

1. WPROWADZENIE

1.1. Rola rodników w procesach uszkodzenia komórek i tkanek

W żywych organizmach "wolne" rodniki mogą powstawać: w wyniku działania czynników zewnętrznych (np. promieniowania UV, promieniowania jonizującego), w reakcjach obronnych systemu immunologicznego organizmu, a także podczas normalnych procesów fizjologicznych zachodzących w różnych częściach komórki (Fridovich 1975, Pryor 1976, Liczmański 1988a, Feher *i in.* 1987, Bensasson *i in.* 1993, Riley 1994).

W warunkach fizjologicznych procesy te znajdują się pod ścisłą kontrolą organizmu, w wyniku działania szeregu enzymatycznych i nieenzymatycznych mechanizmów ochronnych - (Liczmański 1988b, Feher *i in.* 1987). Zaburzenie tych mechanizmów pod wpływem różnych czynników chorobotwórczych lub oddziaływań zewnętrznych wywołuje znaczny wzrost stężenia rodników w organizmie, co w konsekwencji powoduje występowanie reakcji patologicznych prowadzących do uszkodzenia komórek i tkanek.

Spektrum niszczącego oddziaływania rodników jest bardzo szerokie. Działanie to może obejmować praktycznie wszystkie występujące w organizmie biocząsteczki wywołując uszkodzenia na poziomie cząsteczkowym oraz na poziomie błon komórkowych. Wolne rodniki wywołują *in vitro* chemiczne modyfikacje oraz uszkodzenia białek (agregacja i denaturacja), lipidów (peroksydacja), węglowodanów i nukleotydów, indukują zmiany w strukturze DNA prowadzące do mutacji lub efektów cytotoksycznych itp. (Fridovich 1975, Liczmański 1988a, 1988b, Feher *i in.* 1987, Simic *i in.* 1988, 1989, Riley 1994; wraz z pracami cytowanymi). Główną rolę odgrywają tutaj rodniki pochodzenia tlenowego: $^1\text{O}_2$, O_2^- ($\text{HO}_2^\cdot$), $^\cdot\text{OH}$ oraz H_2O_2 (Fridovich 1975, Liczmański 1988a, 1988b, Feher *i in.* 1987, Simic *i in.* 1988, 1989, Riley 1994; wraz z pracami w nich cytowanymi).

Ze względu na ogromną reaktywność rodnika OH szczególnie interesująca jest jego rola w tych procesach. Rodnik ten reaguje z większością biocząsteczek ze stałymi szybkości $k(\cdot\text{OH} + \text{A})$ rzędu $10^9 - 10^{10} \text{ dm}^3\text{mol}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Buxton *i in.* 1988), stąd jego czas życia w matrycy biologicznej jest bardzo krótki ($\sim 1 \text{ ns}$). Reakcje rodnika OH polegają z reguły na odrywaniu atomów wodoru od atakowanych cząsteczek. Ze względu na wspomnianą dużą reaktywność i krótki czas życia rodniki hydroksylowe nie penetrują komórki, a reagują z cząsteczkami z najbliższego sąsiedztwa. W rezultacie tych reakcji powstają wtórne rodniki o zróżnicowanej

reaktywności chemicznej. Zapoczątkowany może zostać ciąg przemian rodnikowych prowadzących do uszkodzeń komórki. Uszkodzenia te powstają w miejscach często bardzo odległych od miejsca ataku rodnika hydroksylowego (Liczmański 1988a). Oznacza to, że pierwotnie utworzone centrum rodnikowe zlokalizowane w określonym fragmencie łańcucha białkowego ulega przeniesieniu w obrębie cząsteczki. Szczególnie ważną rolę odgrywają w tym procesie aminokwasy zawierające w łańcuchu bocznym pierścienie aromatyczne (tryptofan, tyrozyna, histydyna) lub atom siarki (cysteina, metionina).

Ze względu na duży stopień skomplikowania układów biologicznych poznanie mechanizmów reakcji rodnikowych zachodzących *in vitro* w wybranych prostych, modelowych biocząsteczkach może się przyczynić do zrozumienia procesów rodnikowych zachodzących *in vivo* oraz przeciwdziałania ich negatywnym skutkom. Do grupy intensywnie badanych związków modelowych zaliczają się aminokwasy zawierające siarkę w postaci grupy tioeterowej oraz peptydy zawierające metioninę. Wynika to z bardzo złożonej chemii procesów rodnikowych z udziałem grupy tioeterowej jak również z ważnej roli jaką odgrywa metionina w procesach biochemicznych.

1.2. Rola aminokwasów zawierających grupę tioeterową w cząsteczkach białkowych

1.2.1. Lokalizacja w cząsteczkach i własności chemiczne.

W układach białkowych grupa tioeterowa (-S-) występuje w resztach aminokwasów (głównie metioniny) oraz w wiązaniach tioeterowych np. łączących grupę hemową z białkiem w *cytochromach c i c1* (Stryer 1986).

Metionina, wchodząca w skład większości naturalnych białek, spełnia wiele funkcji biochemicznych w organizmach, a poprzez swoje metabolity (np. adenozyno-metionina) bierze udział w procesach syntezy białek (transmetylacja, synteza poliamin, transsulfuracja, oraz dealkilacja i transalkilacja) (Torchinsky 1981, Aksnes, 1984, Huxtable 1986, wraz z literaturą cytowaną).

Rola jaką pełni metionina w cząsteczkach białkowych wynika z połączenia w unikalną kombinację własności hydrofobowych bocznego łańcucha alifatycznego oraz nukleofilowej reaktywności i własności elektronodonorowych tioeterowej siarki.

Ze względu na własności *hydrofobowe* bocznego łańcucha alifatycznego¹ reszty metioninowe znajdują się przeważnie wewnątrz cząsteczek białkowych, gdzie biorą udział w oddziaływaniach hydrofobowych stabilizując ich trzeciorzędową strukturę (Teh-Yung 1977, Morgan *i in.* 1978, Torchinsky 1981, Gellman 1991, wraz z literaturą cytowaną). Grupa tioeterowa ma zbliżone do grupy metylenowej ($-\text{CH}_2-$) wartości kątów i długości wiązań (Tagaki 1977). Dzięki temu możliwe jest powstawanie tzw. *analogów strukturalnych* tj. podstawienie grup tioeterowych w miejsce metylenowych, co powoduje tylko niewielkie zmiany struktury przestrzennej cząsteczek (np. włączenie kwasów alkilotiokarboksyłowych w cykl przemian kwasów tłuszczowych). W pewnych przypadkach tego rodzaju podstawienie może jednak znacząco wpływać na konformację i reaktywność makrocząsteczek. Mylony z właściwym bioligandem, jego analog strukturalny, nie może zastąpić bioligandu w jego funkcjach biologicznych, a jego przyłączenie do bioreceptora, może prowadzić do upośledzenia układu biologicznego (Herman 1981, Siemion 1985 wraz z literaturą cytowaną).

Własności elektronodonorowe, duża polaryzowalność i stosunkowo mała elektroujemność atomu siarki powodują, że grupa tioeterowa jest słabą zasadą Lewisa (słabym *nukleofilem*)². Bierze ona udział w tworzeniu wiązań koordynacyjnych z kationami metali w metaloproteinach np. z żelazem hemowym (Fe^{2+}) w *cytochromie c* (Stryer 1986, Siemion 1985), z miedzią (Cu^{2+}) w *azuryinie* (Chothia i Lesk 1982, Adman 1984, Guss *i in.* 1988, Lappin 1973) oraz w strukturze miejsc aktywnych enzymów np. w *rybonukleazie A*, (Torchinsky 1981 wraz z literaturą cytowaną).

Siarka tioeterowa nie wiąże protonów³, a jej dwie wolne pary elektronowe (w hybrydyzacji sp^3) pozostają odsłonięte w zakresie pH 1 - 14. Odsłonięta, nieprotonowana grupa tioeterowa może być znacznie łatwiej od innych grup nukleofilowych występujących w cząsteczkach białek (np. $-\text{NH}_2/\text{NH}_3^+$), selektywnie modyfikowana (poprzez alkilowanie, utlenianie, fotoutlenianie itp.) w szerokim zakresie pH. Modyfikacje takie prowadzą do pojawienia się ładunku lub grupy o charakterze dipolowym w miejsce grupy niepolarnej. Te okoliczności oraz fakt, że

¹ W skali hydrofobowości, opartej na wielkości udziału łańcucha bocznego aminokwasu w energii swobodnej przeniesienia aminokwasu ze 100% fazy organicznej do wody, metionina zajmuje miejsce tuż obok "całkowicie alifatycznej" waliny (Nozaki i Tanford., 1971, Torchinsky., 1981).

² Elektroujemność siarki w skali Paulinga wynosi 2,5 (Lee., 1994). W klasyfikacji Pearsona grupa tioetrowa jest miękką zasadą (miękkim donorem) (Jones., 1988, Hulanicki., 1992)

³ W klasyfikacji Pearsona proton jest twardym kwasem a grupa $-\text{NH}_2$ twardą zasadą.

wraz z modyfikacją wzrasta zawada przestrzenna, mogą prowadzić do zmiany natywnej konformacji białka, lub w ostateczności do całkowitej jego destabilizacji i utraty własności biologicznych (np.: utlenianie metioniny do sulfotlenku pozbawia ją funkcji donora grup metylowych) (Tagaki 1977, Teh-Yung 1977, Torchinsky 1981, Aksnes 1984, Brot i Weissbach 1988, Schöneich *i in.* 1993, Vogt 1995, wraz z literaturą w nich cytowaną). Z problemem tym spotykamy się podczas biologicznej inaktywacji hormonów (Manning *i in.* 1989) (np. ludzki hormon wzrostu, kortykotropina, hormon tarczycy), biologicznej inaktywacji enzymów (Evans i Pryor 1992) (inhibitor α -1-proteinazy), zmian strukturalnych w białkach (subtylizyna, tripsyna), w procesach starzenia się oraz w innych stanach patologicznych (Brot i Weissbach 1988, Schöneich *i in.* 1996) (powstawanie katarakty w soczewce oka), a także w syntezie, izolacji i projektowaniu białek ważnych z punktu widzenia farmakologicznego (Perlman i Nguyen 1992)⁴.

Utlenianie leków białkowych (na które są one narażone podczas syntezy, oczyszczania, przechowywania itp.) może prowadzić do modyfikacji ich własności fizykochemicznych, a w konsekwencji do utraty ich aktywności biologicznej, niepożądaney reakcji układu immunologicznego organizmu, a także zmiany farmakokinetyki (Manning *i in.* 1989, Schöneich *i in.* 1995, Li *i in.* 1995a i b, 1996).

Z punktu widzenia genetyki, mimo że uszkodzenie DNA przez rodniki ma dalej idące bezpośrednie konsekwencje dla organizmu, to uszkodzenie białek (szczególnie w enzymach biorących udział w naprawie DNA) może znacznie zwiększać niekorzystne efekty działania rodników. Ponadto, ze względu na duże stężenie białek

⁴ Leki zawierające aminokwasy tioeterowe (głównie metioninę, a ostatnio tiaprolinę) stosowane są między innymi: w stłuszczeniu wątroby (marskość wątroby na tle alkoholizmu, niezakaźnym uszkodzeniu wątroby przez czynniki toksyczne), przy diecie niepełnowartościowej, w chemoterapii grzłzicy, w ciężkich przypadkach oparzeń, w zatruciach po przedawkowaniu leków oraz u niemowląt w zatruciach pochodzenia jelitowego oraz w niedokrwistości na tle ołowicy. Dostępne na polskim rynku preparaty to między innymi: zawierające metioninę Metiovit, Terapin, Polfamin, Methioninum (Polfa), Amurex (Reid-Provient, USA), Cho-Meth (Kenyon, USA), Lobamine (Lobica, Francja), Methionin (Germed, DDR), Methionine (Abbott, USA), Oradash (Lambda, USA), Pedameth (O'Neal, Jons, USA) oraz tiaprolinę Hepargen (Syntex, RFN), (Podlewski i Chwalibogowska 1978, Chruściel i Gibiński 1991).

w komórkach w porównaniu z innymi składnikami) stanowią one jeden z głównych obiektów ataku rodnikowego⁵.

Z drugiej strony przedstawiono dowody, że utlenianie metioniny może prowadzić do zwiększenia aktywności biologicznej niektórych białek, oraz że utlenianie reszt metioninowych do sulfotlenku może być odwracalne w procesach enzymatycznych. Pozwala to przypuszczać, że proces utleniania-redukcji metioniny może być jednym z czynników regulacji równowagi fizjologicznej i mieć istotne znaczenie dla regulacji funkcji biologicznych białek (Vogt 1995, wraz z literaturą cytowaną).

1.2.2. Udział w procesach przenoszenia elektronu

Udział aminokwasów z grupą tioeterową w procesach redokсовых zachodzących w białkach jest zdeterminowany przez reaktywność nukleofilową siarki tioeterowej. Utleniony atom siarki wykazuje silną tendencję do stabilizacji przez koordynację wolnych par *p*-elektronowych atomów siarki lub innych heteroatomów tworząc wiązania trójelektronowe (patrz p. 2.5.2). Zarówno kationorodnik $>\text{S}^{\cdot+}$ jak i indywidua z wiązaniami trójelektronowymi typu $\text{Met}_2[\text{S}:\text{S}]^+$ lub $\text{Met}[\text{S}:\text{X}]$ nie reagują z O_2 (Schäfer 1978). Indywidua te wykazują własności utleniające⁶, a ich reakcje z reduktorami mogą prowadzić do odtworzenia metioniny.

Jak wykazano w szeregu prac (wykonanych głównie przez grupy Prütza i Bobrowskiego⁷ *vide infra*) utlenione centrum siarkowe, w zawierających metioninę naturalnych i syntetycznych peptydach oraz prostych białkach (*Rybonukleaza A*), bierze udział w procesach międzycząsteczkowego i wewnątrzcząsteczkowego

⁵ Oszacowany przez Greenstocka udział iloczynu stałej szybkości reakcji białek z rodnikiem OH i stężenia białek w komórce do sumy iloczynów stałych szybkości i stężeń wszystkich składników komórki ($k_{\text{OH}}[\text{C}]/\text{S } k_i[\text{C}]_i$) wynosi 21%, podczas gdy dla DNA zaledwie 1.5% (Greenstock., 1988).

⁶ Znane są potencjały redox kationorodników prostych tioeterów alifatycznych ($E^\circ(>\text{S}^{\cdot+}/>\text{S})$ i $E^\circ((>\text{S})_2^{\cdot+}/(>\text{S})_2)$), które w pH ~ 7 , mają wartości rzędu 1,4 -1,6 V (Schwarz i Dodson, 1984, Huie *i in.* 1991, Engman *i in.* 1994, Merenyi *i in.* 1996). Ponadto, dla metioniny $E^\circ(\text{Met}/\text{SN}^{\cdot+}) \sim 1,4$ V (Prütz *i in.* 1989).

⁷ Prace te w większości zostały wykonane przy użyciu $\text{Br}_2^{\cdot-}$ jako jednoelektronowego utleniacza wykorzystując jego selektywną reakcję z metioniną (Adams *i in.* 1972, Prütz., 1990).

przeniesienia elektronu z aminokwasów takich jak tryptofan, tyrozyna oraz cysteina⁸ (Bobrowski i Łubis 1986, Bobrowski *i in.* 1990, 1992, 1995, Bobrowski 1990, Prütz 1982, 1985, 1987, 1990, Vesterman *i in.* 1991, Bensasson *i in.* 1993 wraz z cytowanymi pracami).

Szybkość wewnątrzcząsteczkowego przeniesienia elektronu zależy od udziału w procesie mechanizmów "przez przestrzeń" i "przez wiązania". Udział w/w mechanizmów jest zdeterminowany przez budowę peptydu, własności konformacyjne łańcucha oddzielającego centrum donorowe od siarki oraz pH środowiska. (Prütz *i in.* 1982, 1985, 1986, 1989, Prütz 1990, Bobrowski i Łubis 1986, Bobrowski *i in.* 1990, 1992, 1995, Bobrowski 1990, Vesterman *i in.* 1991).

1.2.3. Udział w procesach fragmentacji

Indukowane rodnikami OH utlenianie peptydów metioninowych, zawierających reszty aminokwasów alifatycznych, może prowadzić do ich degradacji w procesach dekarboksylacji (uwalniania CO₂) i dekarbonylacji (uwalniania prostych aldehydów). Wydajność tych procesów zależy od budowy peptydu: sekwencji aminokwasów w cząsteczce, położenia i rodzaju grup sąsiadujących takich jak karboksylowa (z Asp lub Glu), aminowa (z Lys), amidowa (z wiązania peptydowego), czy hydroksylowa (z Thr i Ser); własności konformacyjnych łańcucha peptydowego, stężenia peptydu oraz pH środowiska (Bobrowski 1990, Bobrowski *i in.* 1991a i b, Schöneich *i in.* 1991, 1994). W większości przypadków indukowane rodnikami OH procesy fragmentacji peptydów prowadzą do powstania redukujących rodników α -aminoalkilowych⁹, których obecność zmienia własności redoks układu i w konsekwencji kierunek przemian rodnikowych z utleniania na redukcję (np.: redukcja cysteiny, Prütz *i in.* 1989; czy "indukowana rodnikiem OH" redukcja *cytochromu c*, Simic i Taub 1977).

⁸ Potencjały redox rodników tryptofanu, tyrozyny i cysteiny w pH ~ 7 wynoszą: E°(TrpH^{•+}/Trp) ~ 1,02 V, E°(TyrO[•]/Tyr) ~ 0,93 V (Harriman, 1987), E°(CysS^{•-}/Cys) ~ 0,92 V (Surdhar i Armstrong., 1986).

⁹ Szacuje się, że potencjał redox rodników α -aminoalkilowych metioniny jest niższy od -1,6 V (Prütz *i in.* 1989).

1.3. Radiacyjne metody badania procesów rodnikowych

Z reguły wykorzystanie uzupełniających się wzajemnie metod eksperymentalnych może dać pełny obraz zachodzących w układzie procesów. Stosowane w chemii radiacyjnej metody badania procesów rodnikowych można podzielić na dwie główne grupy:

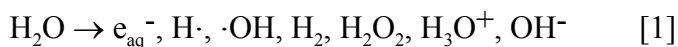
(a) - metody pośrednie, w których o powstawaniu i przemianach rodnikowych produktów pośrednich wnioskuje się na podstawie analizy proponowanych schematów reakcji następnych prowadzących do oznaczonych analitycznie produktów cząsteczkowych. Polegają one na napromienianiu obiektu za pomocą stacjonarnych izotopowych lub akceleratorowych źródeł promieniowania jonizującego, a następnie identyfikacji oraz oznaczaniu powstałych produktów radiolizy za pomocą czułych metod analitycznych głównie spektrofotometrii absorpcyjnej i metod chromatograficznych;

(b) - metody bezpośrednie to, (i) pomiary kinetyczne przeprowadzane w bardzo krótkich czasach (10^{-12} - 10^{-3} sekundy) z użyciem radiolizy impulsowej wyposażonej w systemy szybkiej detekcji (spektrofotometrycznej, konduktometrycznej, polarograficznej, elektronowego rezonansu paramagnetycznego i innych (von Sonntag 1987, Bensasson *i in.* 1993). (ii) wykorzystanie niskich temperatur (począwszy od 4 K) do stabilizacji i identyfikacji rodnikowych produktów pośrednich za pomocą elektronowego rezonansu paramagnetycznego lub spektrofotometrii absorpcyjnej.

1.3.1. Radioliza wody

Zarówno w metodach bezpośrednich jak i pośrednich śledzenia przemian rodnikowych powszechnie stosowane jest wykorzystanie radiolizy wody jako etapu inicjującego ciąg reakcji rodnikowych. Reakcje te zachodzą z udziałem rozpuszczonego w wodzie badanego związku.

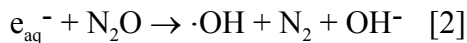
Proces radiolizy wody można w uproszczeniu przedstawić równaniem sumarycznym [1] (Kroh 1986, von Sonntag 1987, Bensasson *i in.*, 1993 wraz z cytatami):



W roztworach wodnych, gdy stężenie rozpuszczonych związków nie jest zbyt duże ($< 1 \text{ mol dm}^{-3}$), powstają takie same rodniki pierwotne jak w czystej wodzie. Dopiero

gdy ułamek molowy rozpuszczonego związku staje się porównywalny z ułamkiem molowym wody, w roztworze pojawiają się produkty bezpośredniej radiolizy związku rozpuszczonego. Produkty powstające w procesie radiolizy wody [1] dają roztwór homogeniczny w czasie krótszym niż 100 ns (Kroh 1986, von Sonntag 1987, Bensasson *i in.*, 1993 wraz z cytatami). Wydajności chemoradiacyjne pierwotnych produktów radiolizy wody, mierzone jako liczba cząsteczek lub atomów powstałych w wyniku pochłonięcia przez układ 100 eV energii, były wyznaczone przez wielu autorów różnymi metodami. Obszerne omówienie tej tematyki jest zawarte w wielu pracach przeglądowych (Kroh 1986, Farhataziz i Rodgers, 1987, Tabata *i in.* 1991).

Rodniki $\cdot\text{OH}$, $\cdot\text{H}$ i e^-_{aq} wykazują własności silnych jednoelektronowych odczynników redoks. Badanie reakcji tych odczynników komplikuje fakt, że w reakcji radiolizy wody silne reduktory (e^-_{aq} $\{E^0(\text{H}_2\text{O}/e^-_{\text{aq}}) \sim -2,9 \text{ V}; G \sim 2,6\}$ i $\text{H} \{E^0(\text{H}^+/\cdot\text{H}) \sim -2,4 \text{ V}; G \sim 0,55\}$) powstają jednocześnie w ilości niemal równej ilości silnego utleniacza ($\text{OH} \{E^0(\cdot\text{OH}, \text{H}^+/\text{H}_2\text{O}) \sim 2,7 \text{ V}, G \sim 2,7\}$). Z tego powodu, aby otrzymać środowisko wyłącznie silnie utleniające lub silnie redukujące, eksperymenty wykonuje się wprowadzając do roztworu związku (tzw. zmiatacze), które w selektywnych reakcjach eliminują z roztworu niepożądane rodniki. Warunkiem koniecznym stosowania tego postępowania jest dobranie takiego iloczynu stężenia zmiatacza i stałej szybkości reakcji zmiatacza ze zmiatanym rodnikiem, tak aby był on co najmniej o jeden rząd wielkości większy od iloczynu stężenia związku badanego i jego stałej szybkości reakcji z "niepożądanym" rodnikiem. Przykładowo, w celu uzyskania środowiska silnie utleniającego stosuje się zmiatanie elektronu solwatowanego przez podtlenek azotu w reakcji [2]



Reakcja ta, wykorzystywana w tej pracy, jest szczegółowo omówiona w części doświadczalnej.