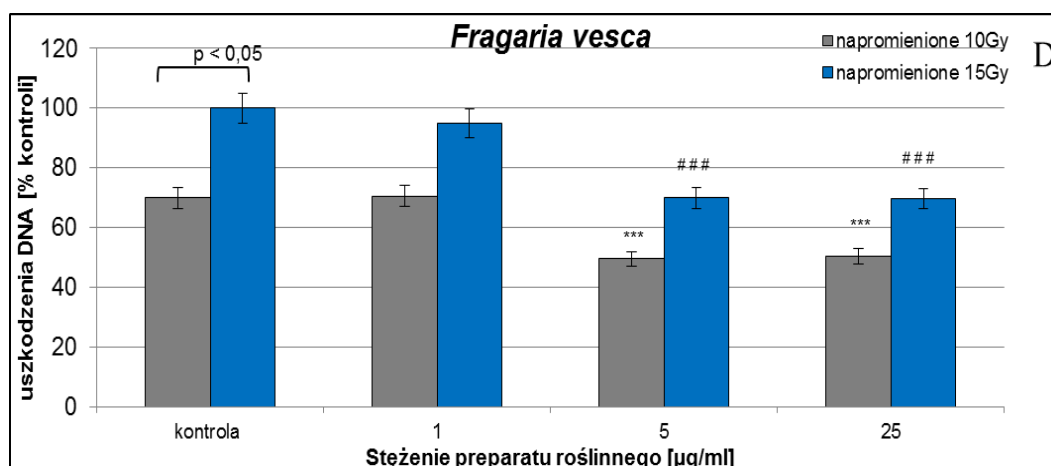
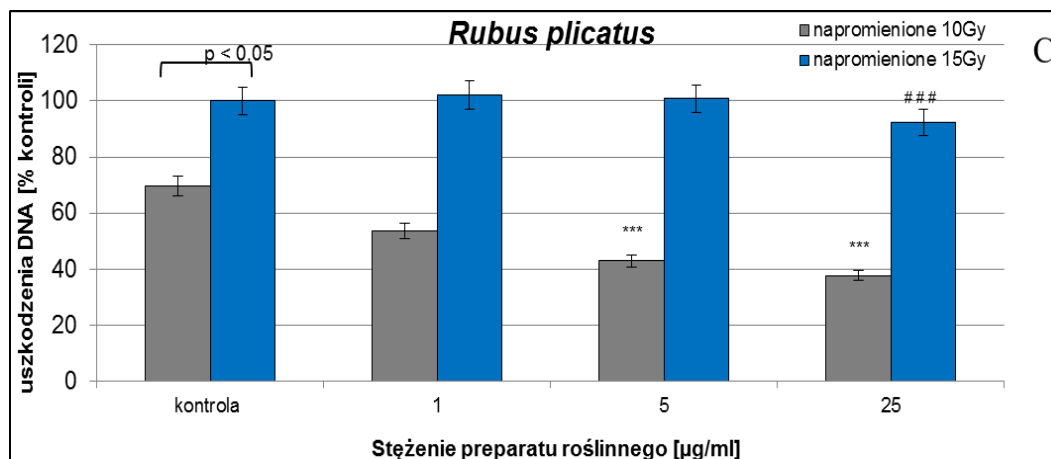
Rycina 22A B. Apoptoza PBMC inkubowanych z PGs z: *Erigeron canadensis*, *Sanguisorba officinalis*, *Rubus plicatus*, *Fragaria vesca*, eksponowanych na promieniowanie gamma 15 Gy; wartości średnie ± SD; n=3; ### p<0,001 vs kontrola (0 Gy); **p<0,01, ***p<0,001 vs bez glikokoniugatu polifenolowego (0)15Gy

6.5.7. Uszkodzenia DNA w PBMC

Udział PGs w hamowaniu powstawania całkowitych uszkodzeń DNA, indukowanych promieniowaniem w PBMC, oznaczano alkaliczną wersją testu kometowego. PBMC inkubowano z PGs z *Erigeron canadensis*, *Sanguisorba officinalis*, *Rubus plicatus*, *Fragaria vesca* (1, 5, 25 µg/ml), a także związkami referencyjnym kwercetyną (25 µg/ml), a następnie napromieniano dawką 10 Gy lub 15 Gy. Wyniki przedstawiono na Rycinie 23, jako uszkodzenia DNA [% kontroli], za 100% przyjęto procentową zawartość DNA w „ogonie” w komórkach napromienionych dawką 15 Gy bez związków roślinnych.

Skutkiem napromieniania dawką 15 Gy jest znacznie wyższy poziom uszkodzeń DNA, w porównaniu z mniejszą dawką 10 Gy (o prawie 40 %; $p < 0,05$). W PBMC inkubowanych z PGs z *Erigeron canadensis* i *Sanguisorba officinalis*, w stężeniu 5 oraz 25 $\mu\text{g/ml}$, ilość uszkodzeń DNA uległa znacząco obniżeniu przy obu dawkach promieniowania, o około 75% przy stężeniu 25 $\mu\text{g/ml}$ i dawce 10 Gy, $p < 0,001$ (Rycina 23A, B). Kwercetyna ma podobną, wysoką skuteczność zapobiegania uszkodzeniom DNA w PBMC, o około 88% dla stężenia 25 $\mu\text{g/ml}$ i dawce 10 Gy, $p < 0,001$ (Rycina 23A). W porównaniu z tymi preparatami roślinnymi zdolność PG z *Fragaria vesca* (Rycina 23D) do hamowania powstawania uszkodzeń DNA w PBMC jest znacznie mniejsza, o około 30% przy obu dawkach promieniowania i stężeniu 25 $\mu\text{g/ml}$, $p < 0,001$. Natomiast efekt ochronny PG z *Rubus plicatus* był znaczący przy dawce 10 Gy (o około 45% dla 25 $\mu\text{g/ml}$ $p < 0,001$), z niewielką ochroną przy większe dawce 15 Gy (Rycina 23 C).

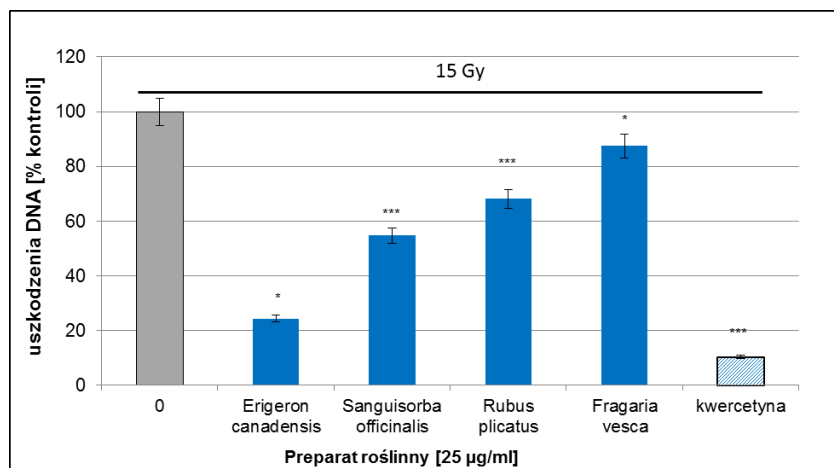




Rycina 23. Uszkodzenia DNA w PBMC inkubowanych z PGs z (A) *Erigeron canadensis* (B) *Sanguisorba officinalis* (C) *Rubus plicatus* (D) *Fragaria vesca* oraz (A) kwercetyną, eksponowanych na promieniowanie gamma 10 Gy i 15 Gy; wartości średnie \pm SD n=6; *** p<0,001 vs kontrola napromieniona 10 Gy; ###p<0,001 vs kontrola napromieniona 15 Gy

6.5.8. Uszkodzenia oksydacyjne zasad DNA w PBMC

Wykonano również alkaliczną wersję testu kometowego z enzymem hOGG1 w celu określenia poziomu modyfikacji oksydacyjnych zasad DNA w PBMC. Komórki inkubowano z PGs z *Erigeron canadensis*, *Sanguisorba officinalis*, *Rubus plicatus* i *Fragaria vesca* oraz kwercetyną, o stężeniu 25 µg/ml, i poddawano napromienianiu dawką 15 Gy. Wyniki przedstawiono na Rycinie 24. PGs z *Erigeron canadensis* silnie hamował powstawanie indukowanych promieniowaniem e uszkodzeń oksydacyjnych zasad w DNA, choć nie tak skutecznie, jak kwercetyna. PGs z *Erigeron canadensis* i *Rubus plicatus* wykazują umiarkowany efekt radioochronny, natomiast najslabsze działanie w tym zakresie zmian wykazuje PG z *Fragaria vesca*.



Rycina 24. Uszkodzenia oksydacyjne zasad DNA w PBMC inkubowanych z PGs z *Erigeron canadensis*, *Sanguisorba officinalis*, *Rubus plicatus*, *Fragaria vesca* oraz kwercetyną eksponowanych na promieniowanie gamma 15 Gy; poziom oksydacyjnych uszkodzeń zasad DNA oznaczano testem kometowym w wersji alkalicznej w obecności hOGG1, wartości średnie \pm SD; n=3; *p<0,05, *** p<0,001 vs bez glikokoniugatu polifenolowego (0)

6.6. Po-radiacyjne działanie PGs w PBMC

6.6.1. Aktywność enzymów antyoksydacyjnych

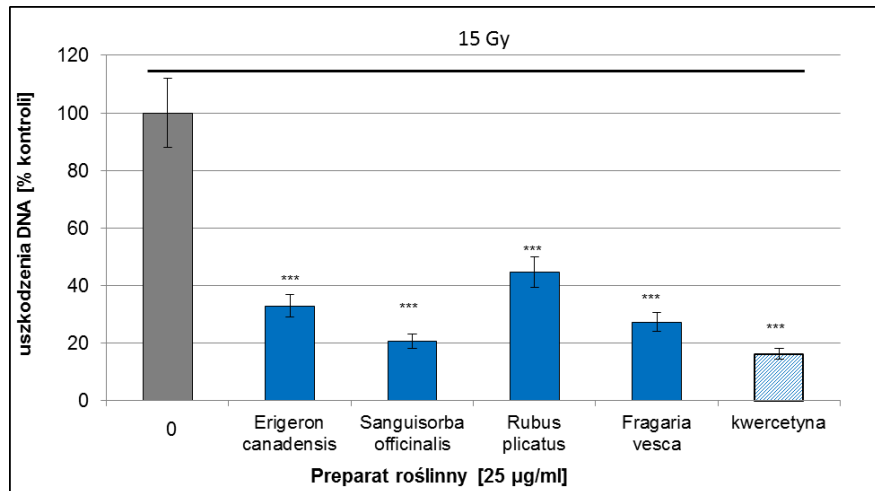
W celu oceny skuteczności po-radiacyjnego działania PGs, komórki jednojądrzaste krwi obwodowej napromieniano dawką 15 Gy, a następnie 15 minut po napromienieniu do komórek dodawano badane PGs, z *Erigeron canadensis*, *Sanguisorba officinalis*, *Rubus plicatus* i *Fragaria vesca* (25 µg/ml) lub kwercetynę i inkubowano przez 1 godz., po czym w lizacie komórkowym oznaczano aktywność wybranych enzymów antyoksydacyjnych, SOD i GST. W PBMC poddanych działaniu promieniowania jonizującego aktywność SOD i GST istotnie spada w porównaniu z komórkami kontrolnymi. Po-radiacyjna inkubacja PBMC z PGs nie wpływała jednak na aktywność GST i SOD. Aktywność obu enzymów pozostała zredukowana w wyniku działania promieniowania (p>0,05). Jedynie po-radiacyjna inkubacja PBMC z kwercetyną wpływała istotnie na aktywność GST i SOD (p<0,05).

Tabela 5. Aktywność SOD i GST w PBMC eksponowanych na promieniowanie gamma 15 Gy, a następnie inkubowanych z PGs z *Erigeron canadensis*, *Sanguisorba officinalis*, *Rubus plicatus*, *Fragaria vesca* oraz kwercetyną; wartości średnie \pm SD; n=6; *p<0,05 vs bez glikokoniugatu polifenolowego (0)

	Aktywność enzymu	
	[% kontroli] \pm SD	
	SOD	GST
0 (bez PG)	72,2 \pm 2,1	75 \pm 1,3
<i>Sanguisorba officinalis</i>	71,4 \pm 1,8	74 \pm 2,1
<i>Erigeron canadensis</i>	73,2 \pm 1,2	74, \pm 1,7
<i>Rubus plicatus</i>	72,3 \pm 1,8	74,4 \pm 1,6
<i>Fragaria vesca</i>	71,0 \pm 2,2	75,2 \pm 2,0
kwercetyna	85,1 \pm 1,9 *	87,3 \pm 2 *

6.6.2. Uszkodzenia DNA w PBMC

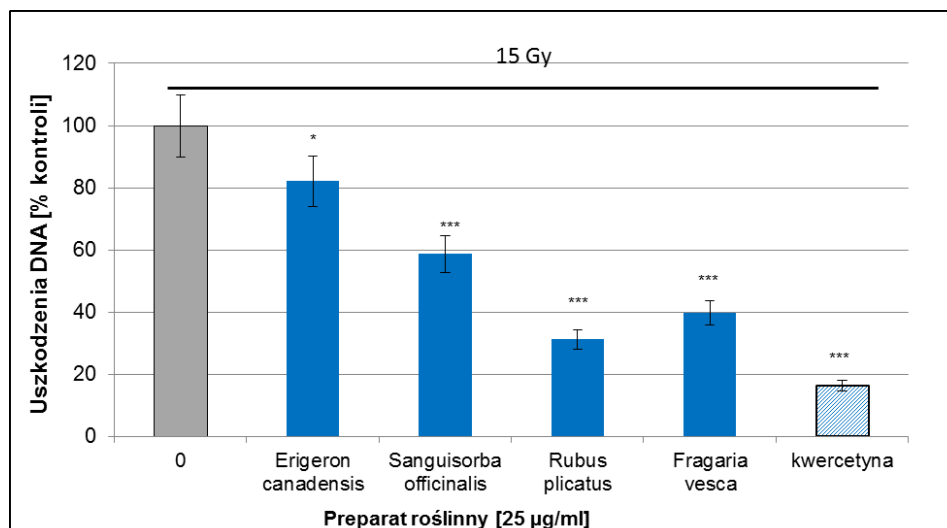
Wykonano alkaliczną wersję testu kometowego w PBMC, do których 15 minut po napromienieniu dawką 15 Gy, dodano PGs z *Erigeron canadensis*, *Sanguisorba officinalis*, *Rubus plicatus* i *Fragaria vesca* lub kwercetynę o stężeniu 25 μ g/ml, (inkubacja przez 1 godz). Wyniki zaprezentowano na Rycinie 25. Po-radiacyjna inkubacja komórek z PGs powoduje statystycznie istotne zmniejszenie zawartości DNA w „ogonie”, przy czym skuteczność radioochronna badanych związków kształtowała się w następującej kolejności malejącej: kwercetyna > PG z *Sanguisorba officinalis* > PG z *Fragaria vesca* > PG z *Erigeron canadensis* > PG z *Rubus plicatus*. Najskuteczniej działający PG z *Sanguisorba officinalis* zmniejszał uszkodzenia DNA aż o około 80% (p<0,001).



Rycina 25. Uszkodzenia DNA w PBMC eksponowanych na promieniowanie gamma 15 Gy, a następnie inkubowanych z PGs z *Erigeron canadensis*, *Sanguisorba officinalis*, *Rubus plicatus*, *Fragaria vesca* oraz kwercetyną; wartości średnie \pm SD; n=3; *** p<0,001 vs bez glikokoniugatu polifenolowego (0)

6.6.3. Uszkodzenia oksydacyjne zasad DNA w PBMC

Wykonano także alkaliczną wersję testu kometowego, w obecności enzymu hOGG1, w PBMC, do których 15 minut po napromienieniu dawką 15 Gy, dodano PGs z *Erigeron canadensis*, *Sanguisorba officinalis*, *Rubus plicatus* i *Fragaria vesca* lub kwercetynę o stężeniu 25 µg/ml (inkubacja przez 1 godz). Wyniki zaprezentowano na Rycinie 26. Zastosowane PGs, jak i kwercetyna zmniejszyły istotnie zawartość DNA w „ogonie” w porównaniu do kontroli. Największy potencjał ochronny wykazała kwercetyna, nieco mniejszy PG z *Rubus plicatus* i *Fragaria vesca* – zmniejszenie uszkodzeń oksydacyjnych zasad, odpowiednio o około 70 i 60% (p<0,001), następnie PG z *Sanguisorba officinalis*, natomiast najsłabsze działanie ochronne wykazano dla PG z *Erigeron canadensis* (p<0,05).



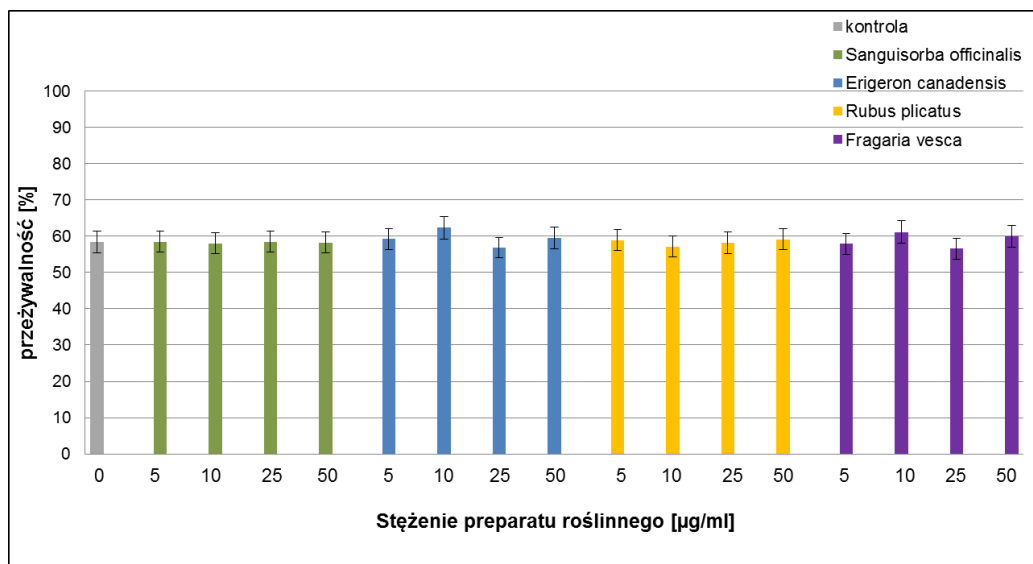
Rycina 26. Uszkodzenia oksydacyjne zasad DNA w PBMC eksponowanych na promieniowanie gamma 15 Gy, a następnie inkubowanych z PGs z *Erigeron canadensis*, *Sanguisorba officinalis*, *Rubus plicatus*, *Fragaria vesca* oraz kwercetyną; poziom oksydacyjnych uszkodzeń zasad DNA oznaczano testem kometowym w wersji alkalicznej w obecności enzymu hOGG1; wartości średnie \pm SD; n=3; *p<0,05, *** p<0,001 vs bez glikokoniugatu polifenolowego (0)

6.7. Ocena radioochronnego działania PGs w komórkach K562

Przeprowadzone wcześniej doświadczenia pozwoliły na ocenę działania radioochronnego wybranych PGs na składniki osocza pochodzącego od zdrowych dawców i na prawidłowe komórki jednojądrzaste krwi obwodowej. W celu ustalenia czy wybrane PGs działają ochronnie na komórki nowotworowe wykonano kolejne doświadczenia na wybranej linii komórek białaczki szpikowej - K562.

6.7.1. Przeżywalność komórek K562

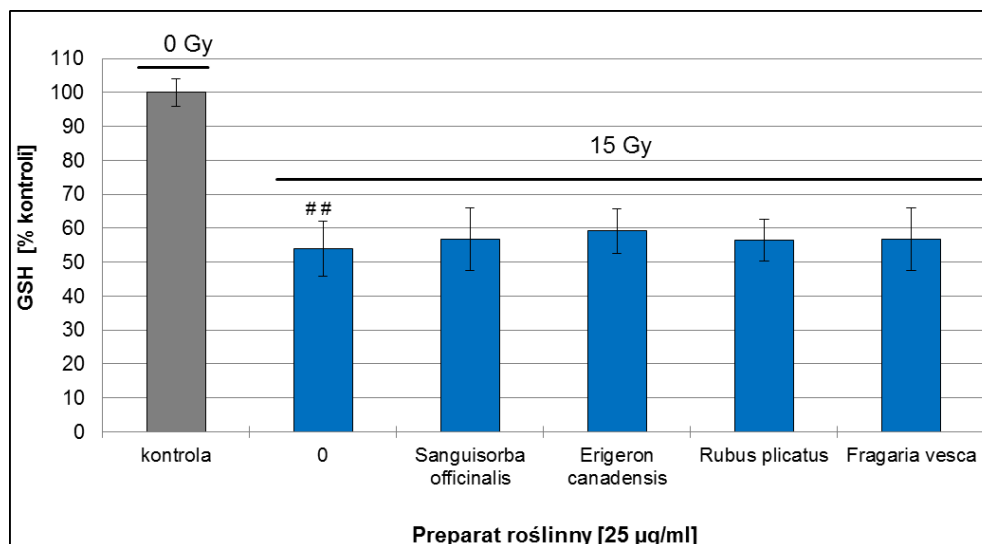
Dokonano oceny przeżywalności komórek K562 po inkubacji z PGs pochodzącymi z *Erigeron canadensis*, *Sanguisorba officinalis*, *Rubus plicatus* i *Fragaria vesca*, w stężeniu 5, 10, 25 i 50 µg/ml, a następnie napromienieniu dawką 15 Gy. Po 2 godzinach po napromienieniu wykonano pomiar przeżywalności na czytniku fluorescencyjnym ADAM MC. Napromienianie zmniejsza istotnie przeżywalność komórek K562 (o ponad 40%), natomiast inkubacja z wybranymi PGs nie wpłynęła na zwiększenie ich przeżywalności (Rycina 27).



Rycina 27. Przeżywalność komórek K562 inkubowanych z PGs z *Erigeron canadensis*, *Sanguisorba officinalis*, *Rubus plicatus*, *Fragaria vesca*, eksponowanych na promieniowanie gamma 15 Gy; wartości średnie \pm SD; n=3

6.7.2. Poziom zredukowanego glutationu w komórkach K562

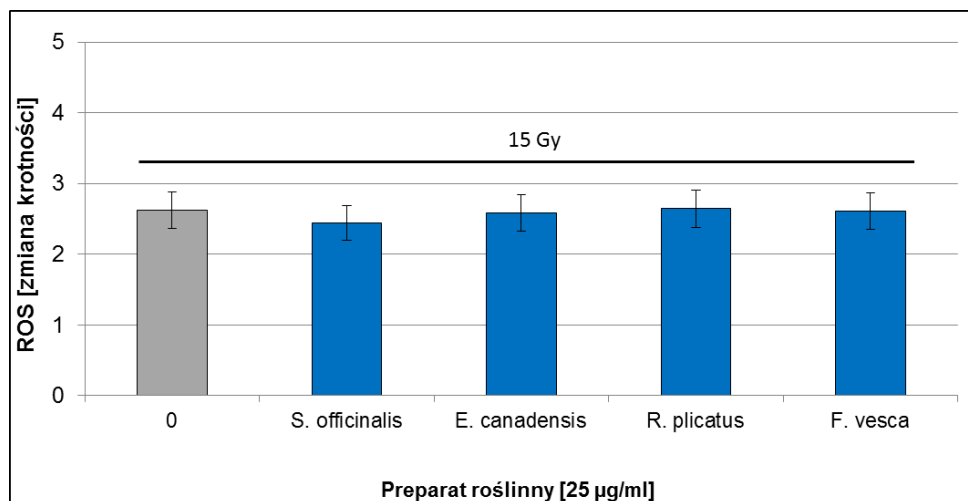
Kolejnym ocenianym parametrem był poziom zredukowanego glutationu oznaczany w komórkach K562, inkubowanych z PGs z *Erigeron canadensis*, *Sanguisorba officinalis*, *Rubus plicatus*, *Fragaria vesca* w stężeniu 25 µg/ml, a następnie napromienianych dawką 15 Gy. Uzyskane wyniki, przedstawione na Rycinie 28, wskazują, że napromienianie powoduje obniżenie poziomu GSH w komórkach K562 (o około 45% w porównaniu do kontroli), natomiast nie stwierdzono wpływu żadnego z badanych PGs na poziom GSH w napromienionych komórkach K562.



Rycina 28. Poziom zredukowanego glutationu w komórkach K562 inkubowanych z wybranymi PGs, z *Erigeron canadensis*, *Sanguisorba officinalis*, *Rubus plicatus*, *Fragaria vesca*, eksponowanych na promieniowanie gamma 15 Gy; wartości średnie \pm SD; n=3; ## p<0,01 vs kontrola (0 Gy)

6.7.3. Wewnątrzkomórkowy poziom ROS w komórkach K562

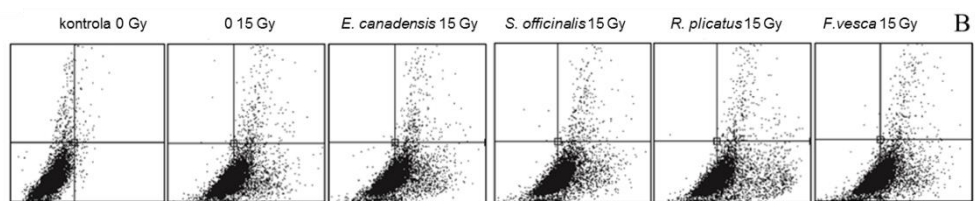
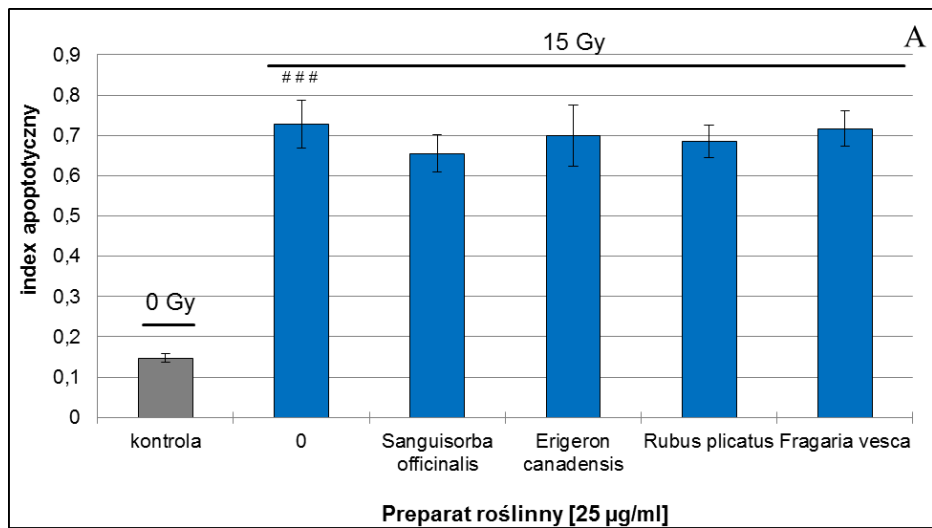
W celu oceny wpływu PGs na indukowane promieniowaniem gamma generowanie ROS w komórkach K562 wykonano pomiar ROS z użyciem fluorescencyjnej sondy H2DCF-DA. Komórki inkubowano z PGs z *Erigeron canadensis*, *Sanguisorba officinalis*, *Rubus plicatus*, *Fragaria vesca* w stężeniu 25 µg/ml, a następnie napromieniano dawką 15 Gy. Poziom ROS oceniano na podstawie intensywności fluorescencji DCF. Wyniki na Rycinie 29 przedstawiono jako ROS [zmiana krotności]. Wykazano, że w napromienionych komórkach K562 poziom ROS wzrasta ponad 2,5-krotnie, inkubacja komórek K562 z PGs nie wpłynęła na zmianę poziomu ROS.



Rycina 29. Wewnątrzkomórkowy poziom ROS w komórkach K562 inkubowanych z PGs z *Erigeron canadensis*, *Sanguisorba officinalis*, *Rubus plicatus*, *Fragaria vesca* i eksponowanych na promieniowanie gamma 15 Gy; wartości średnie \pm SD; n=3.

6.7.4. Apoptoza komórek K562

Ostatnim z ocenianych parametrów było oznaczanie metodą cytometrii przepływowej apoptozy komórek K562 inkubowanych z PGs z *Erigeron canadensis*, *Sanguisorba officinalis*, *Rubus plicatus*, *Fragaria vesca* w stężeniu 25 µg/ml, a następnie napromienianych dawką 15 Gy. Wyniki przedstawione na Rycinie 30 wskazują, że napromienianie indukuje apoptozę komórek K562, natomiast żaden z badanych PGs nie wpływał istotnie na poziom apoptozy komórek K562.



Rycina 30. Apoptoza komórek K562 inkubowanych z PGs z *Erigeron canadensis*, *Sanguisorba officinalis*, *Rubus plicatus*, *Fragaria vesca*, eksponowanych na promieniowanie gamma 15 Gy; wartości średnie \pm SD; n=3; ### p<0,001 vs kontrola (0 Gy)

7. Dyskusja

Promieniowanie gamma, bezpośrednio lub poprzez produkty radiolizy wody, indukuje produkcję ROS, m.in. rodnika hydroksylowego i nadtlenku wodoru, w napromienionym materiale biologicznym (osocze krwi, komórki), prowadząc do powstania stresu oksydacyjnego, który z kolei powoduje oksydacyjne modyfikacje i/lub uszkodzenia DNA, białek i lipidów. Polifenole roślinne, ze względu na silne działanie antyoksydacyjne, ale także aktywność immunostymulującą, przeciwzapalną, czy przeciwbakteryjną, są substancjami, które potencjalnie mogą zmniejszać szkodliwe dla komórek skutki promieniowania, wywołane przez ROS. W badaniach *in vitro* testy służące do oznaczania poziomu peroksydacji lipidów i uszkodzeń DNA czy markery utleniania białek, są powszechnie stosowane zarówno do oceny skutków promieniowania, jak i skuteczności działania związków radioochronnych (Jagetia, 2007) (Prasad i wsp., 2005).

Zasadniczym celem pracy było określenie czy glikokoniugaty polifenolowe, pochodzące z wybranych roślin leczniczych (kwiatostan, liście) z rodziny *Rosaceae*, z krwiściągu pospolitego (*Sanguisorba officinalis* L.), poziomki pospolitej (*Fragaria vesca* L.) i jeżyny fałdowanej (*Rubus plicatus* Whe. et N. E.), a także z przymiotna kanadyjskiego (*Erigeron canadensis* L.), należącego do rodziny *Asteraceae*, wykazują właściwości radioochronne w stosunku do traktowanych promieniowaniem gamma, jednojądrzastych komórek krwi obwodowej człowieka. Selekcji czterech preparatów roślinnych, spośród glikokoniugatów polifenolowych wyizolowanych tą samą metodą z kilkunastu różnych gatunków roślin, należących do rodziny *Asteraceae* (astrowate) i *Rosaceae* (rózowate), dokonano na podstawie wyników wcześniejszych badań przeprowadzonych przez Pawlaczyk i wsp. (Pawlaczyk i wsp., 2003), w których wykazano ich silne działanie przeciwutleniające wobec błon cieni erytrocytów świni, naświetlanych promieniowaniem UV, jak również na podstawie wysokiej, w porównaniu z pozostałymi, wartości całkowitego potencjału antyoksydacyjnego, oznaczonego metodą redukcji kationorodnika ABTS^{•+}. Glikokoniugaty wyizolowane z *Erigeron canadensis* (kwiatostan), *Sanguisorba officinalis* (kwiatostan), *Rubus plicatus* (liście), *Fragaria vesca* (liście) wykazały najwyższą aktywność antyoksydacyjną, co pozwoliło przypuszczać, że związki te mogą działać także jako substancje chroniące przed promieniowaniem jonizującym. Wykazano niewielkie różnice w całkowitej zdolności antyoksydacyjnej między badanymi czterema PGs, i tak wykazały one zdolności przeciwutleniające w następującej kolejności malejącej: *Sanguisorba officinalis* > *Rubus plicatus* ≥ *Erigeron canadensis* > *Fragaria*

vesca (Tabela 4). Kwercetyna jest flawonoidem o dobrze udokumentowanym działaniu radioochronnym *in vitro* (Devipriya i wsp., 2008) (Benkovic i wsp., 2009) i dlatego wybrana została jako związek referencyjny (pozytywna kontrola) w przeprowadzonych badaniach. Według danych literaturowych całkowita zdolność antyoksydacyjna kwercetyny jest 3-krotnie wyższa w porównaniu z typowymi antyoksydantami komórkowymi, askorbinianem i glutationem (Arumugam i wsp., 2006). Kwercetyna bezpośrednio zmiata różne formy ROS i RNS, ma też zdolność chelatowania jonów metali przejściowych (żelaza, miedzi), zapobiegając reakcji Fentona i Haber'a Weissa, co także przyczynia się do silnej aktywności przeciwutleniającej i radioochronnej (Heim i wsp., 2002). Jednak terapeutyczne zastosowanie kwercetyny jak i wielu innych syntetycznych związków polifenolowych jest utrudniona ze względu na ich nierozpuszczalność w wodzie oraz poddawaną pod dyskusję toksyczność (Zhao i wsp., 2016). Uzyskane wyniki wskazują, że PGs są mniej toksyczne niż kwercetyna w zastosowanych stężeniach, które skutecznie hamują indukowaną promieniowaniem gamma peroksydację lipidów osocza i uszkodzenia DNA w PBMC (Rycina 11).

Właściwości przeciwutleniające i radioochronne flawonoidów wynikają z ich budowy pierścieniowej i przede wszystkim z obecności licznych grup hydroksylowych. W tkankach roślinnych flawonoidy występują w formie różnego typu glikozydów (część cukrowa może zawierać cukry, takie jak glukoza, ramnoza, galaktoza, apioza, czy arabinoza), a także w formie aglikonów, które nie zawierają części cukrowej. Reszty cukrowe z aglikonem są połączone za pomocą wiązania O-glikozydowego, najczęściej w pozycji C3, ale także w przy innych atomach węgla (np. C7, C5, C3', C4' i C5') co tym samym blokuje wolne grupy -OH. Są badania *in vitro* wykazujące, że aglikony często są silniejszymi antyoksydantami, w porównaniu z ich glikozydami, ze względu na większą dostępność wolnych grup hydroksylowych, chociaż nie jest to regułą (de Groot i Rauen, 1998) (Tsuda i wsp., 1994) (Wang i wsp., 1997). W pierwszym etapie realizacji celu badawczego dokonano porównania właściwości radioochronnych glikokoniugatów polifenolowych (PGs) i ich aglikonów. Dużą zaletą roślinnych glikokoniugatów polifenolowych jest ich rozpuszczalność w wodzie, co może zwiększać biodostępność i zmniejszać toksyczność tych związków. Ze względu na tę właściwość, jak i na fakt, iż uzyskane wyniki pokazały, że aglikony nie wykazywały dużo większego efektu ochronnego niż PGs, przed peroksydacją lipidów osocza indukowaną promieniowaniem (Rycina 13), a nawet lepszą ochronę przed genotoksycznym działaniem promieniowania w PBMC zapewniały PGs, w porównaniu z ich aglikonami (Rycina 14 A i B), ostatecznie

do dalszych badań wybrano glikokoniugaty. Aglikon pochodzący z *Sanguisorba officinalis* wykazywał wysoką, porównywalną z kwercetyną, zdolność zmiatania kationorodnika ABTS^{•+} (Tabela 3), natomiast rutyna, 3-O-rutynozyd kwercetyny, charakteryzuje się dwukrotnie mniejszą zdolnością zmiatania tego rodniaka. Uzyskane wyniki są zgodne z danymi opublikowanymi przez Apak i wsp. (Apak i wsp., 2004), gdzie, metodą redukcji jonów miedzi (ang. cupric reducing antioxidant capacity; CUPRAC), dla kwercetyny również wyznaczono 2-krotnie wyższą całkowitą zdolność antyoksydacyjną w porównaniu z rutyną. Różnice w CZA rutyny i kwercetyny, mogą być zależne od liczby grup hydroksylowych, gdyż w kwercetynie jest 5, a w rutynie 4 grupy hydroksylowe (Apak i wsp., 2004). Całkowite zdolności antyoksydacyjne syntetycznych polifenoli przekładały się na ich skuteczność w hamowaniu peroksydacji lipidów napromienionego osocza, gdzie prawie 2-krotnie silniejsze działanie wykazano dla kwercetyny (Rycina 13). Znacznie mniejsze różnice występują pomiędzy zdolnościami antyoksydacyjnymi PGs z *Erigeron canadensis* i *Sanguisorba officinalis* a ich aglikonami, co może wskazywać na istotny wpływ części polisacharydowych, które zawierają znaczne ilości kwasów heksuronowych, bogatych w funkcyjne grupy karboksylowe. Spośród czterech badanych glikokoniugatów, preparaty wyizolowane z *Erigeron canadensis* i *Sanguisorba officinalis* charakteryzują się wysoką zawartością kwasów heksuronowych (ponad 70 % wagi części polisacharydowej), analiza składu cukrów sugeruje obecność struktur pektynopodobnych typu arabinoglukogalakturonianu w PG z *Erigeron canadensis* oraz galaktoarabinogalakturonianu w PG z *Sanguisorba officinalis* (Tabela1) (Zbikowska i wsp., 2016). Porównywalna, a nawet większa w przypadku przeciwdziałania powstawaniu uszkodzeń DNA aktywność radioochronna PGs, w porównaniu z ich formami aglikonowymi, może sugerować, że część polifenolowa i polisacharydowa struktury glikokoniugatu wykazują efekt synergistyczny. Części polisacharydowe mogą bezpośrednio zwiększać radioochronną skuteczność całego glikokoniugatu. Jest wiele dostępnych danych świadczących o radioprotekcyjnym działaniu polisacharydów pochodzących z naturalnych źródeł. Przykładem może być acemannan wyekstrahowany z liści aloesu (Roberts i Travis, 1995), mannuronian wytwarzany przez bakterie *Pseudomonas aeruginosa* (Halaas i wsp., 1997), glukan wyizolowany ze ściany komórkowej drożdży *Saccharomyces cerevisiae* (Patchen i wsp., 1992) czy też częściowo oczyszczona wodna frakcja, zawierająca dużą zawartość frukto-oligosacharydów, wyizolowana z korzeni *Asparagus racemosus* (Thakur i wsp., 2012). Wymienione polisacharydy głównie wykazywały działanie immunostymulujące, indukujące

wydzielanie cytokin lub ich aktywność radioochronna polegała na pobudzaniu procesów hematopoezy. Natomiast frukto-oligosacharydy pochodzące z *Asparagus racemosus* chroniły błony mitochondriów wątroby szczura przed uszkodzeniami indukowanymi przez wolne rodniki powstające podczas napromieniania promieniowaniem gamma. Dokładny mechanizm, za pomocą którego polisacharydy mogą działać przeciwutleniająco i radioochronnie nie jest jeszcze dobrze poznany. Badania przeprowadzone przez Tsiapali i wsp. sugerują, że glukan wykazuje umiarkowaną aktywność antyoksydacyjną jako dawca protonu, ponieważ wolne rodniki reagują z protonem wodoru przy anomerycznym atomie węgla cząsteczki tego polisacharydu (Tsiapali i wsp., 2001). Wykazano też, że niektóre polisacharydy, takie jak chitosan lub alginian, mogą tworzyć kompleksy z kwasami nukleinowymi (Nitta i Numata, 2013), jak również są doniesienia, w których wykazano działanie antymutagenne i antygenotoksyczne drożdżowych i roślinnych polisacharydów (Kogan i wsp., 2008), tj. β -glukan wyizolowany z *Ganoderma lucidum*, który chronił DNA napromienionych limfocytów przed jedno- i dwu-niciowymi pęknięciami, a także indukował procesy naprawy DNA (Pillai i wsp., 2014). Innym wyjaśnieniem większej skuteczności w radioochronie DNA badanych PGs, w porównaniu a ich aglikonami, może być fakt, że części polisacharydowe, zawierające heksuroniany są ujemnie naładowane co mogłoby ułatwiać transport PGs przez błonę (np. poprzez aktywne transportery), co może zwiększać ich biodostępność. Jak dotąd nie zostało wyjaśnione czy makrocząsteczki badanych glikokoniugatów (m. cząsteczkowa > 10 kDa) mogą wnikać do komórek. Wstępne badania przeprowadzone przez zespół Pawlaczyk i wsp. sugerują, że związki te mogą oddziaływać z zewnętrzną powierzchnią błony erytrocytów (Kolber i wsp. 2007). Taki sposób oddziaływania PGs z komórkami byłby zgodny z ogólnie przyjętą hipotezą, popartą wynikami wielu badań, według której biologiczna aktywność polifenoli, w tym flawonoidów, jest uzależniona od ich interakcji z błoną komórkową, przy czym niektóre polifenole zwiększają sztywność błony, a inne powodują zwiększenie płynności błony. Od rodzaju polifenolu (m.in. od ilości grup hydroksylowych w pierścieniach) i niewielkich zmian pH lokalnego środowiska zależy także głębokość penetracji błony komórkowej przez polifenole (Phan i wsp. 2014) (Tarahovsky i wsp. 2014). Nie można wykluczyć, że podczas napromieniania zarówno część polifenolowa, jak i polisacharydowa struktury glikokoniugatu może ulegać pewnym modyfikacjom i/lub częściowej degradacji, ale być może takie produkty mogą nadal wykazywać działanie radioochronne.

W dalszych badaniach przeprowadzonych na modelu badawczym *in vitro* z wykorzystaniem osocza krwi ludzkiej potwierdzono antyoksydacyjne (ochronne) działanie glikokoniugatów polifenolowych. Promieniowanie gamma powoduje zmniejszenie całkowitej zdolności antyoksydacyjnej osocza z powodu utleniania endogennych antyoksydantów, przede wszystkim albuminy (która jest nie tylko antyoksydantem, ale też głównym źródłem grup -SH w osoczu), a także kwasu moczowego, askorbinianu i innych. Uzyskane wyniki wykazały, że PGs przywracają równowagę oksydacyjno-antyoksydacyjną w napromienionym osoczu, poprzez zwiększenie całkowitej zdolności antyoksydacyjnej (Rycina 15), a także zapobiegają utlenianiu białek osocza pod wpływem promieniowania (100 Gy) (Rycina 16). Ekspozycja białek na promieniowanie gamma prowadzi do ich utleniania, co może zmieniać właściwości fizyczne i strukturę chemiczną białek, prowadząc do utraty ich funkcji biologicznych (Shacter, 2000) (Headlam i Davies, 2002). Dostępne są badania świadczące o tym, ekspozycja osocza krwi na promieniowanie gamma powoduje wytwarzanie wodoronadtlenków i grup karbonylowych w białkach osocza (Gebicki i Du, 2000) (Gay i Gebicki, 2003) (Headlam, 2004). Tirole osocza, zarówno białkowe jak i małocząsteczkowe, są także utleniane do disiarczków i sulfotlenków bezpośrednio lub poprzez produkty radiolizy wody (Bindoli i wsp., 2008). Z uwagi na fakt, że powstające wodoronadtlenki białek są bardzo nie stabilne, a oznaczanie poziomu grup karbonylowych (metodą ELISA) dawało niewiarygodne wyniki, prawdopodobnie z powodu obecności grup aldehydowych, ketonowych, czy karboksylowych w cząsteczkach samych badanych glikokoniugatów polifenolowych, pomiar poziomu całkowitych tioli wybrano jako marker utleniania białek. Oprócz PG pochodzącego z *Fragaria vesca*, pozostałe trzy PGs skutecznie chroniły białka osocza przed mniejszą dawką promieniowania (100 Gy), jednakże nie zaobserwowano efektu ochronnego w osoczu po ekspozycji na dawkę promieniowania 500 Gy, nawet przy wysokim stężeniu PGs (750 µg/ml). Prawdopodobnie wyższa dawka promieniowania może prowadzić do tworzenia nie tylko disiarczków, których tworzenie jest procesem odwracalnym (np. w obecności GSH), ale także do utworzenia innych, nieodwracalnych produktów z atomem siarki na wyższych stopniach utlenienia, albo też szybkość tworzenia się disiarczków jest większa niż zmiatanie ROS przez PGs. Wyniki te potwierdzają hipotezę, że właściwości radioochronne fitozwiązków dotyczą przede wszystkim małych dawek promieniowania, które są stosowane terapeutycznie (np. podczas radioterapii stosowane są miejscowo jednorazowe dawki rzędu 1 Gy w cyklu przez okres paru

tygodni). Ogólnie, naturalnie występujące radioprotektory chronią tylko przy niskich dawkach promieniowania, w przeciwieństwie do związków radioochronnych uzyskiwanych na drodze syntezy chemicznej, które są skuteczne w szerszym zakresie dawek promieniowania, ale jednocześnie są toksyczne (Weiss i Landauer, 2000).

Głównym materiałem badawczym stosowanym w realizacji celów pracy były komórki jednojądrzaste krwi obwodowej człowieka, które są standardowym modelem do monitorowania poradiacyjnych uszkodzeń *in vitro*. Poradiacyjne zmiany zachodzące w PBMC są adekwatne do odpowiedzi komórkowej po ekspozycji na niskie dawki promieniowania *in vivo*. Promieniowanie jonizujące jest czynnikiem cytotoksycznym, napromienienie dawką 15 Gy przeżywało tylko około 60% PBMC. Uzyskane wyniki wskazują, że PGs, w szczególności pochodzące z *Sanguisorba officinalis* i *Erigeron canadensis*, istotnie zwiększały odsetek żywych komórek po napromienieniu (Rycina 17). Przy zastosowanej dawce promieniowania optymalne stężenie PGs, zapewniające maksymalną ochronę wynosiło 25 µg/ml.

Jedną z przyczyn cytotoksycznego działania promieniowania gamma na komórki jest stres oksydacyjny, którego przejawem jest zużycie endogennego enzymatycznego i nieenzymatycznego systemu antyoksydacyjnego, peroksydacja lipidów błony, a także oksydacyjne uszkodzenia DNA. Napromienianiu PBMC towarzyszyła redukcja aktywności SOD i GST (Rycina 19), a także drastyczne obniżenie poziomu GSH (Rycina 20). Spadek aktywności dwóch z głównych enzymów antyoksydacyjnych mógł być spowodowany interakcją białek enzymatycznych z powstałymi rodnikami. Badania przeprowadzone przez Shi i wsp. wykazały, że hamowanie aktywności SOD poprzez reakcję cząsteczki białka enzymu z rodnikami hydroksylowymi i hydroksyetylowymi było związane z alkilacją reszt aminokwasowych łańcucha bocznego białka lub też z przeniesieniem elektronu na atom miedzi grupy prostetycznej SOD, co w obu przypadkach prowadziło do inaktywacji enzymu (Shi i wsp., 2008). S-transferazy glutationowe odgrywają istotną rolę w detoksykacji ROS i w redukcji 4-hydroksynonenalu (4-HNE), produktu peroksydacji lipidów, przez sprzężenie ze zredukowanym glutationem (Yang i wsp., 2001). Glikokoniugaty polifenolowe obecne podczas napromieniania PBMC mogą chronić aktywność SOD i GST raczej poprzez ochronę białka enzymów przed modyfikacją oksydacyjną spowodowaną działaniem rodników, aniżeli przez wpływ na syntezę enzymów, ponieważ inkubacja PBMC z PGs po napromienieniu nie skutkowała istotnym wpływem na aktywność badanych enzymów (Tabela 5). Przeprowadzone badania wskazują, że wszystkie badane PGs, w niewielkim stopniu, chroniły PBMC także przed

spadkiem poziomu zredukowanego glutationu (Rycina 20). Glutation odpowiada za łagodzenie stresu oksydacyjnego poprzez zmiatanie wolnych rodników, utrzymywanie równowagi pomiędzy tiolami, a dwusiarczkami, za syntezę prekursorów DNA, syntezę porfiryn i utrzymywanie odpowiedniego poziomu ATP, co zapobiega uszkodzeniom komórki. GSH może działać bezpośrednio, poprzez grupy tiolowe łącząc się z ROS, a sam ulega wtedy utlenieniu do disulfidu glutationu (GSSH), a także pośrednio uczestnicząc w reakcjach katalizowanych przez enzymy, m. in. peroksydazy glutationowe, transferazy glutationowe, czy tranferazę γ -glutamylową. Radioochronne działanie egzogennych antyoksydantów (takich jak melatonina i likopen) polegało m. in. na zapewnianiu utrzymania odpowiedniego stężenia GSH oraz podwyższaniu stężenia transferazy- γ -glutamylowej w komórkach (Hosseinimehr, 2010). Odpowiednie stężenie GSH pomaga utrzymać równowagę redoks, chroni komórki przed stresem oksydacyjnym i zapobiega uszkodzeniom kluczowych makromolekuł (Jagetia, 2007) (Maurya i wsp., 2006).

W DNA komórek eksponowanych na promieniowanie gamma dochodzi do modyfikacji oksydacyjnych zasad azotowych, utraty puryn i pirymidyn skutkujących powstawaniem miejsc pozbawionych zasad lub uszkodzeniem dezoksyrybozy, a także do pęknięć jedno- i dwuniciowych. PGs mogą wpływać na różne procesy komórkowe w celu ochrony DNA PBMC przed uszkodzeniami wywołanymi promieniowaniem. Skutkiem działania promieniowania jest też peroksydacja lipidów, która prowadzi do powstawania produktów końcowych, takich jak, m.in. MDA i 4-hydroksynonenal (4-HNE). Konsekwencją peroksydacji lipidów z kolei może być uszkodzenie fosfolipidów błony PBMC. Natomiast powstające aldehydy (MDA, 4-HNE) mogą tworzyć addukty z komórkowym DNA, które są toksyczne i odgrywają istotną rolę w mutagenезie i kancerogenезie. Biorąc pod uwagę, że produkty końcowe peroksydacji lipidów mogą uszkadzać DNA (Łuczaj i Skrzydlewska, 2003), silne hamowanie tego procesu przez PGs, w szczególności z *Erigeron canadensis*, *Sanguisorba officinalis* i *Rubus plicatus* (Rycina 18) może również pośrednio przyczyniać się do zmniejszenia uszkodzeń oksydacyjnych DNA w PBMC (Rycina 24). Całkowity poziom uszkodzeń DNA, jak i poziom uszkodzeń oksydacyjnych zasad azotowych, powstających pod wpływem promieniowania, można śledzić za pomocą testu kometowego w wersji alkalicznej, przeprowadzonego odpowiednio bez enzymu oraz w obecności glikozydazy 8-oksoguaniny (OGG1). PBMC inkubowano z PGs zarówno przed, jak i w innym doświadczeniu, po ekspozycji komórek na promieniowanie. Inkubacja PBMC z PGs przed napromienieniem powodowała istotną, zależną od stężenia, redukcję uszkodzeń DNA (Rycina 23), przy czym PGs izolowane

z kwiatostanów *Erigeron canadensis* i *Sanguisorba officinalis* zapewniały lepszą ochronę DNA w porównaniu z preparatami pochodzącymi z liści *Rubus plicatus* i *Fragaria vesca*. W wielu gatunkach roślin zawartość polifenoli w kwiatach jest większa w porównaniu do ich występowania w pozostałych częściach (łodygach, liściach czy korzeniach (Karkanis i wsp., 2014). W przypadku badanych PGs, ich aktywność radioochronna może być uzależniona od całkowitej zawartości fenoli. Najniższą całkowitą zawartość fenoli oznaczono w PG wyizolowanym z *Fragaria vesca* (Pawlaczyk i wsp., 2009) (Tabela 1). Całkowita zdolność antyoksydacyjna PG z *Fragaria vesca*, mierzona metodą redukcji kationorodnika ABTS, również była najniższa spośród preparatów roślinnych użytych w badaniach. Chociaż TAC i ilość fenoli w preparacie z *Rubus plicatus* były porównywalne z glikokoniugatami pochodzącymi z *Erigeron canadensis* oraz *Sanguisorba officinalis*, PG z *R. plicatus* chronił DNA PBMC przed uszkodzeniami tylko przy mniejszej dawce promieniowania 10 Gy (Rycina 23C). Jednym z możliwych wyjaśnień obserwowanego braku ochrony przed dawką 15 Gy w tym przypadku jest to, że być może napromienianie PG z *Rubus plicatus* (razem z komórkami) po przekroczeniu dawki 10Gy może skutkować powstawaniem produktów degradacji/metabolitów, które mogą być genotoksyczne. Ogólnie wiadomo, że zdolność radioprotekcyjna danego polifenolu jest uzależniona od jego struktury chemicznej, która jest również odpowiedzialna za stabilność reaktywnych rodników. Mniej stabilne rodniki powstające podczas reakcji cyklu redoks, mogą propagować szkodliwe reakcje rodnikowe (Kapiszewska i wsp., 2005). Na skuteczność ochrony DNA PBMC przez badane PGs duży wpływ ma struktura części polifenolowej ich cząsteczek. PG z *Erigeron canadensis* zawiera szczególnie wysoką zawartość jednostek kwasu ferulowego (38,93%), podczas gdy PG z *Sanguisorba officinalis* ma w swojej strukturze największą zawartość jednostek typu syringolu (52,25%), w których zawartość kwasu syringowego, wykazującego wysoką reaktywność w kierunku wychwytywania wolnych rodników, wynosi aż 24,10% (Tabela 2). PGs izolowane z *Rubus plicatus* i *Fragaria vesca* wykazywały mniejszą skuteczność ochrony przed indukowanym promieniowaniem stresem oksydacyjnym, prawdopodobnie ze względu na strukturę zbudowaną głównie z mniej reaktywnych (z mniejszą skutecznością zmiatających wolne rodniki) jednostek typu fenolu (29,82% dla *Rubus plicatus* i 44,40% dla *Fragaria vesca*).

Podsumowując, podawane przed napromienieniem PGs, wyizolowane z kwiatostanów *Sanguisorba officinalis* i *Erigeron canadensis*, mogą pełnić ważną rolę w ochronie prawidłowych komórek przed skutkami promieniowania ze względu na ich zdolność do

zmniejszenia stresu oksydacyjnego oraz aktywność przeciwgenotoksyczną, co potwierdzałoby założoną hipotezę, że główny mechanizm radioochronny badanych PGs wynika z ich aktywności przeciwutleniającej. Radioochronne działanie flawonoidów polega, na tym, że flawonoid może być dawcą elektronu i /lub protonu wodoru, który przekazuje w miejsce uszkodzenia DNA (np. na rodnik zasady azotowej, czy deoksyrybozy) (Anderson i wsp., 2000), między innymi, taką bezpośrednią interakcję katechin wykazano z rodnikami plazmidu DNA *in vitro* (Anderson i wsp., 2001). Ponieważ związki roślinne mają zdolność neutralizowania rodników, ich antyoksydacyjne działanie może prowadzić do szybkiej chemicznej naprawy DNA, co zmniejsza poziom uszkodzeń zasad i pęknięć nici DNA. Wcześniejsze badania potwierdziły podobną szybką naprawę oksydacyjnych uszkodzeń DNA przez glikozydy fenylopropanoidowe i ich pochodne w doświadczalnych układach bezkomórkowych (Shi i wsp., 2008).

Związki roślinne o właściwościach radioochronnych prawie zawsze wykazują właściwości przeciwutleniające (Arora i wsp., 2005) (Paul i wsp., 2011). Inne natomiast mechanizmy mogą być odpowiedzialne za po-radiacyjne działanie ochronne PGs. Wszystkie badane PGs skutecznie zmniejszały poziom uszkodzeń DNA gdy dodawano je do PBMC po napromienieniu (Rycina 25), chociaż najskuteczniejsze działanie, porównywalne z kwercetyną, odnotowano dla PG z *Sanguisorba officinalis*. Najmniejszy poziom uszkodzeń oksydacyjnych zasad azotowych zaobserwowano po inkubacji, uprzednio napromienionych PBMC, z glikokoniugatami z *Rubus plicatus* i *Fragaria vesca* (Rycina 26). Zmniejszanie skutków promieniowania (działanie glikokoniugatów jako „mitygatory”) można przynajmniej częściowo wyjaśnić ich modulującym działaniem na szlaki naprawy DNA. Oksydacyjne modyfikacje/uszkodzenia zasad DNA, indukowane promieniowaniem, są usuwane głównie poprzez naprawę BER czyli wycinanie zasad. Flawonoidy takie jak miryscytyna, bajkalina stymulowały naprawę uszkodzeń oksydacyjnych DNA w hepatocytach i fibroblastach (Morel i wsp., 2001) (Chen i wsp., 2003). Naringenina, flawonoid występujący w cytrusach, także stymulował naprawę uszkodzeń oksydacyjnych DNA w komórkach raka prostaty (LNCaP) (Gao i wsp., 2006). Ponadto, zwiększenie intensywności naprawy DNA było związane ze zwiększoną ekspresją mRNA trzech enzymów naprawy BER, hOGG1, endonukleazy apurynowej/apirymidynowej (APE) i β -olimerazy DNA. Natomiast galusan epikatechiny i apigenina nie wykazywały aktywności stymulującej naprawę DNA (Gao i wsp., 2006). Oznacza to, że substancje obecne w preparatach roślinnych mogą wykazywać działanie radioochronne na DNA PBMC przez wzmocnienie mechanizmów naprawy DNA, głównie przez indukcję

enzymów biorących udział w BER lub innych mechanizmach naprawy DNA. Odpowiedź na pytanie jakie dokładnie mechanizmy są odpowiedzialne za poradiacyjne działanie ochronne PGs wymaga jeszcze dalszych badań.

Podwyższony wewnątrzkomórkowy poziom ROS oraz nie naprawione uszkodzenia DNA, szczególnie pęknięcia dwuniciowe, są rozpoznawane przez specyficzne białka szlaku DDR, w którym różne mechanizmy ostatecznie kierują komórkę na jeden ze szlaków śmierci. Chociaż w zależności od warunków napromieniania, rodzaju komórki i innych czynników mogą zachodzić różne typy śmierci komórkowej, przyjmuje się, że promieniowanie jonizujące najczęściej indukuje śmierć mitotyczną (katastrofa mitotyczna) w komórkach nowotworowych guzów litych, natomiast limfocyty (stanowiące główną frakcję komórek jednojądrzastych krwi obwodowej), jak i komórki nowotworów hematologicznych umierają przede wszystkim śmiercią apoptotyczną (Boulton i wsp., 2013) (Eriksson i Stigband, 2010). Wzrost poziomu ROS i stres oksydacyjny, czy uszkodzenia DNA inicjują apoptozę na szlaku wewnątrzpochodnym, zależnym od mitochondriów. Przedstawione wyniki badań dowodzą, że PBMC w wyniku napromieniania ulegały apoptozie (Rycina 22). PGs skutecznie zmniejszyły stres oksydacyjny w napromienionych PBMC (Ryciny 18-21), co ostatecznie zwiększało przeżywalność komórek. Dodanie do komórek przed napromienianiem wybranych preparatów roślinnych, w szczególności PGs z *Sanguisorba officinalis*, a także *Erigeron canadensis* (Rycina 22) spowodowało, że mniejszy odsetek PBMC uległ apoptozie.

Radioprotektor w przypadku wykorzystania terapeutycznego (radioterapia) przede wszystkim musi działać selektywnie czyli nie wpływać na promienioczułość komórek nowotworowych przy jednoczesnej ochronie komórek prawidłowych. W celu sprawdzenia czy wybrane PGs wykazują selektywność działania, w ostatnim etapie pracy dokonano oceny radioochronnego działania PGs w wybranej linii komórek białaczki szpikowej - K562. Uzyskane wyniki wskazują, że PGs zwiększają przeżywalność PBMC narażonych na promieniowanie jonizujące, natomiast inkubacja PGs z komórkami K562 nie wpływa na przeżywalność tych komórek po napromienianiu (Rycina 27). Dodanie PGs do komórek nowotworowych również nie miało wpływu na poziom GSH (Rycina 28), ani na poziom ROS (Rycina 29) po napromienianiu, ani na apoptozę tych komórek. W komórkach białaczkowych K562 poziom GSH, oznaczony metodą spektrofluorymetryczną z OPA, był dwukrotnie wyższy ($53,97 \pm 2,4 \mu\text{M}$), w porównaniu z PBMC ($27,40 \pm 1,62 \mu\text{M}$) (te wyniki nie były prezentowane w części opisującej wyniki, ponieważ zmiany poziomu GSH przedstawiono jako % kontroli, gdzie za 100% przyjmowano stężenie GSH w komórkach

nie napromienionych). Trudno jest wyjaśnić na tym etapie badań brak wpływu PGs na napromienione komórki K562. Wydaje się, że wysoki poziom endogennego antyoksydanta (GSH) może być odpowiedzialny za brak odpowiedzi tych komórek na inkubację z egzogennym antyoksydantem (PG). Wyższy poziom GSH jest często spotykany w komórkach nowotworowych różnych typów, co wiąże się zwykle ze zjawiskiem oporności tych komórek na chemio- i radioterapię, ponieważ są one m. in. bardziej odporne na apoptozę. Wysoki poziom GSH w komórkach K562 jest także spowodowany odpowiedzią tych komórek na wzmożony stres oksydacyjny. Badania przeprowadzone przez Błasiak i wsp. wykazały, że komórki nowotworowe zawierające zmutowany gen fuzyjny *BCR-ABL* charakteryzują się zmienionym metabolizmem oksydacyjnym, występuje w nich permanentny stres oksydacyjny, w którym szlak DDR jest stale pobudzony (Błasiak i wsp., 2017). Komórki K562 są erytroleukemiczną linią komórek multipotencjalnych, o zdolności do różnicowania się w kierunku erytrocytów, megakariocytów oraz w mniejszym stopniu w kierunku monocytów. Komórki te posiadają chromosom Filadelfia, w wyniku translokacji pomiędzy chromosomem 9 i 22: t(9;22)(q34,q11). Efektem translokacji jest przeniesienie protoonkogenu *c-abl*, który koduje kinazę tyrozynową z chromosomu 9 na chromosom 22, w pozycję za drugim eksonem genu *bcr*, powstający gen fuzyjny, *bcr-abl*, koduje białko chimeryczne, p210 BCR-ABL. Białko p210 BCR-ABL wykazuje podwyższony poziom aktywności ABL. Kinaza p210 BCR-ABL aktywuje przejście z fazy G1 do fazy S cyklu komórkowego (Czyż i Szulawska, 2005). Badania Martin i wsp., wykazały, że linia komórkowa K562 jest w pewnym stopniu oporna na apoptozę, niezależnie od stosowanego induktora (Martin i wsp., 1990). Wyniki w przedstawionej pracy dowodzą, że komórki K562 w zastosowanym układzie badawczym *in vitro*, w wyniku napromieniania dawką 15 Gy ulegały apoptozie, nawet w nieco większym stopniu niż PBMC, natomiast żaden z badanych PGs nie chronił komórek nowotworowych przed apoptozą (Rycina 30). Porównując wpływ napromieniania na wewnątrzkomórkowy poziom ROS, oznaczany przy użyciu sondy fluorescencyjnej H2DCF-DA, w komórkach prawidłowych (PBMC) i K562, wyraźnie widać, że wzrost poziomu ROS w napromienionych komórkach nowotworowych był prawie 3-krotnie mniejszy, prawdopodobnie ze względu na wysoki poziom endogennego GSH (Rycina 21 i 29). Mimo że zarówno PBMC, jak i K562 były podatne na apoptozę indukowaną dawką promieniowania 15 Gy mechanizm aktywacji szlaków apoptotycznych w obu typach komórek nie był jednakowy. W regulacji apoptozy kluczową rolę pełni czynnik transkrypcyjny, białko p53, które na skutek stresu oksydacyjnego, czy

uszkodzenia DNA ulega fosforylacji i tak aktywowane białko p53 indukuje, m.in. ekspresję genu bax, którego produkt (białko Bax) stymuluje apoptozę. W wielu nowotworach, w tym także w komórkach K562 w wyniku mutacji genu białko p53 jest nieaktywne. Wobec tego obserwowana apoptoza komórek K562 nie może zachodzić na szlaku wewnątrzpochodnym, zależnym od p 53, ale inne szlaki indukcji apoptozy muszą być zaangażowane w ten proces. Wyniki badań przeprowadzonych przez Hosseinimehr także wykazały, selektywne właściwości radioochronne flawonoidów (Hosseinimehr, 2010). W badaniach *in vitro* i *in vivo* oceniano zdolność flawonoidów do degradacji komórek nowotworowych przy jednoczesnym działaniu ochronnym na komórki nienowotworowe, podczas ekspozycji na promieniowanie jonizujące. Wykazano, że genisteina i kwercetyna chronią komórki prawidłowe przed uszkodzeniami DNA, natomiast w komórkach nowotworowych wykazują działanie genotoksyczne, poprzez zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G2/M, przyspieszają śmierć apoptotyczną (Hosseinimehr i wsp., 2010). W modelu zwierzęcym genisteina wykazuje działanie immunomodulujące i radioochronne zwiększając przeżywalność napromienionych myszy poprzez pobudzenie neutrofilii, regenerację płytek krwi i ochronę komórek macierzystych układu krwiotwórczego. Wykazano także, że resweratrol hamuje apoptozę wywołaną promieniowaniem, aktywując sirtuiny I, mające znaczenie w ochronie neuronów (Li i wsp., 2014). Ponadto istnieją wyniki badań świadczące o tym, że resweratrol posiada właściwości radioczułające komórki nowotworowe (Reagan-Shaw i wsp., 2008).

Uzyskane wyniki dotyczące radioochronnych właściwości PGs są obiecujące, wymagają jednak dalszych badań, szczególnie na innych liniach komórek nowotworowych, w celu wyjaśnienia różnych mechanizmów działania PGs w komórkach prawidłowych i nowotworowych.

8. Podsumowanie

Glikokoniugaty polifenolowe z wybranych roślin leczniczych: *Sanguisorba officinalis*, *Erigeron canadensis*, *Rubus plicatus*, *Fragaria vesca*

- nie wykazują cytotoksyczności wobec fibroblastów mysich i PBMC
- zwiększają przeżywalność PBMC po napromienieniu poprzez:
 - zmiatanie wewnątrzkomórkowych ROS
 - zmniejszanie poziomu uszkodzeń DNA i uszkodzeń oksydacyjnych zasad
 - hamowanie peroksydacji lipidów
 - ochronę białek enzymatycznych (SOD i GST) i GSH
 - hamowanie apoptozy
- zmniejszają poziom uszkodzeń DNA, w tym uszkodzeń oksydacyjnych zasad, w napromienionych uprzednio PBMC (dodawane po napromienieniu)
- nie mają wpływu na poziom GSH oraz przeżywalność i apoptozę komórek białaczkowych K562

9. Wnioski

- Największą skuteczność działania radioochronnego, porównywalną z kwercetyną, wykazuje PG z *Sanguisorba officinalis*
- Główny mechanizm radioochronnego działania glikokoniugatów wynika z ich aktywności antyoksydacyjnej (zmiatanie ROS generowanych podczas radiolizy wody i reakcja z wtórnymi rodnikami), ale inne mechanizmy są także odpowiedzialne za po-radiacyjne, zmniejszające skutki napromienienia, działanie PGs, m. in. szlaki śmierci komórkowej
- Glikokoniugaty polifenolowe spełniają kryterium radioprotektora o potencjalnym zastosowaniu w radioterapii – działają selektywnie - **wykazują właściwości radioochronne *in vitro* wobec komórek prawidłowych**, natomiast **nie chronią komórek nowotworowych K562**

10. Streszczenie

Jonizacja towarzysząca promieniowaniu jest niebezpieczna dla zdrowia człowieka, indukuje stres oksydacyjny, który może uszkadzać białka, lipidy błonowe, DNA oraz RNA. Jednak promieniowanie jonizujące stosowane w sposób kontrolowany znalazło zastosowanie w medycynie, zarówno w celach diagnostycznych (badania rentgenowskie), jak i leczniczych (radioterapia). Stosowanie związków radioochronnych, które ochronią komórki prawidłowe przed szkodliwym działaniem promieniowania jest niezwykle ważne w profilaktyce schorzeń wynikających z zawodowego (personel radiologii onkologicznej i diagnostycznej) lub przypadkowego narażenia człowieka na promieniowanie. Idealny radioprotektor powinien spełniać kilka kryteriów, m.in.: zapewniać znaczącą ochronę przed szkodliwym działaniem promieniowania, odznaczać się minimalną toksycznością i dużą stabilnością, wykazywać brak interferencji z szeroką gamą innych leków, działać wybiórczo (w radioterapii) – ochrona komórek prawidłowych, przy braku wpływu na promienioczułość komórek nowotworowych. Jak dotąd nie znaleziono idealnego radioprotektora, a obecnie dostępny syntetyczny radioprotektor stosowany podczas radioterapii, wykazuje poważne skutki uboczne. Spośród wielu badanych związków chemicznych dobrymi kandydatami na radioprotektory są fitoterapeutyki (ekstrakty oraz substancje uzyskiwane z roślin). Substancje wchodzące w skład roślin wykazują właściwości antyoksydacyjne o udowodnionym działaniu radioochronnym lub radiouczulającym.

Celem pracy była ocena czy preparaty roślinne o strukturze glikokoniugatów polifenolowych i ich aglikony, wyizolowane z wybranych roślin leczniczych z rodziny *Rosaceae* oraz *Asteraceae*, takich jak *Sanguisorba officinalis* L., *Fragaria vesca* L., *Rubus plicatus* Whe. et N. E., i *Erigeron canadensis* L., wykazują właściwości radioochronne *in vitro*, a także wyjaśnienie mechanizmów ich działania. Na podstawie uzyskanych wyników wstępnych, obejmujących porównanie działania glikokoniugatów polifenolowych z ich aglikonami, do dalszych badań wybrano glikokoniugaty polifenolowe, ze względu na ich rozpuszczalność w wodzie w przeciwieństwie do aglikonów oraz porównywalną skuteczność działania radioochronnego. Cel pracy realizowano poprzez (1) ocenę cytotoksyczności badanych glikokoniugatów z wybranych roślin wobec fibroblastów mysich oraz komórek jednojądrzastych krwi obwodowej człowieka, (2) określenie udziału badanych glikokoniugatów w ochronie komórek jednojądrzastych krwi obwodowej człowieka i elementów osocza ludzkiego przed

indukowanymi promieniowaniem gamma: stresem oksydacyjnym, genotoksycznością i apoptozą. Dokonano również (3) oceny wpływu glikokoniugatów na ochronę komórek nowotworowych K562 przed indukowanym promieniowaniem jonizującym gamma stresem oksydacyjnym i apoptozą.

Uzyskane wyniki pozwalają stwierdzić, że wybrane glikokoniugaty polifenolowe nie wykazują toksyczności wobec fibroblastów mysich ani komórek jednojądrzastych krwi obwodowej człowieka, zwiększają przeżywalność komórek jednojądrzastych krwi obwodowej człowieka po napromienieniu, poprzez zmiatanie wewnątrzkomórkowych reaktywnych form tlenu, zmniejszanie poziomu uszkodzeń DNA oraz uszkodzeń oksydacyjnych zasad, hamowanie peroksydacji lipidów, ochronę białek enzymatycznych (dysmutaza ponadtlenkowa i transferaza glutationowa) i zredukowanego glutationu oraz hamowanie apoptozy. Glikokoniugaty zmniejszają także poziom uszkodzeń DNA, w tym uszkodzeń oksydacyjnych zasad, w napromienionych uprzednio komórkach jednojądrzastych (dodawane po napromienieniu). Glikokoniugaty polifenolowe z wybranych roślin leczniczych nie mają wpływu na poziom zredukowanego glutationu i wewnątrzkomórkowych reaktywnych form tlenu, ani też na przeżywalność i apoptozę komórek białaczkowych K562.

Glikokoniugaty polifenolowe z wybranych roślin leczniczych spełniają kryterium radioprotektora o potencjalnym zastosowaniu w radioterapii, ponieważ działają selektywnie, wykazując właściwości radioochronne *in vitro* wobec komórek prawidłowych, natomiast nie chronią komórek nowotworowych (K562). Największą skuteczność działania radioochronnego, porównywalną z kwercetyną, stosowaną jako związek referencyjny, wykazuje glikokoniugat polifenolowy wyizolowany z *Sanguisorba officinalis*.

11. Summary

Ionizing radiation is hazardous to human health, it induces oxidative stress, which can damage proteins, membrane lipids, DNA and RNA. However, ionizing radiation applied in a controlled manner has been used in medicine, both for diagnostic (X-ray) and therapeutic (radiotherapy) purposes. Application of radioprotectors - compounds that protect normal cells against the adverse effects of radiation is extremely important both in the occupational (oncology and diagnostic radiology personnel) and accidental human exposure to radiation. The ideal radioprotective agent should fulfill several criteria, among others, it should provide a sufficient protection against harmful effects of radiation, should have minimal toxicity and high stability, show no interference with a wide range of other drugs, and to be used in radiotherapy it must also selectively protect normal tissues against radiation without affecting its therapeutic efficacy. The ideal radioprotector has not been found so far. Currently, the only clinically used synthetic radioprotector has serious side effects. Among the many tested chemical compounds, phytotherapeutics (extracts and substances obtained from plants) are good candidates for radioprotectors. Many plant compounds have antioxidant properties with proven radioprotective or radiosensitizing effects.

The aim of this study was to examine whether the polyphenolic glycoconjugates and their aglycones, isolated from the selected medicinal plants of the *Rosaceae* and *Asteraceae* families, such as *Sanguisorba officinalis* L., *Fragaria vesca* L., *Rubus plicatus* Whe. et N. E., and *Erigeron canadensis* L., can protect human peripheral blood mononuclear cells against damaging effects of ionizing radiation, and to explain the mechanisms of their action. Based on the preliminary results, including the activity comparison of the polyphenolic glycoconjugates with their aglycones, the polyphenolic glycoconjugates were selected for further study, due to their solubility in water, as opposed to aglycones, and comparable radioprotective effectiveness. The research goals were achieved by (1) the assessment of the cytotoxicity of the glycoconjugates towards L929 mouse fibroblasts and peripheral blood mononuclear cells, (2) evaluation of the efficacy of plant preparations in the protection of human peripheral blood mononuclear cells and elements of human plasma against oxidative stress, genotoxicity and apoptosis that had been induced by gamma radiation. The radioprotective effects of the polyphenolic glycoconjugates in the myeloid leukemia cell line - K562 was also examined.

The results have shown that the selected plant glycoconjugates were not toxic to the

mouse fibroblasts or human peripheral blood mononuclear cells. Glycoconjugates increased the post-radiation survival of the peripheral blood mononuclear cells by scavenging intracellular reactive oxygen species, by reducing the DNA damage and the base oxidative damage, by inhibiting lipid peroxidation, and by protecting the enzyme proteins (superoxide dismutase and glutathione transferases) and reduced glutathione, and by inhibiting apoptosis. Additionally, glycoconjugates have reduced the DNA damage, including oxidative damage to the bases, followed by irradiation of the mononuclear cells (while added after irradiation). However, the glycoconjugates did not show any protective effects on the intracellular glutathione and ROS levels, survival and apoptosis of the K562 myeloid leukemia cells.

It can be concluded, that the polyphenolic glycoconjugates from the selected medicinal plants fulfill the radioprotector criteria that could potentially be used in radiotherapy, because they can protect normal cells, while they do not provide any protection to cancer cells. Among the selected plant preparations, the polyphenolic glycoconjugate from *Sanguisorba officinalis* was shown to have the most effective radioprotective activity, that was comparable to quercetin.

12. Bibliografia

1. Akpolat, M., Kanter, M., Uzal, M. C. (2009). Protective effects of curcumin against gamma radiation-induced ileal mucosal damage. *Arch Toxicol.*, 83(6): 609-17.
2. Alok, A., Chaudhury, N. K. (2016). Tetracycline hydrochloride: A potential clinical drug for radioprotection. *Chem Biol Interact.*, 245: 90-99.
3. Anderson, R., Amarasinghe, C., Fisher, L., Mak, W., Packer, J. (2000). Reduction in free-radical-induced DNA strand breaks and base damage through fast chemical repair by flavonoids. *Free Radic Res.*, 33: 91-103.
4. Anderson, R., Fisher, L., Hara, Y., Harris, T., Mak, W., Melton, L., Packer, J. E. (2001). Green tea catechins partially protect DNA from ([•])OH radical-induced strand breaks and base damage through fast chemical repair of DNA radicals. *Carcinogenesis*, 22:1189-93.
5. Antoszevska-Smith, J., Pawlowska, E., Blasiak, J. (2017). Reactive oxygen species in BCR-ABL1-expressing cells - relevance to chronic myeloid leukemia. *Acta Biochim Pol.* 64(1):1-10.
6. Apak, R., Guclu, K., Ozyurek, M., Karademir, S. E. (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *J. Agric. Food Chem.*, 52: 7970–7981.
7. Arora, R., Gupta, D., Chawla, R., Sagar, R., Sharma, A., Kumar, R., Prasad, J., Singh, S., Samanta, N., Sharma, R. K. (2005). Radioprotection by plant products: present status and future prospects. *Phytother. Res.*, 19: 1–22.
8. Arumugam, P., Ramamurthy, P., Santhiya, S., Ramesh, A. (2006). Antioxidant activity measured in different solvent fractions obtained from *Mentha spicata* Linn.: An analysis by ABTS^{•+} decolorization assay. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.*, 15: 119–124.
9. Balcerczyk, A., Soszynski, M., Rybaczek, D., Przygodzki, T., Karowicz-Bilinska, A., Maszewski, J., Bartosz, G. (2005). Induction of apoptosis and modulation of

- production of reactive oxygen species in human endothelial cells by diphenyleneiodonium. *Biochem Pharmacol.*, 69: 1263-1273.
10. Bartosz, G. (2009). *Druga twarz tlenu*. Wyd. Naukowe PWN, Warszawa
 11. Benkovic, V., Knezevic, A., Dikic, D., Lisicic, D., Orsolich, N., Basic, I., Kopjar, R. (2009). Radioprotective effects of quercetin and ethanolic extract of propolis in gamma-irradiated. *Arh. Hig. Rada Toksikol.*, 60:129–138.
 12. Bierrmann, Ch. J., McGinnis, G. D. (1988). *Analysis of Carbohydrates by GLC and MS*. CRC Press
 13. Bindoli, A., Fukuto, J., Forman, H. (2008). Thiol Chemistry in Peroxidase Catalysis and Redox Signaling. *Antioxid. Redox Signal.*, 10: 1549–1564.
 14. Błasiak, J., Gloc, E., Młynarski, W., Drzewoski, J., Skórski, T. (2002). Amifostine differentially modulates DNA damage evoked by idarubicin in normal and leukemic cells. *Leuk Res.* 26(12): 1093-1096.
 15. Boiteux, S., Radicella, J. (1999). Base excision repair of 8-hydroxyguanine protects DNA from endogenous oxidative stress. *Biochimie*, 81: 59–67.
 16. Bonechi, C., Donati, A., Tamasi, G., Leone, G., Consumi, M., Rossi, C., Lamponi, S., Magnani, A. (2018). Protective effect of quercetin and rutin encapsulated liposomes on induced oxidative stress. *Biophys Chem.* 233:55-63.
 17. Boulton, M. E., Mitter, S. K., Rao, H. V., Dunn, J. W. (2013). Cell Death, Apoptosis, and Autophagy in Retinal Injury. *Basic Mechanisms of Injury in the Retina: Chapter 24, Section 2*. Ryan, A. Schachat, C. Wilkinson, D. Hinton, S. V. Sadda, P. Wiedemann,
 18. Böyum, A. (1968). Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of monuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Invest Suppl.*, 97:77-89.
 19. Bruskov, V., Karp, O., Garmash, S., Shtarkman, I., Chernikov, A., Gudkov, S. (2012). Prolongation of oxidative stress by long-lived reactive protein species induced by X-ray radiation and their genotoxic action. *Free Radic Res.* , 46(10):1280-90.
 20. Castedo, M., Perfettini, J. L., Roumier, T., Andreau, K., Medema, R., Kroemer, G. (2004). Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene.*, 23(16):2825-37.

21. Chen, X., Nishida, H., Konishi, T. (2003). Baicalin promoted the repair of DNA single strand breakage caused by H₂O₂ in cultured NIH3T3 fibroblasts. *Biol.Pharm.Bull.*, 26: 282–284.
22. Ciccia, A., Elledge, S. J. (2010). The DNA Damage Response: Making it safe to play with knives. *Mol Cell.*, 40(2): 179–204.
23. Cinkilic, N., Cetintas, S. K., Zorlu, T., Vatan, O., Yilmaz, D., Cavas, T., Tunc, S., Ozkan, L., Bilaloglu, R. (2013). Radioprotection by two phenolic compounds: chlorogenic and quinic acid, on X-ray induced DNA damage in human blood lymphocytes *in vitro*. *Food Chem Toxicol.*, 53:359-63.
24. Citrin, D. E., Mitchell, J. B. (2017). Mechanisms of Normal Tissue Injury From Irradiation. *Semin Radiat Oncol.* , 27(4): 316-324.
25. Cohen, E. P., Hussain, S., Moulder, J. E. (2003). Successful treatment of radiation nephropathy with angiotensin II blockade. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.*, 55(1): 190-3.
26. Cooke, M. S., Evans, M. D., Dizdaroglu, M., Lunec, J. (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J.*, 17(10):1195-214.
27. Côté, F., Hahn, M. (1994). Oligosaccharins: structures and signal transduction. *Plant Mol Biol.* , 26:1379-411.
28. Cuervo, A. M. (2004). Autophagy: in sickness and in health. *Trends Cell Biol.* , 14(2):70-7.
29. Czubaszek, M., Szostek, M., Wójcik, E., Andraszek, K. (2014). Test kometowy jako metoda identyfikacji niestabilności chromosomów. *Postepy Hig Med Dosw.*, 68: 695-700.
30. Czubatka, A., Sarnik, J., Lucent, D., Blasiak, J., Witczak, Z. J., Poplawski, T. (2015). A novel carbohydrate derived compound FCP5 causes DNA strand breaks and oxidative modifications of DNA bases in cancer cells. *Chem. Biol. Interact.* , 227: 77–88.
31. Das, D. R., Sinha, M., Khan, A., Das, K., Manna, K., Dey, S. (2013). Radiation protection by major tea polyphenol, epicatechin. *Int. J. Hum. Genet.*, 13: 59-64.
32. Davies, M. (2005). The oxidative environment and protein damage. *Biochim Biophys Acta.*, 1703(2): 93-109.
33. Davies, M., Fu, S., Wang, H., Dean, R. (1999). Stable markers of oxidant damage to proteins and their application in the study of human disease. *Free Radic. Biol. Med.*, 27: 1151-1163.

34. Davila, J., Levin, S., Radi, Z. (2018). Cell Injury and Necrosis. In M. Caplan, Reference Module in Biomedical Sciences; *Comprehensive Toxicology* (Third Edition) (pp. 8: 404–449). Elsevier Inc.
35. de Groot, H., Rauen, U. Tissue injury by reactive oxygen species and the protective effects of flavonoids. (1998). *Fundam. Clin. Pharmacol.* 12 (3) 249–255.
36. Devi, U. P., Paban A.K.: Normal tissue protectors against radiation injury. (2011). *Defence Sci. J.* 61:105-112
37. Devipriya, N., Sudheer, A., Srinivasan, M., Menon, V. (2008). Quercetin ameliorates gamma radiation-induced DNA damage and biochemical changes in human peripheral blood lymphocytes. *Mutat. Res.*, 654: 1–7.
38. Ding, J., Wang, H., Wu, Z. B., Zhao, J., Zhang, S., Li, W. (2015). Protection of murine spermatogenesis against ionizing radiation-induced testicular injury by a green tea polyphenol. *Biol Reprod.*, 92(1): 6.
39. Dische, Z. (1947). A new specific color reaction of hexuronic acids. *J. Biol. Chem.*, 167: 189.
40. Dittmann, K., Toulany, M., Classen, J., Heinrich, V., Milas, L., Rodemann, H. P. (2005). Selective radioprotection of normal tissues by Bowman-Birk proteinase inhibitor (BBI) in mice. *Strahlenther. Onkol.*, 181: 191-196.
41. Dizdaroglu, M., Jaruga, P., Birincioglu, M., Rodriguez, H. (2002). Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free Radic Biol Med.* , 32(11):1102-15.
42. Du, J., Gebicki, M. (2004). Proteins are major initial cell targets of hydroxyl free radicals. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 36: 2334–2343.
43. Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., Smith, F. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars. *Anal. Chem.*, 28: 350–356.
44. Erel, O. (2004). A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin. Biochem.*, 37: 277-285.
45. Eriksson, D., Stigbrand, T. (2010). Radiation-induced cell death mechanisms. *Tumour Biol.* , 31(4): 363-72.
46. Fang, Y., Bradley, M. J., Cook, K. M., Herrick, E. J., Nicholl, M. B. (2013). A potential role for resveratrol as a radiation sensitizer for melanoma treatment. *J Surg Res.*, 183(2):645-53

47. Fischer, N., Seo, E. J., Efferth, T. (2017). Prevention from radiation damage by natural products. *Phytomedicine*, DOI: 10.1016/j.phymed.2017.11.005
48. Gancarz, R., Pawlaczk, I., Kleszczyńska, H., Patent Polska, nr 216635. Roślinny środek przeciwutleniający i sposób wytwarzania roślinnego środka przeciwutleniającego. Opubl. 30.04.2014.
49. Gao, K., Henning, S., Niu, Y., Youssefian, A., Seeram, N., Xu, A., Heber, D. (2006). The citrus flavonoid naringenin stimulates DNA repair in prostate cancer cells. *J. Nutr. Biochem.*, 17: 89–95.
50. Gay, C. A., Gebicki, J.M. (2003). Measurement of protein and lipid hydroperoxides in biological systems by the ferric–xylenol orange method. *Anal. Biochem.*, 315: 29–35.
51. Gebicki, J., Du, J. C. (2000). Peroxidation of proteins and lipids in suspensions of liposomes, in blood serum, and in mouse myeloma cells. *Acta Biochim. Pol.* , 47: 901–911.
52. George, V. C., Dellaire, G., Rupasinghe, H. P. V. (2017). Plant flavonoids in cancer chemoprevention: role in genome stability. *J Nutr Biochem*, 45:1-14.
53. Giardi, M.T., Touloupakis, E., Bertolotto, D., Mascetti, G. (2013). Preventive or potential therapeutic value of nutraceuticals against ionizing radiation-induced oxidative stress in exposed subjects and frequent fliers. *Int. J. Mol. Sci.* 14: 17168-17192.
54. Gloc, E., Błasiak, J. (2004). Charakterystyka farmakologiczna i molekularna amifostyny. *J. Oncol.*,54: 273-280
55. Główny Inspektorat Ochrony Środowiska. (2014). Stan Środowiska w Polsce – Raport.
56. Grace, M. B., Blakely, W. F., Landauer, M. R. (2007). Genistein-induced alterations of radiation-responsive gene expression. *Radiation Measurements* , 42: 1152 – 1157.
57. Gudkov, S., Garmash, S., Shtarkman, I., Chernikov, A., Karp, O., Bruskov, V. (2010). Long-lived protein radicals induced by X-ray irradiation are the source of reactive oxygen species in aqueous medium. *Dokl Biochem Biophys.*, 430:1-4.
58. Habig, W. H., Pabst, M. J., Jakoby, W. B. (1974). Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem.* 249(22): 7130-9.

59. Halaas, O., Olsen, W., Veiby, O., Lovhaug, D., Skjak-Braek, G., Vik, R., Espevik, T. (1997). Mannuronan enhances survival of lethally irradiated mice and stimulates murine haematopoiesis *in vitro*. *Scand. J. Immunol.*, 46: 358–365.
60. Halliwell, B., Gutteridge, J. M. (1981). Formation of thiobarbituric-acid-reactive substance from deoxyribose in the presence of iron salts: the role of superoxide and hydroxyl radicals. *FEBS Lett.* 128(2): 347-52.
61. Haydont, V., Bourgier, C., Pocard, M., Lusinchi, A., Aigueperse, J., Mathé, D., Bourhis, J., Vozenin-Brotons, M. C. (2007). Pravastatin inhibits the Rho/CCN2/extracellular matrix cascade in human fibrosis explants and improves radiation-induced intestinal fibrosis in rats. *Clin. Cancer Res.*, 13: 5331-5340.
62. Headlam, H., Davies, M. (2002). Beta-scission of side-chain alkoxy radicals on peptides and proteins results in the loss of side-chains as aldehydes and ketones. *Free Radical Biol. Med.*, 32: 1171–1184.
63. Heim, K., Tagliaferro, A., Bobilya, D. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J. Nutr. Biochem.*, 13: 572–584.
64. Hillman, G. G., Singh-Gupta, V. (2011). Soy isoflavones sensitize cancer cells to radiotherapy. *Free Radic Biol Med.*, 51(2):289-98.
65. Horton, J.A., Li, F., Chung, E.J., Hudak, K., White, A., Krausz, K., Gonzalez, F., Citrin, D. (2013). Quercetin inhibits radiation-induced skin fibrosis. *Radiat Res.* 180: 205-215.
66. Hosseinimehr, S. (2007). Trends in the development of radioprotective agents. *Drug Discov Today*, 12(19-20): 794-805.
67. Hosseinimehr, S. (2010). Flavonoids and genomic instability induced by ionizing radiation. *Drug Discovery Today*, 15: 907-918.
68. Hosseinimehr, S. J., Hosseini, S. A. (2014). Resveratrol sensitizes selectively thyroid cancer cell to 131-iodine toxicity. *J Toxicol.* 2014:839597.
69. Hussain, T., Tan, B., Yin, Y., Blachier, F., Tossou, M. C., Rahu, N. (2016). Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us? *Oxid Med Cell Longev.* 2016: 7432797
70. Jackson, I. L., Zodda, A., Gurung, G., Pavlovic, R., Kaytor, M. D., Kuskowski, M. A., Vujaskovic, Z. (2017). BIO 300, a nanosuspension of genistein, mitigates pneumonitis/fibrosis following high-dose radiation exposure in the C57L/J murine model. *Br J Pharmacol.*, 174(24):4738-4750

71. Jagetia, G. (2007). Radioprotective potential of plants and herbs against the effects of ionizing radiation. *J.Clin. Biochem. Nutr.*, 40: 74-81.
72. Kanchi, M. M., Shanmugam, M. K., Rane, G., Sethi, G., Kumar, A. P. (2017). Tocotrienols: the unsaturated sidekick shifting new paradigms in vitamin E therapeutics. *Drug Discov Today.*, 22(12): 1765-1781.
73. Kapiszewska, M., Soltys, E., Visioli, F., Cierniak, A., Zajac, G. (2005). The protective ability of the Mediterranean plant extracts against the oxidative DNA damage. The role of the radical oxygen species and the polyphenol content. *J. Physiol. Pharmacol.*, 56 Suppl 1: 183-197.
74. Karkanis, A., Vellios, E., Thomaidis, T., Bilais, D., Efthimiadou, A., Travlos, I. (2014). Phytochemistry and biological properties of burnet weed (*Sanguisorba* spp.): a review. *Nat. Sci. Biol.*, 6: 395–398.
75. Kawanishi, S., Hiraku, Y., Oikawa, S. (2001). Mechanism of guanine-specific DNA damage by oxidative stress and its role in carcinogenesis and aging. *Mutat Res.* 488(1):65-76.
76. Kim, K. W., Moretti, L., Mitchell, L. R., Jung, D. K., Lu, B. (2009). Combined Bcl-2/mammalian target of rapamycin inhibition leads to enhanced radiosensitization via induction of apoptosis and autophagy in non-small cell lung tumor xenograft model. *Clin Cancer Res.*, 15(19):6096-105.
77. Klaude, M., Eriksson, S., Nygren, J., Ahnstrom, G. (1996). The comet assay: mechanisms and technical considerations. *Mutat. Res.*, 363: 89–96.
78. Kogan, G., Pajtinka, M., Babincova, M., Miadokova, E., Rauko, P., Slamenova, D., Korolenko, T. A. (2008). Yeast cell wall polysaccharides as antioxidants and antimutagens: can they fight cancer? *Neoplasma.*, 55: 387–393.
79. Kolber, M., Bonarska-Kujawa, D., Pawlaczyk, I. [The influence of plant polyphenols with antioxidant activity on biological membranes](in Polish). (2007). The Research Works of the Chemistry Department of Wrocław University of Technology. The Research Works of Students 5: 59-62. Oddziaływanie roślinnych polifenoli o właściwościach przeciwutleniających z błonami biologicznymi. (2007). Prace Naukowe Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej. 5: 59-62.
80. Kołodziejczyk-Czepas, J., Szejka, M., Pawlaczyk, A., Żbikowska, H. M. (2015). Właściwości przeciwutleniające kwasu kawowego i jego pochodnych. *Zywnosc. Nauka. Technika. Jakosc*, 3 (100): 5-17.

81. Konopacka, M. (2007). Niestabilność genetyczna i efekt sąsiedztwa indukowane przez promieniowanie jonizujące. *Nowotwory Journal of Oncology*, 3: 313-318.
82. Kopjar, N., Miocić, S., Ramić, S., Milić, M., Viculin, T. (2006). Assessment of the radioprotective effects of amifostine and melatonin on human lymphocytes irradiated with gamma-rays in vitro. *Arh Hig Rada Toksikol.*, 57(2):155-63.
83. Korwek, Z., Alster, O. (2014). Rola szlaku indukowanego uszkodzeniami DNA w apoptozie i starzeniu komórkowym. *Postepy Biochem.*, 60(2):248-62.
84. Koukourakis, M. I. (2012). Radiation damage and radioprotectants: new concepts in the era of molecular medicine. *Br J Radiol.* 85(1012):313-30.
85. Kraska, A., Bilski, B. (2012). Narażenie pracowników ochrony zdrowia na promieniowanie jonizujące a hipoteza hormezy radiacyjnej. *Medycyna Pracy* , 63(3): 371–376.
86. Kulbacka, J., Saczko, J., Chwiłkowska, A. (2009). Oxidative stress in cells damage processes. *Pol Merkur Lekarski.*, 27(157): 44-47.
87. Kuntić, V., Stanković, M., Vujić, Z., Brborić, J., Uskoković-Marković, S. (2013). Radioprotectors - the evergreen topic. *Chem Biodivers.* 10(10): 1791-803.
88. Laube, M., Kniess, T., Pietzsch, J. (2016). Development of Antioxidant COX-2 Inhibitors as Radioprotective Agents for Radiation Therapy—A Hypothesis-Driven Review. *Antioxidants* (Basel), 19: 5(2).
89. Lee, H. J., Kim, J. S., Moon, C., Kim, J. C., Lee, Y. S., Jang, J. S., Jo, S. K., Kim, S. H. (2008). Modification of gamma-radiation response in mice by green tea polyphenols. *Phytother Res.*, 22: 1380–1383.
90. Leuraud, K., Richardson, D. B., Cardis, E., Daniels, R. D., Gillies, M., O'Hagan, J. A., Hamra, G. B., Haylock, R., Laurier, D., Moissonnier, M., Schubauer-Berigan, M. K., Thierry-Chef, I., Kesminiene, A. (2015). Ionising radiation and risk of death from leukaemia and lymphoma in radiation-monitored workers (INWORKS): an international cohort study. *Lancet Haematol.*, 2(7):e276-81.
91. Li, J., Feng, L., Xing, Y., Wang, Y., Du, L., Xu, C., Cao, J., Wang, Q., Fan, S., Liu, Q., Fan. F. (2014). Radioprotective and antioxidant effect of resveratrol in hippocampus by activating Sirt1. *Int. J. Mol. Sci.*, 15: 5928-5939.
92. Lin, C.H., Yu, Y., Zhao, H. G., Yang, A. M., Yan, H., Cui, Y. L. (2012). Combination of quercetin with radiotherapy enhances tumor radiosensitivity *in vitro* and *in vivo*. *Radiother Oncol.*, 104: 395–400

93. Lindeboom, N., Wanasundara, P. (2007). Interference of phenolic compounds in Brassica napus, Brassica rapa and Sinapis alba seed extracts with the Lowry protein assay. *Food Chem.* , 104: 30–38.
94. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randal, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* , 193: 265-75.
95. Łuczaj, W., Skrzydlewska, E. (2003). DNA damage caused by lipid peroxidation products. *Cell Mol Biol Lett.*, 8: 391-413.
96. Maimona, E., Samuni, U., Goldstein, S. (2018). Studying mechanism of radical reactions: From radiation to nitroxides as research tools. *Radiat Phys Chem.*, 143: 14-19.
97. Manzolli, E. S., Serpeloni, J. M., Grotto, D., Bastos, J. K., Antunes, L. M., Barbosa Junior, F., Barcelos, G. R. (2015). Protective effects of the flavonoid chrysin against methylmercury-induced genotoxicity and alterations of antioxidant status, *in vivo*. *Oxid Med Cell Longe.*, 2015:602360
98. Matsuo, M., Sasaki, N., Saga, K., Kaneko, T. (2005). Cytotoxicity of flavonoids toward cultured normal human cells. *Biol Pharm Bull.*, 28(2): 253-9.
99. Maurya, D., Devasagayam, T., Nair, C. (2006). Some novel approaches for radioprotection and the beneficial effect of natural products. *Indian J. Exp. Biol.*, 44: 93-114.
100. Miao, W., Hu, L., Kandouz, M., Batist, G. (2003). Oltipraz is a bifunctional inducer activating both phase I and phase II drug-metabolizing enzymes via the xenobiotic responsive element. *Mol Pharmacol.*, 64(2):346-54.
101. Morel, I., Abalea, V., Cillard, P., Cillard, J. (2001). Repair of oxidized DNA by the flavonoid myricetin. *Methods in Enzymol.*, 335: 308-16.
102. Nagano, J., Kono, S., Preston, D. L., Moriwaki, H., Sharp, G. B., Koyama, K., Mabuchi, K.(2000). Bladder-cancer incidence in relation to vegetable and fruit consumption: a prospective study of atomic-bomb survivors. *Int J Cancer.*, 1;86(1):132-8.
103. Nagaria, P., Robert, C., Rassool, F. V. (2013). DNA double-strand break response in stem cells: Mechanisms to maintain genomic integrity. *Biochim Biophys Acta*, 1830: 2345-2353.
104. Nair, C. K., Parida, D. K., Nomura, T. (2001). Radioprotectors in radiotherapy. *J Radiat Res.* 42(1): 21-37.

105. Nambiar, D., Rajamani, P., Singh, R. (2011). Effects of phytochemicals on ionization radiation-mediated carcinogenesis and cancer therapy. *Mutat. Res.*, 728(3):139-57.
106. Naskalski, J. W., Bartosz, G. (2000) Oxidative modifications of protein structures. 161-253
107. Nassef, M. H., Kinsara, A. A. (2017). Occupational Radiation Dose for Medical Workers at a University Hospital. *Journal of Taibah University for Science*, 11: 1259–1266.
108. Niki, E. (2009). Lipid peroxidation: physiological levels and dual biological effects. *Free Radic Biol Med.*, 47(5) :469-84.
109. Nikitaki, Z., Mavragani, I., Laskaratou, D., Gika, V., Moskvina, V., Theofilatos, K., Vougas, K., Stewart R. D., Georgakilas, A. G.(2016). Systemic mechanisms and effects of ionizing radiation: A new “old” paradigm of how the bystanders and distant can become the players. *Semin. Cancer Biol.*, 37-38:77-95.
110. Nitta, S., Numata, K. (2013). Biopolymer-based nanoparticles for drug/gene delivery and tissue engineering. *Int. J. Mol. Sci.*, 14: 1629–1654.
111. Okada, H., Mak, T. W. (2004). Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. *Nat Rev Cancer.*, 4(8):592-603.
112. Orditura, M., De Vita, F., Belli, A., Ciarimella, F., Musico, M., Ferrigno, A., Formato, R., Abbate, G., Diadema, M. R., Catalano, G. (2000). Efficacy and safety profile of amifostine in the preoperative combined therapy of esophageal cancer patients. *Oncol Rep.* , 7: 397–400.
113. Oszmiański, J., Lamer-Zarawska, E. (1996). Substancje naturalne w profilaktyce chorób nowotworowych. *Wiad. Ziel.* 38: 9-11.
114. Paduch, R., Klatka, M., Klatka, J. (2015). Rodzaje śmierci komórki. *Pom J Life Sci.*, 4: 411-418.
115. Paglin, S., Lee, N. Y., Nakar, C., Fitzgerald, M., Plotkin, J., Deuel, B., Hackett, N., McMahon, M., Sphicas, E., Lampen, N., Yahalom, J. (2005). Rapamycin-sensitive pathway regulates mitochondrial membrane potential, autophagy, and survival in irradiated MCF-7 cells. *Cancer Res.* , 65(23):11061-70.
116. Panganiban, R. A., Snow, A. L., Day, R. M. (2013). Mechanisms of radiation toxicity in transformed and non-transformed cells. *Int. J. Mol. Sci.* 14(8):15931-58.

117. Patchen, M., MacVittie, T., Solberg, B., D'Alesandro, M., Brook, I. (1992). Radioprotection by polysaccharides alone and in combination with aminothiols. *Adv. Space Res.*, 12: 233–248.
118. Patil, S., Mallaiah, S., Patil, R. (2013). Antioxidative and radioprotective potential of rutin and quercetin in Swiss albino mice exposed to gamma radiation. *J. Med. Phys.*, 38: 87–92.
119. Patil, S. L., Rao, N. B., Somashekarappa, H. M., Rajashekhar, K. P., (2014). Antigenotoxic potential of rutin and quercetin in Swiss mice exposed to gamma radiation. *Biomed J* 37: 305-313.
120. Paul, P., Unnikrishnan, M., Nagappa, A. (2011). Phytochemicals as radioprotective. *Indian J. Nat. Prod. Resour.*, 2: 137-150.
121. Pawlaczyk, I., Czerchawski, L., Kuliczkowski, W., K. B., Pilecki, W., Witkiewicz, W., Gancarz, R. (2011). Anticoagulant and anti-platelet activity of polyphenolic-polysaccharide preparation isolated from the medicinal plant *Erigeron canadensis* L. *Thromb.Res.*, 127: 328–340.
122. Pawlaczyk, I., Czerchawski, L., Pilecki, W., Lamer-Zarawska, E., Gancarz, R. (2009). Polyphenolic–polysaccharide compounds from selected medicinal plants of Asteraceae and Rosaceae families: chemical characterization and blood anticoagulant activity. *Carbohydr. Polym.*, 77: 568–575.
123. Pawlaczyk, I., Drożdżyńska, A., Capek, P., Lewik-Tsirigotis, M., Ziewiecki, R., Gancarz, R. (2012). Anticoagulant activity of the polysaccharide-polyphenolic conjugate from *S. officinalis* L. Proceedings of the 8th International Conference on Polysaccharides-Glycoscience, (pp. 23–27). Prague, Czech Republic.
124. Pawlaczyk, I., Kleszczynska, H., Bonarska, D., Czerchawski, L., Gancarz, R. (2003). Natural oligosaccharides with anticoagulant activity and their interactions with model biological membranes. Surfactants and dispersed systems in theory and practice. Scientific conference (pp. 333-336). Polanica Zdrój: Wydaw. PWroc.
125. Pevet, P., Klosen, P., Felder-Schmittbuhl, M. P. (2017). The hormone melatonin: Animal studies. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 31: 547-559.
126. Phan, H. T., Yoda, T., Chahal, B., Morita, M., Takagi, M., Vestergaard, M. C. (2014). Structure-dependent interactions of polyphenols with a biomimetic membrane system. *Biochim Biophys Acta*. 1838(10): 2670-7.

127. Pillai, T., Maurya, D., Salvi, V., Janardhanan, K., Nair, C. (2014). Fungal beta glucan protects radiation induced DNA damage in human lymphocytes. *Ann. Transl. Med.*, 2: 13.
128. Pizzimenti, S., Toaldo, C., Pettazzoni, P., Dianzani, M. U., Barrera, G. (2010). The "two-faced" effects of reactive oxygen species and the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal in the hallmarks of cancer. *Cancers (Basel)*, 2(2):338-63.
129. Podhorecka, M. (2009). Gamma H2AX jako marker dwuniciowych pęknięć DNA. *Postepy Hig Med Dosw.*, 63: 92-98 .
130. Ponczek, M., Wachowicz, B. (2005). Oddziaływanie reaktywnych form tlenu i azotu z białkami. *Post. Biochem.*, 51(2): 140-145.
131. Poplawski, T., Loba, K., Pawłowska, E., Szczepanska, J., Blasiak, J. (2010). Genotoxicity of urethane dimethacrylate, a tooth restoration component. *Toxicol In Vitro*, 24(3):854-62.
132. Prasad, N., Menon, V., Vasudev, V., Pugalendi, K. (2005). Radioprotective effect of sesamol on γ -radiation induced DNA damage, lipid peroxidation and antioxidants levels in cultured human lymphocytes. *Toxicology* , 209: 225-235.
133. Przybyszewski, W. M., Kasperczyk, J., Stokłosa, K., Bkhiyan, A. (2005). Uszkodzenia DNA powodowane przez produkty peroksydacji lipidów. *Postepy Hig Med Dosw.*, 59: 75-81.
134. Przybyszewski, W. M., Wideł, M., Szurko, A., Maniakowski, Z. (2008). Wpływ mocy dawki na komórkowe, biochemiczne i molekularne efekty promieniowania jonizującego. *Postepy Hig Med Dosw.*, 62: 468-477 .
135. Puzanowska-Tarasiewicz, H., Starczewska, B., Kuźmicka, L. (2008). Reaktywne formy tlenu. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 4: 1007–1015
136. Radwan, R. R., Mohamed, H. A. (2018). Nigella sativa oil modulates the therapeutic efficacy of mesenchymal stem cells against liver injury in irradiated rats. *J Photochem Photobiol B.*, 178: 447-456.
137. Ramírez-Cahero, H. F., Valdivia-López, M. A. (2017). Effect of gamma radiation on sugars and vitamin C: Radiolytic pathways. *Food Chemistry*, 245:1131-1140.
138. Raviraj, J., Bokkasam, V. K., Kumar, V. S., Reddy, U. S., Suman, V. (2014). Radiosensitizers, radioprotectors, and radiation mitigators. *Indian J Dent Res.*, 25(1): 83-90.

139. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol.Med.*, 26: 1231–1237.
140. Reagan-Shaw, S., Mukhtar, H., Ahmad, N. (2008). Resveratrol imparts photoprotection of normal cells and enhances the efficacy of radiation therapy in cancer cells. *Photochem. Photobiol.*, 84: 415-421.
141. Rice-Evans, C., Diplock, A., Symons, M. (1991). *Techniques in Free Radical Research*. Elsevier, Amsterdam, London, New York, Tokyo.
142. Roberts, D., Travis, E. (1995). Acemannan-containing wound dressing gel reduces radiation-induced skin reactions in C3H mice. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 32: 1047–1052.
143. Roszkowski, K., Błaszczuk, B. (2009). Oksydacyjne uszkodzenia DNA jako potencjalne markery skuteczności radioterapii. *Współczesna onkologia*, 3: 125-128.
144. Saavedra, J. M. (2017). Beneficial effects of Angiotensin II receptor blockers in brain disorders. *Pharmacol Res.*, 125(Pt A):91-103.
145. Sabin, R. J., Anderson, R. M. (2011). Cellular Senescence - its role in cancer and the response to ionizing radiation. *Genome Integr.*, 2(1):7.
146. Sauvaget, C., Kasagi, F., Waldren, C. A. (2004). Dietary factors and cancer mortality among atomic bomb survivors. *Mutat. Res.* 551: 145-152.
147. Sayed, M., Hadi, F., Khan, J. A., Noor S. Shah, N. S., Shah, L. A., Khan, H. M. (2018). Degradation of acetaminophen in aqueous media by h₂o₂ assisted gamma irradiation process. *Z. Phys. Chem.* DOI: 10.1515/zpch-2017-1071.
148. Senft, A. P., Dalton, T. P., Shertzer H., G. (2000). Determining Glutathione and Glutathione Disulfide Using the Fluorescence Probe o-Phthalaldehyde. *Anal Biochem.*, 280: 80–86 .
149. Shacter, E. (2000). Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug Metab. Rev.*, 32: 307–326.
150. Shah, A., Masoodi, F. A., Gani, A., Ashwar, B. A. (2015). Effect of γ -irradiation on antioxidant and antiproliferative properties of oat β -glucan. *Radiat Phys Chem.*, 117: 120–127.
151. Shi, Y., Wang, W., Huang, C., Jia, Z., Yao, S., Zheng, R. (2008). Fast repair of oxidative DNA damage by phenylpropanoid glycosides and their analogues. *Mutagenesis*, 23: 19-26.

152. Shirazi, A., Mihandoost, E., Mohseni, M., Ghazi-Khansari, M., & Rabie Mahdavi, S. (2013). Radio-protective effects of melatonin against irradiation-induced oxidative damage in rat peripheral blood. *Phys Med.* , 29(1):65-74.
153. Singh, N. P., Mccoy, M. T., Tice, R. R., Schneider, E. L. (1988). A simple technique for quantitation of low-levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.*, 175: 184–191.
154. Singh, V. K., Grace, M. B., Jacobsen, K. O., Chang, C. M., Parekh, V. I., Inal, C. E., Shafran, R. L., Whitnall, A. D., Kao, T. C., Jackson, W. E., Whitnall, M. H. (2008). Administration of 5-androstenediol to mice: pharmacokinetics and cytokine gene expression. *Exp Mol Pathol.*, 84(2):178-88.
155. Singh, V., Shafran, R. L., Jackson, W. E., Seed, T. M., Kumar, K. S. (2006). Induction of cytokines by radioprotective tocopherol analogs. *Exp Mol Pathol.*, 81(1):55-61.
156. Singleton, V. L., Orthofer, R., Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* 299: 152-178.
157. Stępień, A., Izdebska, M., Grzanka, A. (2007). Rodzaje śmierci komórkowej. *Postepy Hig Med Dosw.*, 61:420-8.
158. Stickney, D., Dowding, C., Authier, S., Garsd, A., Onizuka-Handa, N., Reading, C., Frincke, J. M. (2007). 5-androstenediol improves survival in clinically unsupported rhesus monkeys with radiation-induced myelosuppression. *Int Immunopharmacol.*, 7(4): 500-5.
159. Strzałkowski, A. (1978). *Wstęp do fizyki jądra atomowego. Państwowe Wydawnictwo Naukowe.* Warszawa
160. Sunada, S., Fujisawa, H., Cartwright, I.M., Maeda, J., Brents, C.A., Mizuno, K., Aizawa, Y., Kato, T.A., Uesaka, M. (2014). Monoglucosyl-rutin as a potential radioprotector in mammalian cells. *Mol Med. Rep.* 10: 10-14.
161. Synowiec, E., Krupa, R., Morawiec, Z., Wasylecka, M., Dziki, L., Morawiec, J., Błasiak, J., Wozniak, K. (2010). Efficacy of DNA double-strand breaks repair in breast cancer is decreased in carriers of the variant allele of the UBC9 gene c.73G>A polymorphism. *Mutat Res.* 694(1-2): 31-38.
162. Szejka, M., Kołodziejczyk-Czepas, J., Żbikowska, H. M. (2016). Radioprotektory w radioterapii - postępy w dziedzinie możliwości wykorzystania fitozwiązków. *Postepy Hig Med Dosw.*, 70: 722-734.

163. Szejka, M., Poplawski, T., Sarnik, J., Pawlaczyk-Graja, I., Czechowski, F., Olejnik, A. K., Gancarz, R., Zbikowska, H. M. (2017). Polyphenolic glycoconjugates from medical plants of Rosaceae/Asteraceae family protect human lymphocytes against gamma-radiation induced damage . *Int. J. Biol. Macromol.*, 94: 585–593.
164. Tabaczar, S., Talar, M., Gwoździński, K. (2011). Nitroksydy jako antyoksydanty – możliwości ich zastosowania w celach chemioprewencyjnych oraz radioprotekcyjnych. *Postepy Hig Med Dosw*, 65: 46-54 .
165. Tarahovsky, Y. S., Kim, Y. A., Yagolnik, E. A., Muzafarov, E. N. (2014). Flavonoid–membrane interactions: Involvement of flavonoid–metal complexes in raft signaling. *Biochim Biophys Acta*. 1838(5): 1235-46.
166. Tawfik, S. S., Abouelella, A. M., Shahein, Y. E. (2013). Curcumin protection activities against γ -rays-induced molecular and biochemical lesions. *BMC Res Notes.*, 6:375.
167. Thakur, M., Weng, A., Fuchs, H., Sharma, V., Bhargava, C., Bhargava, C. S., Chauhan, N., Dixit, V. K., Bhargava, S. (2012). Rasayana properties of ayurvedic herbs: are polysaccharides a major contributor. *Carbohydr. Polym.*, 87: 3–15.
168. Tsiapali, E., Whaley, S., Kalbfleisch, J., Ensley, H., Browder, I., Williams, D. L. (2001). Glucans exhibit weak antioxidant activity, but stimulate macrophage free radical activity. *Free Radic. Biol. Med.*, 30: 393–402.
169. Tsuda, T., Watanabe, M., Ohshima, K., Norinobu, S., Choi S. W., Osawa, T. (1994). Antioxidant activity of the anthocyanin pigments cyanidic 3-O-beta.-D-glucoside and cyanidin. *J. Agric. Food Chem.* 42 (11) 2407–2410.
170. Wang, H., Cao, G., Prior, R.L. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. (1997). *J.Agric. Food Chem.* 45 (2): 304–309
171. Wasserman, T. H. (1994). Radiotherapeutic studies with amifostine (Ethyol). *Semin. Oncol.*, 21: 21– 25.
172. Weiss, J. F., Landauer, M. R. (2003). Protection against ionizing radiation by antioxidant nutrients and phytochemicals. *Toxicology.*, 189(1-2):1-20.
173. Weiss, J. F., Landauer, M. R. (2009). History and development of radiation-protective agents. *Int J Radiat Biol.*, 85(7):539-73.
174. Weiss, J., Landauer, M. (2000). Radioprotection by antioxidants. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 899: 44–60.

175. Wideł, M., Przybyszewski, W., Rzeszowska-Wolny, J. (2009). Popromienny efekt sąsiedztwa, ważny element odpowiedzi na promieniowanie jonizujące – potencjalne implikacje kliniczne. *Postepy Hig Med Dosw.*, 63: 377-388.
176. Williams, G. M., Jeffrey, A. M. (2000). Oxidative DNA damage: endogenous and chemically induced. *Regul Toxicol Pharmacol.* 32(3): 283-92.
177. Wolski, T., Baj, T., Ludwiczuk, A., Sałata, M., Głowniak, K. (2009). Surowce roślinne o działaniu adaptogennym oraz ocena zawartości adaptogenów w ekstraktach i preparatach otrzymanych z rodzaju *Panax*. *Post. Fitoter.*, 2: 77-97
178. Wu, J., Zhang, B., Wu, Y. R., Davidson, M. M., Hei, T. K. (2017). Targeted cytoplasmic irradiation and autophagy. *Mutat Res.*, 806: 88-97.
179. Wu, R., Zeng, Y. (2009). Does angiotensin II-aldosterone have a role in radiation-induced heart disease? *Med Hypotheses.*, 72(3):263-6.
180. Yang, Y., Cheng, J., Singhal, S., Saini, M., Pandya, U., Awasthi, S., Awasthi, Y. C. (2001). Role of glutathione S-transferases in protection against lipid peroxidation. Overexpression of hGSTA2-2 in K562 cells protects against hydrogen peroxide-induced apoptosis and inhibits JNK and caspase 3 activation. *J. Biol Chem.*, 276: 19220–19230.
181. Yun, K. L., Wang, Z. Y. (2017). Target/signalling pathways of natural plant-derived radioprotective agents from treatment to potential candidates: A reverse thought on anti-tumour drugs. *Biomed Pharmacother.*, 91:1122-1151.
182. Zbikowska, H. M., Szejka, M., Saluk, J., Pawlaczyk-Graja, I. (2016). Polyphenolic-polysaccharide conjugates from plants of Rosaceae/Asteraceae family as potential radioprotectors. *Int. J. Biol. Macromol.*, 86: 329–337.
183. Zhao, J., Liu, J., Wei, T., Ma, X., Cheng, Q., Huo, S., Zhang, C., Zhang, Y., Duan, X., Liang, X. J. (2016). Quercetin-loaded nanomicelles to circumvent human castration-resistant prostate cancer *in vitro* and *in vivo*. *Nanoscale*, 9: 5126–5138.
184. Zhao, W., Robbins, M. (2009). Inflammation and chronic oxidative stress in radiation-induced late normal tissue injury: Therapeutic implications. *Curr Med Chem.*, 16(2):130-43.

13. Dorobek naukowy

Publikacje doświadczalne (5):

1. **Szejek, M.**, Poplawski, T., Czubatka-Bienkowska, A., Olejnik, A. K., Pawlaczyk-Graja, I., Gancarz, R., Zbikowska, H. M. (2017). A comparative study on the radioprotective potential of the polyphenolic glycoconjugates from medicinal plants of *Rosaceae* and *Asteraceae* families versus their aglycones. *J Photochem Photobiol B.*, 171: 50-57. **IF 2,673**
2. **Szejek, M.**, Poplawski, T., Sarnik, J., Pawlaczyk-Graja, I., Czechowski, F., Olejnik, A. K., Gancarz, R., Zbikowska, H. M. (2017). Polyphenolic glycoconjugates from medical plants of *Rosaceae/Asteraceae* family protect human lymphocytes against γ -radiation-induced damage. *Int J Biol Macromol.*, 94: 585-593. **IF 3,671**
3. Zbikowska, H. M., **Szejek, M.**, Saluk, J, Pawlaczyk-Graja, I., Gancarz, R., Olejnik, A. K. (2016). Polyphenolic-polysaccharide conjugates from plants of *Rosaceae/Asteraceae* family as potential radioprotectors. *Int J Biol Macromol.*, 86:329-37. **IF 3,671**
4. Zbikowska, H. M., Antosik, A., **Szejek, M.**, Bijak, M., Nowak, P. A (2014). Moderate protective effect of quercetin against γ -irradiation- and storage-induced oxidative damage in red blood cells for transfusion. *Int J Radiat Biol.*, 90(12):1201-10. **IF 1,687**
5. Zbikowska, H. M., Antosik, A., **Szejek, M.**, Bijak, M., Olejnik, A. K., Saluk, J., Nowak, P. (2014). Does quercetin protect human red blood cell membranes against γ -irradiation? *Redox Rep.*, 19(2): 65-71. **IF 1,522**

Publikacje przeglądowe (2):

1. **Szejek, M.**, Kołodziejczyk-Czepas, J., Zbikowska, H. M. (2016). Radioprotektory w radioterapii – postępy w dziedzinie możliwości wykorzystania fitozwiązków. *Postepy Hig Med Dosw*, 70:722-34. **IF 0,690**
2. Kołodziejczyk-Czepas, J., **Szejek, M.**, Pawlak, A., Zbikowska, H. M, (2015). Właściwości przeciwutleniające kwasu kawowego i jego pochodnych. *Żywność. Nauka. Technika. Jakość*, 3 (100): 5-17.

Zgłoszenie patentowe (1):

1. Żbikowska H.; Saluk J.; Pawlaczyk-Graja I.; **Szejek M.**; Zastosowanie roślinnego środka przeciwutleniającego w ochronie przed promieniowaniem jonizującym; Zgłoszenie patentowe do Urzędu Patentowego RP, nr zgłoszenia P.412248; 23: 7; 06.05.2015

Konferencje (15):

1. **Szejek, M.**; Olejnik, A. K.; Żbikowska, H. M., Właściwości radioochronne koniugatów polifenolowo-polisacharydowych z wybranych roślin leczniczych, BioOpen 12-14.05, 2016, Łódź – prezentacja
2. **Szejek, M.**, Kołodziejczyk-Czepas, J.; Sieradzka, M.; Żbikowska, H. M.; Nowak, P.; Stochmal, A., Nowe aspekty aktywności biologicznej pochodnych kwasu kawowego - klowamidy w ochronie układu krążenia, BiOpen, 20-22.04.2015
3. **Szejek, M.**; Żbikowska, H. M., Antyoksydanty roślinne, jako radioprotektory, VII Interdyscyplinarna Konferencja Naukowa TYGIEL Lublin, 21-22.03.2015
4. Kontek, B.; **Szejek, M.**; Kontek, R., Ochronny wpływ ekstraktu z pestek winogron (*Vitis vinifera*) na peroksydację lipidów osocza ludzkiego wywołaną podaniem izomalationu IV Ogólnopolska Konferencja Dietetyki – Congressus Dietetica, Łódź, 04-05.04.2014
5. Kontek, B.; **Szejek, M.**; Kontek, R., Efekt ochronny ekstraktu z pestek winogron na peroksydację lipidów osocza wywołaną działaniem malationu i malaoksonu I Ogólnopolska Konferencja Naukowa Dietetyka Gerontologiczna – Wyzwania i Szanse, Poznań, 27.02.2014
6. Kontek, B.; Szejek, M.; Kontek, R., Ochronny wpływ aronii (*Aronia melanocarpa*) na peroksydację lipidów wywołaną przez malaokson i izomalation w osoczu ludzkim. X Międzynarodowa Konferencja NaukowoTechniczna, Warszawa, 27.09.2013.
7. **Szejek, M.**; Dederko, P.; Antosik, A.; Olejnik, A. K.; Saluk, J.; Bijak, M.; Nowak, P.; Żbikowska, H. M., Quercetin protects human peripheral blood lymphocyte and plasma lipids against γ -radiation-induced peroxidation, 48 Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Toruń, 2-5 września 2013.

8. Antosik, A.; Cichon, N.; **Szej**k, M.; Bijak, M.; Nowak, P.; Zbikowska, H. M. Protective effect of Trolox against storage lesions in red blood cells for transfusion. 48 Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Toruń, 2-5 września 2013
9. Woźniak, D.; **Szej**k, M.; Antosik, A.; Bijak, M.; Zbikowska, H. M.; Nowak, P.; Wpływ kwasu galusowego na całkowitą zdolność antyoksydacyjną w erytrocytach. II Studencka Konferencja Biologii Molekularnej, Łódź, 4 - 6 kwietnia 2013
10. Pach, K.; Antosik, A.; **Szej**k, M.; Bijak, M.; Zbikowska, H. M., Wpływ kwasu kawowego na całkowitą zdolność antyoksydacyjną w erytrocytach. II Studencka Konferencja Biologii Molekularnej, Łódź, 4 - 6 kwietnia 2013
11. **Szej**k, M.; Antosik, A.; Dederko, P.; Zbikowska, H. M., Fitozwiązki w radioterapii. II Studencka Konferencja Biologii Molekularnej, Łódź, 4 - 6 kwietnia 2013
12. **Szej**k, M.; Marciniak, M.; Kontek, B.; Kontek, R., Effect of isomalathion on lipid peroxidation in Human erythrocytes in vitro, X Konferencja Nowych Naukowców, Kraków, 13 - 14 .06.2013
13. **Szej**k, M.; Bogdan Kontek, B., Wpływ izomalationu na peroksydację lipidów osocza krwi ludzkiej, II Ogólnopolski Zjazd Młodych Biotechnologów, Katowice, 16-17.03. 2013
14. **Szej**k, M.; Kontek, B.; Zbikowska, H. M., Effects of malathion and its Metabolite on lipid peroxidation in human plasma, II Konferencja Młodych Naukowców, Światowy Dzień Wody, Poznań, 21-22.03.2013
15. Antosik, A., **Szej**k, M.; Zbikowska, H. M., The use of flow cytometry to study. The changes in the membranes of γ -irradiated erythrocytes for transfusion. Visualization of Senescent cells *in vitro* and *in vivo*, Warszawa, 15-16.12. 2012