

Projekt pn. „Wzmocnienie potencjału dydaktycznego UMK w Toruniu w dziedzinach matematyczno-przyrodniczych”  
realizowany w ramach Poddziałania 4.1.1 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki

# Wolne rodniki w chemii, biologii i medycynie

Halina Kaczmarek  
Alina Sionkowska

UMK Toruń 2013

Projekt pn. „Wzmocnienie potencjału dydaktycznego UMK w Toruniu w dziedzinach matematyczno-przyrodniczych”  
realizowany w ramach Poddziałania 4.1.1 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki

Halina Kaczmarek

## CZĘŚĆ I. WOLNE RODNIKI W CHEMII

### 1. Pojęcie i rodzaje rodników

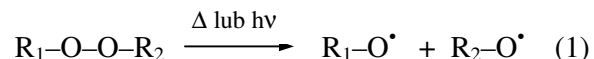
**Rodniki, wolne rodniki** (termin angielski – *radicals, free radicals*) według definicji Międzynarodowej Unii Chemii Czystej i Stosowanej (IUPAC - *International Union of Pure and Applied Chemistry*) są to indywidualne chemiczne (atomy lub cząsteczki), na przykład  $\cdot\text{CH}_3$ ,  $\cdot\text{SnH}_3$ ,  $\cdot\text{NO}$ ,  $\cdot\text{NO}_2$ ,  $\text{Cl}\cdot$ ,  $\text{H}\cdot$  zawierające niesparowane elektrony, tj. układy o spinie elektronowym różnym od 0 (IUPAC Gold Book, <http://goldbook.iupac.org/R05066.html>). Najprostszym rodnikiem jest atom wodoru. Słowo „rodnik”, pochodzące od łacińskiego „radix”, oznaczającego korzeń, funkcjonuje od około 200 lat [1-3]. Rodniki mają duży wpływ na nasze życie i zdrowie. Są obecne w przyrodzie - powstają w atmosferze ziemskiej pod wpływem promieniowania słonecznego, podczas procesów spalania, znajdują się również w dymie od papierosów (oszacowana liczba rodników w dymie papierosowym z jednego wydechu wynosi  $10^{14}$ !).

Przyczyniają się do starzenia organizmów żywych i rozkładu żywności ale wykorzystujemy je też w wielu syntezach organicznych, np. do produkcji lub modyfikacji tworzyw sztucznych.

Dawniej powszechnie stosowano termin „wolne rodniki” ponieważ „rodniki” były jednocześnie synonimem podstawników związanych z cząsteczką związku chemicznego za pomocą wiązań kowalencyjnych. Chciał zgodnie z zaleceniami nomenklaturowymi, nie jest konieczne stosowanie określenia „wolne” przed słowem „rodniki”, to jednak w aktualnej literaturze naukowej funkcjonują obydwa terminy. Wyraz „wolny” używa się też w celu podkreślenia braku występowania par rodnikowych. Pary rodników (ang. *radical pair, geminate pair*) mogą występować dzięki efektowi „klatki” np. w rozpuszczalnikach.

Atom z niesparowanym elektronem zwany jest **centrum rodnikowym** lub **centrum aktywnym**. W niektórych układach rodnikowych np. aromatycznych niesparowany elektron jest zdelokalizowany, co przyczynia się do jego znacznej trwałości [4-8].

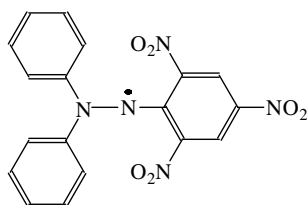
Rodniki powstają łatwo ze związków chemicznych zawierających nietrwałe wiązania kowalencyjne, przykładem których mogą być nadtlenki alkilowe zawierające słabe ugrupowanie nadtlenkowe ulegające pękaniu zarówno pod wpływem ciepła jak i światła:



Innymi czynnikami wywołującymi reakcje tworzenia rodników są: promieniowanie radiacyjne, wyładowania elektryczne, ultradźwięki, siły mechaniczne, a także związki chemiczne lub biologiczne (np. enzymy).

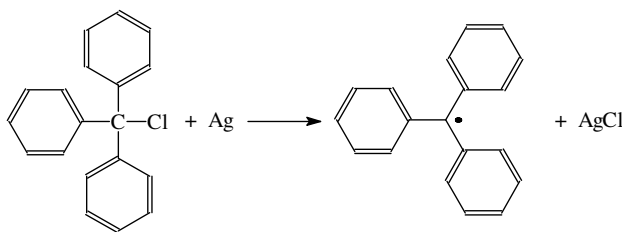
Rodniki powstające wskutek homolitycznego rozpadu wiązań chemicznych są zazwyczaj bardzo nietrwałe i reaktywne (np. rodniki metylowe, fenylowe) ale znane są też układy o wyjątkowo dużej stabilności, np. 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl (DPPH):

Projekt pn. „Wzmocnienie potencjału dydaktycznego UMK w Toruniu w dziedzinach matematyczno-przyrodniczych”  
realizowany w ramach Poddziałania 4.1.1 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki



DPPH (2)

Pierwsze wolne rodniki zostały otrzymane i opisane na przełomie XIX i XX wieku. Historyczne znaczenie miało odkrycie względnie trwałego rodnika tryfenylometanowego powstającego w reakcji tryfenylchlorometanu ze srebrem metalicznym:

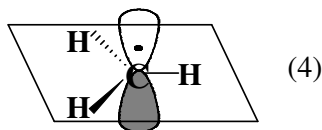


(3)

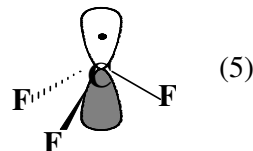
Rodnik tryfenylometanowy nie jest strukturą płaską (pierścienie leżą w płaszczyznach odchylonych od siebie o ok. 30°). Ze względu na przeszkody steryczne, w reakcji rekombinacji (dimeryzacji) ulega on jednocześnie przegrupowaniu.

Rodniki, w których niesparowany elektron zajmuje orbital  $s$  lub  $p$  są nazywane rodnikami typu  $\sigma$  lub  $\pi$ . W zależności od rodzaju atomu, na którym zlokalizowany jest elektron, mówimy o rodnikach węglowych, tlenowych lub rodnikach innych pierwiastków. Ogólnie można podzielić rodniki na nieorganiczne i organiczne.

Najprostszy rodnik organiczny – metylowy ( $\cdot\text{CH}_3$ ) ma budowę płaską (4), co wynika z hybrydyzacji  $sp^2$  atomu węgla, przy czym niezhybrydowany orbital  $2p_z$  z pojedynczym elektronem jest prostopadły do płaszczyzny, w której leżą atomy wodoru i węgla [5, 7]. Podstawienie atomu wodoru przez elektroujemny atom (np. chlorowiec) lub grupę elektronodonorową (np.  $-\text{OH}$ ,  $-\text{NH}_2$ ) powoduje przekształcenie struktury płaskiej w piramidalną (5).



(4)



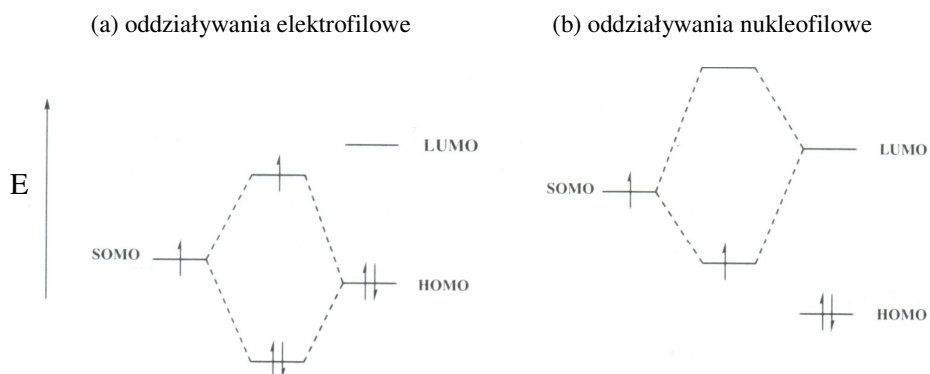
(5)

Elektron w rodnikach opisywany jest przez pojedynczo zajęty orbital molekularny **SOMO** (ang. *Singly Occupied Molecular Orbital*), którego energia leży pomiędzy orbitalami **HOMO** (*Highest-energy Occupied Molecular Orbital*) i **LUMO** (*Lowest-energy Unoccupied Molecular Orbital*).

Rodniki można też podzielić na rodniki o charakterze nukleofilowym i elektrofilowym. Te właściwości zależą od oddziaływań z drugim substratem.

Projekt pn. „Wzmocnienie potencjału dydaktycznego UMK w Toruniu w dziedzinach matematyczno-przyrodniczych”  
realizowany w ramach Poddziałania 4.1.1 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki

Podstawniki o charakterze elektronoakceptorowym sąsiadujące z atomem rodnikowym obniżają, podczas gdy podstawniki elektronodonorowe podwyższają energię SOMO. Ma to wpływ na oddziaływania z cząsteczkami nierodnikowymi drugiego substratu, czyli jego orbitalami HOMO i LUMO (Rys. 1). Energia rodników elektrofilowych jest bliższa energii HOMO, stąd tworzenie orbitali molekularnych przedstawionych na rys. 1a. W wyniku reakcji chemicznej rodników o charakterze nukleofilowym (o wyższej energii SOMO) z innymi cząsteczkami dominują oddziaływania z LUMO (rys. 1b). Ten sam rodnik może odgrywać rolę czynnika nukleofilowego lub elektrofilowego w zależności od charakteru drugiego reagenta. Oddziaływania elektrofilowe i nukleofilowe rodników wzrastają gdy energia między odpowiednimi orbitalami maleje [5,7].



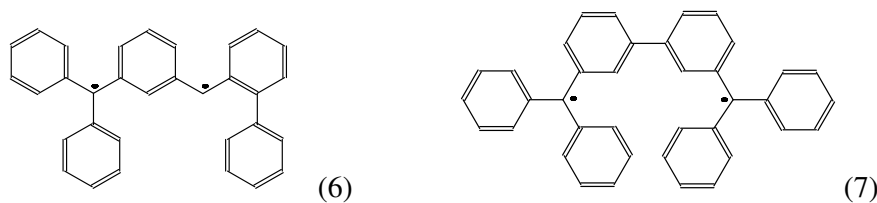
Rys. 1. Schemat poziomów energetycznych oraz oddziaływania orbitalu SOMO i HOMO (a), SOMO i LUMO (b) [5]

Rodniki mają właściwości paramagnetyczne (niezerowy moment magnetyczny, dzięki któremu zachodzi porządkowanie się spinów elektronów zgodnie z liniami zewnętrznego pola magnetycznego) w odróżnieniu od diamagnetyków, których wszystkie elektrony są sparowane. Przenikalność magnetyczna ( $\mu$ ) paramagnetyków jest nieco większa od jedności (w przypadku ferromagnetyków  $\mu \gg 1$ ).

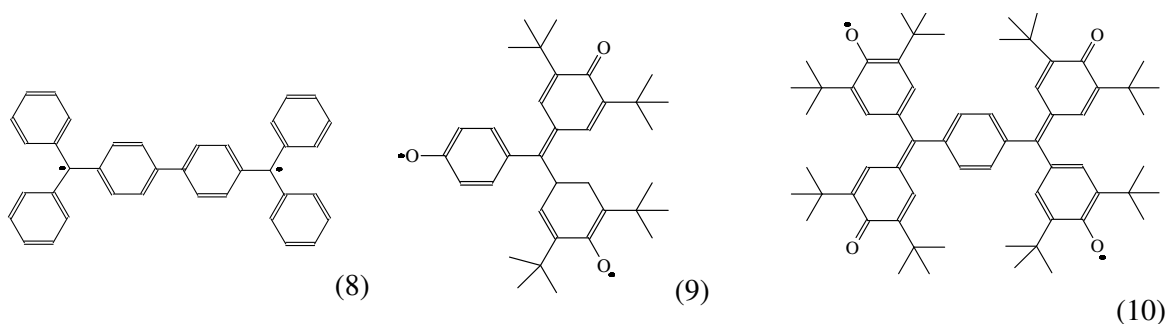
Znane są też układy, w których występują dwa centra rodnikowe (tj. dwa niesparowane elektrony), które nie reagują nawzajem ze sobą. Nazywane są **birodnikami** (*biradicals*). W przypadku występowania niesparowanych elektronów w dwóch stanach o różnej multipletowości stosuje się termin **dirodnik** (*diradical*).

Odkrycie i pierwsze syntezy stabilnych birodników zawdzięczamy Wilhelmowi Schlenkowi (1879 – 1943, niemiecki chemik) i Mosesowi Gombergowi (1879 – 1943, prof. University of Michigan, pochodzenia rosyjskiego). Były to struktury trifenylometanowe (6, 7), nazywane też węglowodorami Schlenka-Braunsa (*Schlenk-Brauns hydrocarbons*):

Projekt pn. „Wzmocnienie potencjału dydaktycznego UMK w Toruniu w dziedzinach matematyczno-przyrodniczych” realizowany w ramach Poddziałania 4.1.1 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki



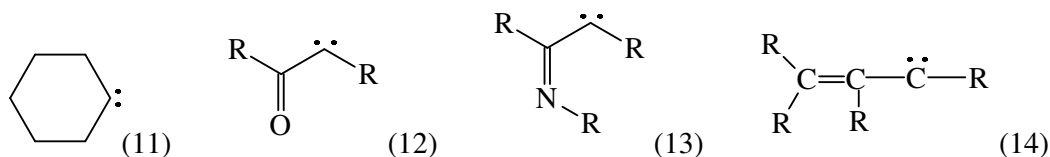
Inne birodniki o znaczeniu historycznym zostały zsyntezowane przez Tschitschibabina (8) w 1907r., Yanga (9) w 1960r. i Coppingera (10) w 1962r.



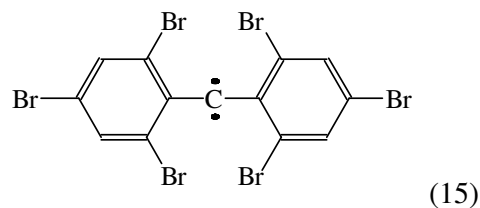
Szczególnym przypadkiem birodników są karbeny i nitreny.

**Karbeny** (ang. *carbenes*) o wzorze ogólnym  $\text{:CR}_1\text{R}_2$  (np.  $\text{:CH}_2$ ,  $\text{:CCl}_2$ ) są cząsteczkami, w których atom węgla tworzy dwa wiązania kowalencyjne z sąsiednimi atomami. Są bardzo reaktywnymi związkami organicznymi (często są związkami przejściowymi, które można otrzymać w bardzo niskich temperaturach) występującymi w stanie singletowym lub trypletowym. Karben w stanie trypletowym jest birodnikiem o hybrydyzacji  $sp^2$ , natomiast w stanie singletowym -  $sp^2$ .

Znane są również karbeny cykliczne (np. cykloheksylidenowy), acylowe, iminowe, winylowe:



Przykładem trwałego trypletowego karbenu jest bis(2,4,6-tribromofenilo)karben, którego wzór strukturalny przedstawiono poniżej:

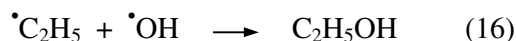


Projekt pn. „Wzmocnienie potencjału dydaktycznego UMK w Toruniu w dziedzinach matematyczno-przyrodniczych”  
realizowany w ramach Poddziałania 4.1.1 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki

**Nitreny** (ang. *nitrenes*, synonimy: *aminylenes*, *aminediyls*, *imidogens*, *azenes*) :N–H, :N–R (np. CH<sub>3</sub>N• metylonitren) są obojętnymi cząsteczkami zawierającymi jedno wiązanie kowalencyjne azot-wodór lub azot-węgiel. Podobnie jak karbeny mogą występować w stanie singletowym lub trypletowym.

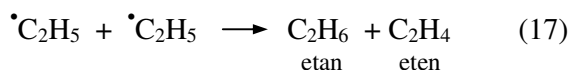
Innym rodzajem rodników są układy obdarzone dodatkowo ładunkiem, czyli **jonorodniki**: kationorodniki, anionorodniki (ang. *radical ions*, *radical anions*, *radical cations*). Przykładami takich jonorodników mogą być kationorodniki benzenu C<sub>6</sub>H<sub>6</sub><sup>•+</sup> lub anionorodniki benzofenonu (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub>C–O<sup>•-</sup>. Często, ale nie zawsze, niesparowany elektron i ładunek występują przy tym samym atomie.

Wolne rodniki łatwo ulegają **reakcji rekombinacji** (*radical combination*, *colligation*), w wyniku której tworzy się wiązanie kowalencyjne np.



Ta samorzutna reakcja nie wymaga energii i jest kontrolowana dyfuzyjnie. Utrudnieniem w rekombinacji mogą być przeszkody steryczne; można ją też zahamować obniżając temperaturę (w stanie zamrożonym ruchliwość cząsteczek jest ograniczona).

Innym mechanizmem dezaktywacji rodników jest dysproporcjonowanie związane z przeniesieniem atomu wodoru z jednego rodnika na drugi. W przypadku rodników węglowodorowych prowadzi to do utworzenia alkanu i alkenu:



## 2. Nomenklatura rodników

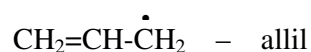
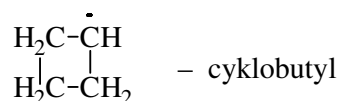
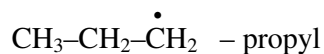
Zalecenia nomenklaturowe (wg rekomendacji IUPAC: Revised Nomenclature for Radicals, Ions, Radical Ions and Related Species, IUPAC Recommendations 1993, RC-81 Radicals, <http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/ions/RC811.html#p1>) opublikowano w czasopiśmie Pure and Applied Chemistry, 65, 1993, 1375-1455, a wersję polskojęzyczną w Wiadomościach Chemicznych (T. Sokołowska, A. Wiśniewski, Skorygowana nomenklatura rodników, jonów, jonorodników i podobnych indywiduów chemicznych, Wydawnictwo Uniwersytetu Wrocławskiego, Wrocław, 2001).

IUPAC dopuszcza stosowanie nazw zwyczajowych, powszechnie stosowanych w literaturze naukowej (a także skróconych i opisowych).

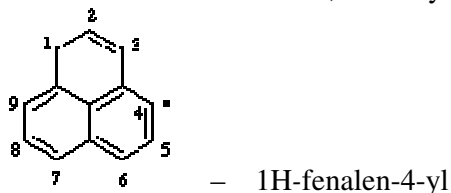
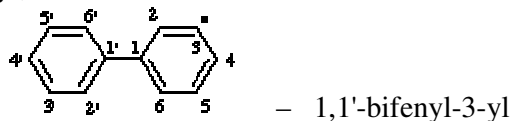
Nazwy rodników zlokalizowanych na atomach węgla, powstałych przez oderwanie atomu (rodnika) wodoru od cząsteczki, pochodzą od nazw macierzystych związków organicznych z końcówką *-yl*, *-il* np.:



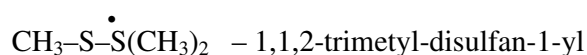
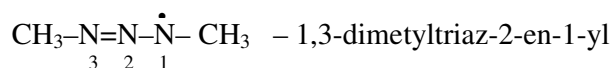
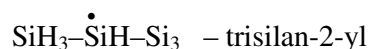
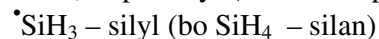
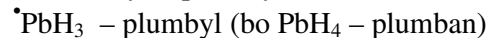
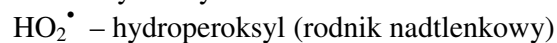
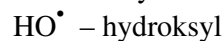
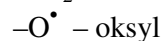
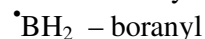
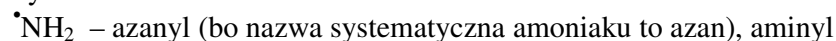
Projekt pn. „Wzmocnienie potencjału dydaktycznego UMK w Toruniu w dziedzinach matematyczno-przyrodniczych”  
realizowany w ramach Poddziałania 4.1.1 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki



Podobnie nazywamy rodniki powstałe ze związków aromatycznych: fenyl naftyl, antryl, fenantryl. Inne przykłady: furyl, pirydyl, piperidyl, quinolyl, izoquinolyl, tienyl czy hydrazyl,

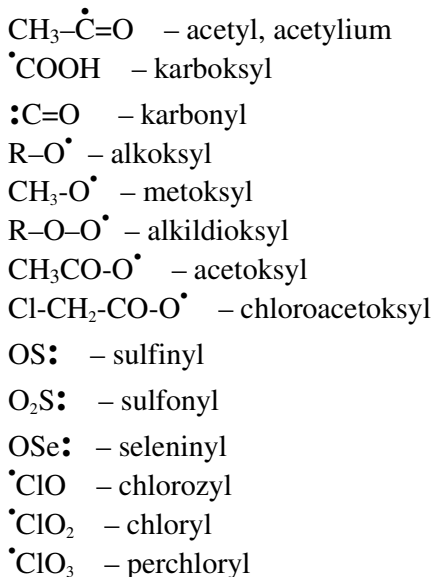


Nazwy rodników, w których wolny elektron znajduje się na atomach innych niż węgiel, na ogół również pochodzą od nazw wyjściowych związków. Ilustrują to poniższe przykłady:

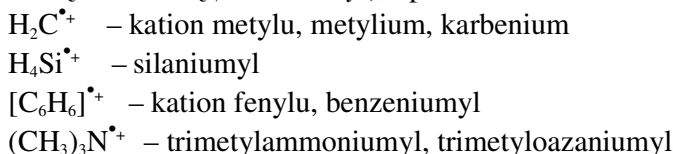


Projekt pn. „Wzmocnienie potencjału dydaktycznego UMK w Toruniu w dziedzinach matematyczno-przyrodniczych”  
realizowany w ramach Poddziałania 4.1.1 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki

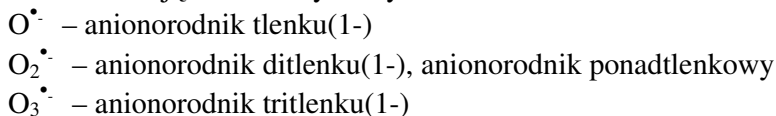
Poniżej wymieniono nazwy popularnych rodników zawierających charakterystyczne grupy funkcyjne:



Również w przypadku jonorodników, nazwa wywodzi się od obojętnej cząsteczki z odpowiednią końcówką (*-ium, -iumyl*), np.:



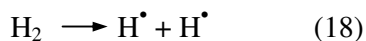
Jonorodniki zawierające tlen nazywamy:



### 3. Powstawanie rodników

Można wyróżnić kilka metod otrzymywania wolnych rodników. Najważniejszymi są: metoda termiczna (pirolityczna), radiacyjna, fotochemiczna i elektrochemiczna (tu wolne rodniki powstają podczas elektrolizy w pobliżu elektrod np. wodór *in statu nascendi* na katodzie).

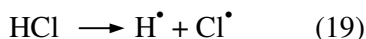
Pod wpływem ogrzewania substancji chemicznych w wysokich temperaturach (rzędu od kilkuset do kilku tysięcy °C) zachodzi rozkład cząsteczek na rodniki lub atomy, które w fazie gazowej znajdują się w równowadze termodynamicznej z wyjściowymi cząsteczkami. Dysocjacja homolityczna cząsteczek wodoru do atomów wodoru pod ciśnieniem 1 atmosfery zaczyna się w temperaturze 300°C.





Projekt pn. „Wzmocnienie potencjału dydaktycznego UMK w Toruniu w dziedzinach matematyczno-przyrodniczych”  
realizowany w ramach Poddziałania 4.1.1 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki

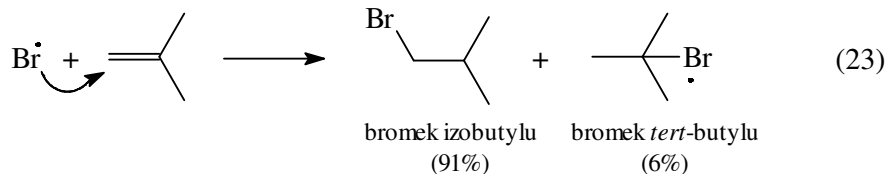
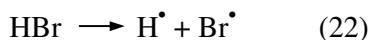
Dysocjacja gazowego chlorowodoru zachodzi w temperaturze jeszcze niższej (nieco powyżej 200°C):



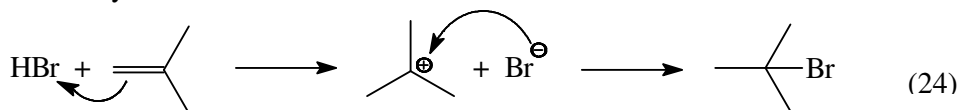
Stosunkowo łatwo, bo już w temperaturze 500-600°C, na atomy dysocjują też metale alkaliczne, co jest wykorzystywane do otrzymywania innych rodników np. organicznych ( $\text{R}^\bullet$ ) lub chlorowców ( $\text{X}^\bullet$ ):



Wiele związków organicznych rozkłada się w temperaturze nieznacznie przekraczającej 200°C. Jak stwierdzono, cząsteczka bromowodoru może ulegać homolizie nawet w temperaturze pokojowej. Stwierdzono to badając reakcje przyłączania bromowodoru do izobutenu. Mechanizm tej addycji jest różny w zależności od tego czy reakcja przebiega w obecności nadtlenków (22, 23), czy bez ich udziału (24).



W obecności nadtlenków, które wyjątkowo łatwo rozkładają się inicjując łańcuch reakcji rodnikowych, dominującym produktem jest bromek izobutyłu. Bez inicjatora nadtlenkowego mechanizm reakcji zmienia się na jonowy, co prowadzi do powstania głównie bromku *tert*-butyłu:



Przebieg tej regioselektywnej reakcji wyjaśnił Morris Karasch w latach 30-tych ubiegłego wieku.

Wzbudzenie atomów w płomieniu i możliwość pomiaru intensywności emitowanego przez nie promieniowania wykorzystuje się w fotometrii płomieniowej i absorpcyjnej spektroskopii atomowej (ASA), które są bardzo przydatne w ilościowej analizie różnych metali.

Fotochemiczna metoda generowania wolnych rodników wiąże się z wzbudzeniem cząsteczek promieniowaniem elektromagnetycznym z zakresu nadfioletu (UV), a czasami nawet z zakresu widzialnego (Vis). Warunkiem reakcji fotochemicznej jest absorpcja kwantu promieniowania, co prowadzi do przejścia elektronu ze stanu podstawowego do stanu wzbudzonego o wyższej energii (singletowego lub trypletowego). Aby zaszedł rozpad homolityczny, energia kwantu promieniowania musi być równa lub przekraczać energię dysocjacji wiązania chemicznego (Tabela 1).

Projekt pn. „Wzmocnienie potencjału dydaktycznego UMK w Toruniu w dziedzinach matematyczno-przyrodniczych” realizowany w ramach Poddziałania 4.1.1 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki

Tabela 1. Wartości energii wybranych wiązań chemicznych [4].

Wiązanie X–Y	Energia wiązania, kJ/mol	Wiązanie X–Y	Energia wiązania, kJ/mol
H–OH	498	H–Cl	431
Ph–H	464	H–Br	366
H <sub>3</sub> C–H	435	CH <sub>3</sub> –Cl	349
CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> –H	423	Cl–Cl	243
(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CH–H	410	Br–Br	192
(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> C–H	397	I–I	151
H <sub>3</sub> C–OH	383	HO–OH	213
PhCH <sub>2</sub> –H	372	H <sub>3</sub> CO–OCH <sub>3</sub>	151
H <sub>3</sub> C–CH <sub>3</sub>	368	CH <sub>3</sub> –Cl	349

Energia promieniowania ( $E$ ) jest odwrotnie proporcjonalna do długości fali ( $\lambda$ ), co wyraża wzór Plancka:

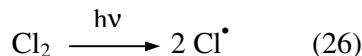
$$E = h\nu = h \frac{c}{\lambda} \quad (25)$$

gdzie  $h$  jest stałą Plancka ( $h = 6,626 \cdot 10^{-34} \text{ J}\cdot\text{s} = 4,136 \cdot 10^{-15} \text{ eV}\cdot\text{s}$ ), a  $\nu$  – częstością promieniowania.

Kwanty promieniowania widzialnego niosą energię zdolną do rozerwania najsłabszych wiązań chemicznych (~160-300 kJ/mol), podczas gdy energia promieniowania UV powoduje rozerwanie również wiązań trwałych (przykładowo kwant promieniowania o długości fali 200 nm ma energię ok. 590 kJ/mol).

Nie zawsze energia wzbudzenia jest wykorzystana do rozerwania wiązania chemicznego z utworzeniem rodników. Wzbudzone cząsteczki mogą ulegać przejściom promienistym (fluorescencji, fosforescencji), konwersji wewnętrznej, relaksacji oscylacyjnej, czy przeniesieniu energii, które nie prowadzą do aktów chemicznych.

Szczególnie podatne na rozkład pod wpływem światła są chlorowce:



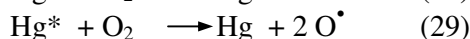
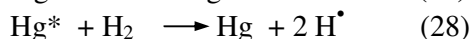
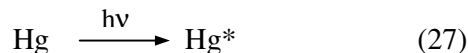
Zaletą metody fotochemicznego generowania rodników jest selektywność wzbudzenia określonych chromoforów w cząsteczkach w zależności od ich zdolności absorpcyjnych. Najczęściej stosuje się promieniowanie elektromagnetyczne z zakresu nadfioletu (200-380 nm) wykorzystując lampy kwarcowe lub lasery emitujące promieniowanie monochromatyczne o dużej intensywności. Dobór promieniowania o odpowiedniej energii pozwala na rozerwanie określonych wiązań chemicznych.

W przypadku konieczności użycia promieniowania o niezbyt dużej energii w celu zapobiegania zbyt gwałtownym procesom degradacyjnym związków organicznych korzystne jest stosowanie fotosensybilizatorów (fotouczulaczy). Ich działanie polega na zaabsorbowaniu energii promieniowania i przeniesieniu energii wzbudzenia na cząsteczki nieabsorbujące w

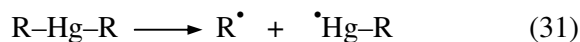
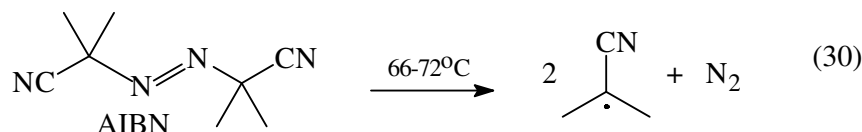
Projekt pn. „Wzmocnienie potencjału dydaktycznego UMK w Toruniu w dziedzinach matematyczno-przyrodniczych” realizowany w ramach Poddziałania 4.1.1 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki

danym zakresie, co pozwala na wywołanie reakcji fotochemicznej w tym związku, podczas gdy cząsteczka fotosensybilizatora wraca do stanu podstawowego bez zmiany struktury chemicznej [9].

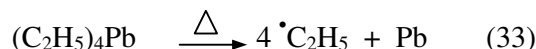
Przykładem reakcji sensybilizowanej fotolizy może być rozkład wodoru lub tlenu cząsteczkowego na atomy pod wpływem par rtęci, która ulega wzbudzeniu podczas działania promieniowania o długości fali 254 nm:



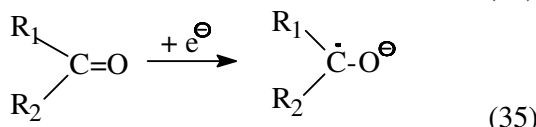
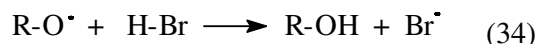
Słabe wiązania chemiczne, podatne na homolizę, oprócz nadtlenków organicznych, zawierają też związki azowe (np. 2,2'-dimetylo-2,2'-azodipropiononitryl, AIBN, reakcja 30) i organometaliczne (np. rtęcioorganiczne – reakcja 31, 32):



Stosowanym dawniej w motoryzacji związkiem metaloorganicznym dostarczającym wolnych rodników był tetraetyłolów, czteroetylek ołowiu(IV),  $(\text{C}_2\text{H}_5)_4\text{Pb}$ . Ulega on w podwyższonej temperaturze (ok.  $120^\circ\text{C}$ ) rozkładowi z wydzieleniem ołowiu metalicznego i czterech rodników etylowych (33), które przyczyniają się do łagodnego, niewybuchowego spalania benzyny. Dlatego stosowany był jako dodatek przeciwstukowy do paliwa samochodowego. Obecnie jest zastępowany innymi substancjami nie zawierającymi ołowiu.

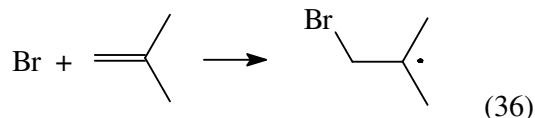


Oprócz homolitycznego pęknięcia słabych wiązań chemicznych można wymienić inne reakcje tworzenia rodników w związkach organicznych. Są to reakcje odrywania atomów (najczęściej wodoru) przez już istniejące w środowisku reakcyjnym rodniki (np. reakcja 34), czy przeniesienie elektronu (35):



Również reakcje przyłączania rodników (atomów) do wiązań podwójnych prowadzą do tworzenia produktów rodnikowych (np. przyłączenie atomów bromu do alkenów, reakcja 36).

Projekt pn. „Wzmocnienie potencjału dydaktycznego UMK w Toruniu w dziedzinach matematyczno-przyrodniczych”  
realizowany w ramach Poddziałania 4.1.1 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki



Metoda radiacyjna polega na tworzeniu wolnych rodników, jonów i cząsteczek wzbudzonych wskutek działania na materię wysokoenergetycznego (jonizującego) promieniowania elektromagnetycznego X lub  $\gamma$ , a także korpuskularnego [10].

Promieniowanie rentgenowskie (X), o długościach fal w zakresie od 20 do 0,05 Å, powstaje w wyniku oddziaływania szybkich elektronów z atomami ośrodka (np. wolframu), przy czym jego energia zależy zarówno od energii kinetycznej elektronów oraz rodzaju atomów. Źródłem promieniowania  $\gamma$  o długości fal od 1,0 do 0,01 Å (energia kwantu > 50 keV) są naturalne lub sztuczne pierwiastki promieniotwórcze, z których najczęściej stosowany jest izotop kobaltu  $^{60}\text{Co}$  emitujący kwanty o energii 1,173 i 1,332 MeV. Izotop ten jest stosowany w technice, medycynie i innych dziedzinach (np. do sterylizacji artykułów żywnościowych). Drugi typ promieniowania jonizującego to promieniowanie korpuskularne:  $\alpha$  i  $\beta$  emitowane przez izotopy promieniotwórcze (strumień jąder helu, elektronów, protonów, neutronów).

Oddziaływanie promieniowania jonizującego z materią składa się z trzech etapów:

1. Pierwszym jest bardzo krótki fizyczny proces wymiany energii między cząstkami promieniowania a cząsteczkami napromienianego materiału w zderzeniach sprężystych i niesprężystych ( $t < 10^{-15}$  s);
2. Drugi to etap fizykochemiczny, który polega na wytwarzaniu struktur chemicznych o różnym stopniu wzbudzenia, jonizacji i rozpadu rodnikowego ( $t \sim 10^{-12}$  s);
3. Etap chemiczny, podczas którego zachodzi dyfuzja i reakcje powstałych indywidualów chemicznych; może on trwać znacznie dłużej niż etap 1 i 2 ( $t \sim 10^{-8}$  s do kilku dni lub nawet miesięcy).

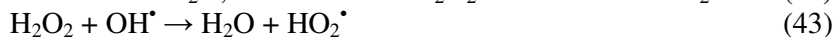
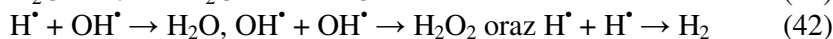
W metodzie radiacyjnej powstaje wiele różnorodnych produktów. Duża energia krótkofalowego promieniowania X lub  $\gamma$  prowadzi nie tylko do homolitycznej dysocjacji wiązań chemicznych ale też do jonizacji cząsteczek, która jest tu procesem dominującym. Czas życia radiacyjnie generowanych cząsteczek wzbudzonych, rodników i pierwotnych jonów jest bardzo krótki ( $10^{-15}$ - $10^{-12}$  s). W cieczach polarnych podczas radiolizy powstają solwatowane elektrony, które wywołują kolejne wtórne reakcje.

Badania rodników wytworzonych metodą radiacyjną wymagają stosowania technik pozwalających na detekcję krótkożyjących produktów aktywnych, do których należy np. radioliza impulsowa (opisana w części II).

Do najważniejszych reakcji radiacyjnych należy radioliza wody pod wpływem promieniowania  $\gamma$  (reakcje 37-45), zaobserwowana już przez Marię Curie-Skłodowską.



Projekt pn. „Wzmocnienie potencjału dydaktycznego UMK w Toruniu w dziedzinach matematyczno-przyrodniczych” realizowany w ramach Poddziałania 4.1.1 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki



gdzie  $\text{H}_2\text{O}^*$  oznacza wzbudzoną cząsteczkę wody.

Wolne rodniki mogą również powstawać pod wpływem ultradźwięków. Ta metoda generowania rodników nosi nazwę sonolizy (ang. *sonolysis*). Działanie ultradźwięków na wodę powoduje tworzenie rodnika hydroksylowego ( $\text{HO}^\bullet$ ), ponadtlenkowego ( $\text{HO}_2^\bullet$ ) i atomów wodoru, które szybko rekombinują. Podczas sonolizy chloroformu dominuje pękanie wiązania C-Cl. Stwarza to możliwość usuwania z roztworów zanieczyszczeń w postaci związków halogenoorganicznych ultradźwiękami.

Źródłem wielu rodników jest też plazma, która stanowi mieszaninę atomów, jonów, rodników i jonorodników oraz cząsteczek w stanie wzbudzonym [11].

Należy dodać, że wolne rodniki w różnych substancjach chemicznych mogą również powstawać pod wpływem sił mechanicznych, które prowadzą do rozrywania wiązań chemicznych. Szczególnie materiały poddane obróbce mechanicznej takiej jak rozdrabnianie, mielenie, cięcie, mogą zawierać rodniki (głównie na powierzchni), które ulegają dezaktywacji np. rekombinacji lub reakcji z tlenem atmosferycznym.

#### 4. Trwałość i charakter rodników

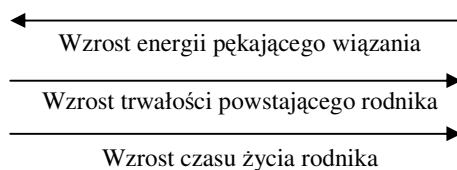
Wolne rodniki można podzielić na trzy typy:

- bardzo reaktywne o połowicznych czasach życia krótszych od  $10^{-3}$  s;
- rodniki stabilne o połowicznych czasach życia dłuższych od  $10^{-3}$  s;
- rodniki trwałe, persystentne (ang. *persistent radicals*).

Trwałość rodników można rozważać w aspekcie termodynamicznym i kinetycznym. Stabilność termodynamiczna jest zależna od energii potrzebnej do dysocjacji wiązania chemicznego lub energii wydzielonej w wyniku rekombinacji rodników. Wpływ na nią mają efekty koniugacji, hiperkoniugacji i mezomeria.

Stabilność kinetyczna jest uwarunkowana zatłoczeniem przestrzennym wokół centrum rodnikowego.

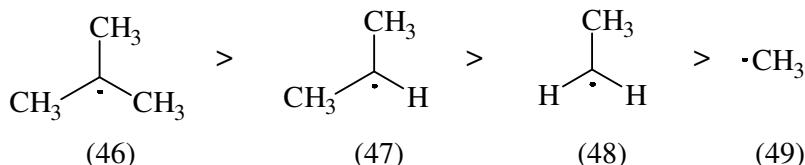
Im większa jest energia pękającego wiązania chemicznego, tym większa energia rodników i większa ich niestabilność (tj. krótszy czas życia).



Projekt pn. „Wzmocnienie potencjału dydaktycznego UMK w Toruniu w dziedzinach matematyczno-przyrodniczych”  
realizowany w ramach Poddziałania 4.1.1 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki

Uzeregowanie rodników wg stabilności pokrywa się z analogicznym szeregiem trwałości karbokationów.

Energia wiązania C-H zależy od rzędowości atomów węgla. Trzeciorzędowy, rodnikowy atom węgla jest bardziej stabilny niż drugorzędowy, a ten z kolei jest trwalszy niż pierwszorzędowy:

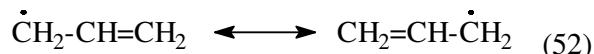


Wzrost stabilności rodników ze wzrostem rzędowości atomu węgla, na którym zlokalizowany jest niesparowany elektron jest wywołany przez coraz większe zawady przestrzenne oraz efekt hiperkoniugacji, czyli oddziaływanie pojedynczo obsadzonego orbitalu p z sąsiadującymi orbitalami molekularnymi wiązań sigma C-H.

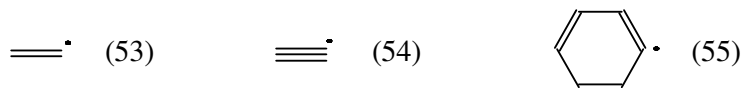
Słabymi wiązaniami chemicznymi są te, które są skoniugowane z grupami allilowymi lub benzyłowymi, stąd większa trwałość rodników (50) i (51) w porównaniu z rodnikami alkilowymi:



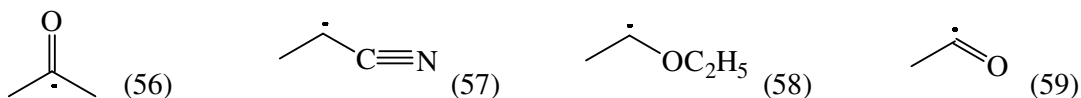
W rodnikach z wiązaniami nienasyconymi obserwuje się stabilizację spowodowaną efektem rezonansowym:



Natomiast rozkład homolityczny silnych wiązań C-H w alkenach, alkinach i arenach prowadzi do otrzymania mało stabilnych rodników np. winylowych (53), alkinowych (54), czy fenylowych (55):

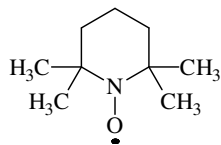


Obecność sąsiadujących grup funkcyjnych osłabia wiązanie C-H, co przyczynia się do stabilizacji tworzących się rodników (56-59):

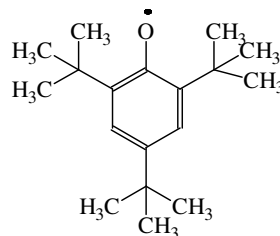


Również struktura przestrzenna ma duży wpływ na stabilność rodników. Związki organiczne zawierające duże podstawniki, stanowiące przeszkody steryczne, pozwalają na uzyskanie trwalszych, mniej reaktywnych rodników:

Projekt pn. „Wzmocnienie potencjału dydaktycznego UMK w Toruniu w dziedzinach matematyczno-przyrodniczych” realizowany w ramach Poddziałania 4.1.1 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki



(60)



(61)

Rodniki 2,2,6,6-tetrametylo-1-oksopiperdydy, oznaczane skrótem TEMPO (60) oraz ich pochodne, stabilizowane przez grupy metylowe (61), są stosowane w syntezie organicznej oraz kontrolowanej polimeryzacji rodnikowej.

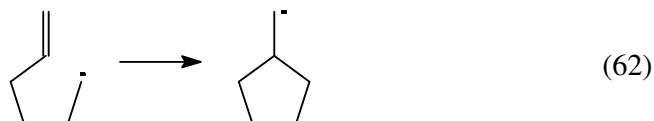
Rodniki nitroksylowe ( $R\text{-NO}^\bullet$ ) są też wykorzystywane jako znaczniki spinowe w spektroskopii EPR. Z efektem sterycznym mamy do czynienia w rodniku trifenylometanowym, powstającym w reakcji (3).

## 5. Przykłady reakcji z udziałem wolnych rodników

Reakcje rodnikowe są reakcjami łańcuchowymi, w których można wyróżnić etap inicjowania, propagacji (wzrostu łańcucha kinetycznego reakcji) i terminacji czyli zakończenia. Typowymi inicjatorami reakcji wolnorodnikowych są nadtlarki nieorganiczne i organiczne (np.  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $R\text{-OO-R}$ ), czy związki azowe (np. AIBN).

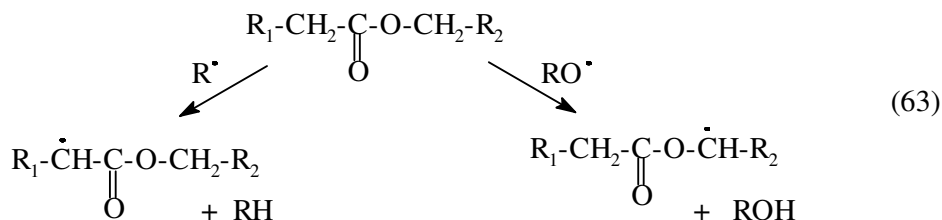
Wśród reakcji z udziałem wolnych rodników, które prowadzą do powstawania nowych centrów aktywnych należy wymienić reakcje addycji (23), fragmentacji, podstawienia i przegrupowania [1,5,7,12].

Szczególnym przypadkiem addycji jest wewnątrzcząsteczkowe przyłączenie do wiązań podwójnych, prowadzące do cyklizacji:



(62)

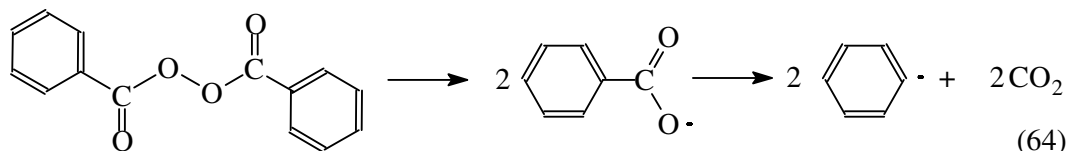
Podstawienie polega na oderwaniu atomu bądź grupy atomów z cząsteczki przez atakujący rodnik. Przebieg reakcji zależy od typu rodnika, co ilustruje poniższa reakcja estrów:



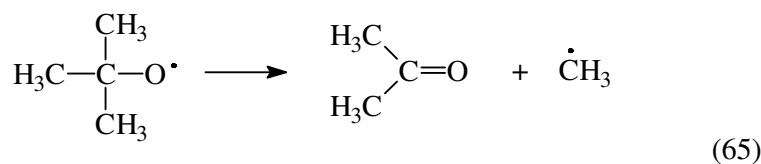
Elektrofilowy rodnik alkoksylowy ( $\text{RO}^\bullet$ ) odrywa atom wodoru z grupy alkilowej estru, natomiast nukleofilowy rodnik alkilowy ( $\text{R}^\bullet$ ) odrywa atom wodoru z grupy acylowej.

Projekt pn. „Wzmocnienie potencjału dydaktycznego UMK w Toruniu w dziedzinach matematyczno-przyrodniczych”  
realizowany w ramach Poddziałania 4.1.1 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki

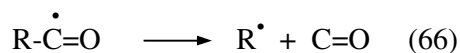
Niektóre rodniki ulegają fragmentacji z utworzeniem nowej nierodnikowej cząsteczki i innego rodnika. Z nadtlenu benzoilu powstają rodniki oksybenzoilowe, które następnie rozpadają się na rodniki fenyłowe i cząsteczki ditlenku węgla:



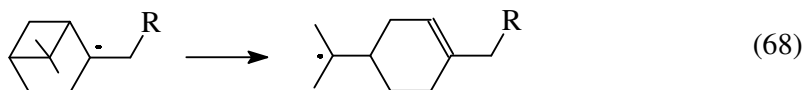
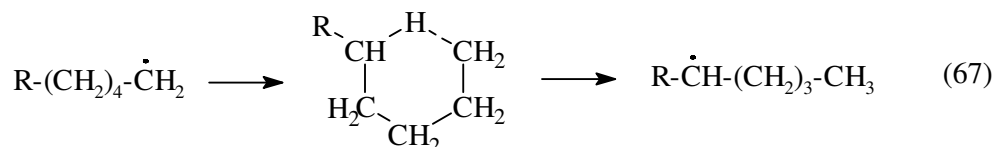
Trzeciorzędowy rodnik alkilowy może ulegać fragmentacji z oderwaniem rodnika metylowego:



Powyższe reakcje (64, 65) są zaliczane do typu  $\beta$ -pękania wiązania (sąsiedniego w stosunku centrum rodnikowego). Innym typem reakcji jest  $\alpha$ -pękanie wiązania zachodzące np. podczas rozpadu rodnika acylowego:



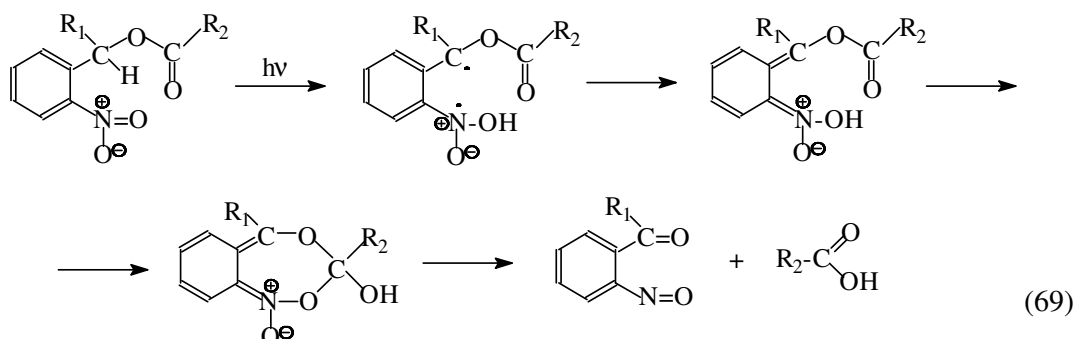
Znane są też reakcje przegrupowania prowadzące do izomeryzacji rodników. Są one efektem reakcji wewnątrzcząsteczkowych przebiegających często przez przejściowy stan cykliczny:



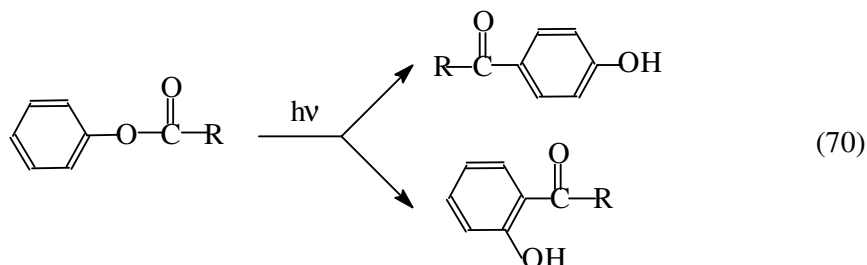
Reakcja fotochemicznego przegrupowania estru o-nitrobenzylowego prowadzi do powstania kwasu nitroniowego (*nitronic acid*) o stosunkowo długim czasie trwania, który dalej rozkłada się do kwasu karboksylowego i estru:



Projekt pn. „Wzmocnienie potencjału dydaktycznego UMK w Toruniu w dziedzinach matematyczno-przyrodniczych”  
realizowany w ramach Poddziałania 4.1.1 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki



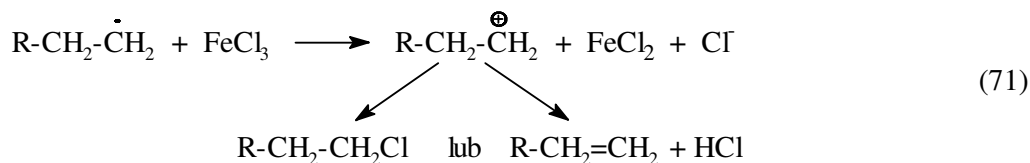
Innymi znanymi reakcjami przegrupowania są reakcje foto-Friesa, którym ulegają podstawione związki aromatyczne:



Reakcjami prowadzącymi do zaniku wolnych rodników, tj. utworzenia produktów diamagnetycznych, są reakcje rekombinacji (np. 16), dysproporcjonowania (17) lub przeniesienia pojedynczego elektronu. Terminację można wywołać stosując odpowiednie inhibitory (np. hydrochinon lub difenylamine), które łatwo reagują z rodnikami obecnymi w środowisku reakcji.

Większość nietrwałych rodników rekombinuje z bardzo dużą szybkością (stałe szybkości w fazie gazowej są rzędu  $10^9 \text{ mol}^{-1} \text{ l s}^{-1}$ ). W fazie ciekłej szybkość rekombinacji zależy od dyfuzji rodników. Dysproporcjonowanie jest procesem wolniejszym niż rekombinacja ale stałe szybkości tego procesu zależą od struktury rodników.

Rodniki mogą też ulegać reakcjom redoks z kationami metali d-elektronowych takich jak  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{Mn}^{3+}$ .



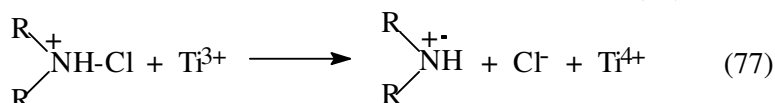
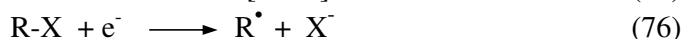
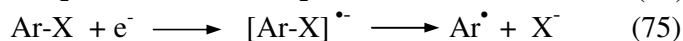
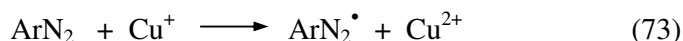
W powyższej reakcji zachodzi przeniesienie elektronu z rodnika alkilowego na jon żelaza(III), czego efektem jest powstanie karbokationu i chlorku żelaza(II). Stabilizacja karbokationu jest możliwa wskutek przyłączenia jonu chlorkowego lub oderwania protonu.

Kwasy karboksylowe w obecności soli metali na swoich wyższych stopniach utlenienia takich jak  $\text{Ce}^{4+}$ ,  $\text{Pb}^{4+}$ ,  $\text{Co}^{3+}$  ulegają rozkładowi utleniającemu:

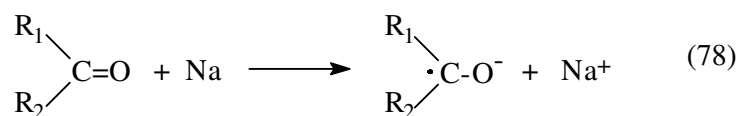
Projekt pn. „Wzmocnienie potencjału dydaktycznego UMK w Toruniu w dziedzinach matematyczno-przyrodniczych” realizowany w ramach Poddziałania 4.1.1 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki



Natomiast aromatyczne sole diazoniowe ( $\text{ArN}_2$ ), aromatyczne ( $\text{Ar-X}$ ) i alifatyczne ( $\text{R-X}$ ) chlorki czy chloroaminy ulegają redukcji:



Innym przykładem przeniesienia elektronu (tj. procesu redoks) jest reakcja sodu metalicznego z ketonem prowadząca do utworzenia jonorodnika ketylowego:

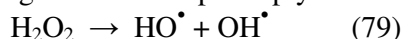


W literaturze opisano wiele reakcji wolnorodnikowych, którym ulegają zarówno związki nieorganiczne jak i organiczne [4-8]. Wybrane przykłady opisano poniżej.

## 6. Nadtlenek wodoru i rodniki hydroksylowe

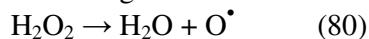
Nadtlenek wodoru w niewielkich stężeniach występuje w naturalnych zbiornikach wodnych oraz w opadach atmosferycznych [13-15].

$\text{H}_2\text{O}_2$  podobnie jak inne nadtlenki zawiera słabe wiązanie chemiczne O-O o energii ok. 213 kJ/mol, zatem łatwo ulega rozkładowi pod wpływem ciepła i światła.



W zależności od środowiska i obecności innych substancji w układzie mogą zachodzić wtórne reakcje wywołane przez rodniki hydroksylowe. Proces fotolizy  $\text{H}_2\text{O}_2$  przebiega stosunkowo wolno w rozcieńczonych roztworach wodnych, co można wytłumaczyć efektem klatkowym wywołanym obecnością dużej ilości cząsteczek rozpuszczalnika otaczających powstające rodniki, które szybko ulegają rekombinacji.

Silne właściwości utleniające stężonego roztworu (perhydrołu - 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) wynikają z jego rozkładu do wody i tlenu atomowego

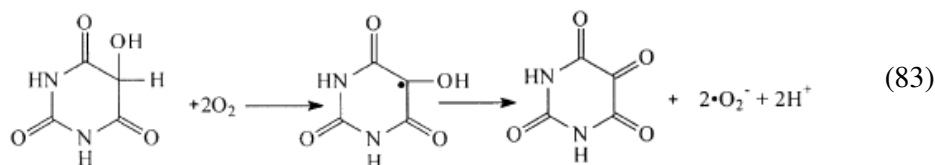
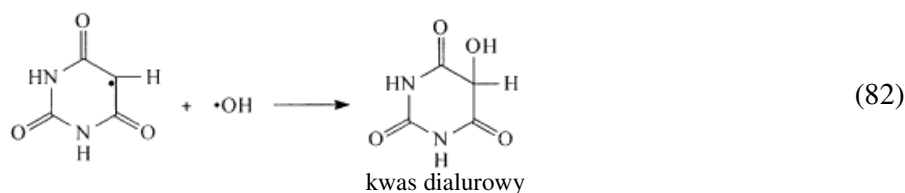
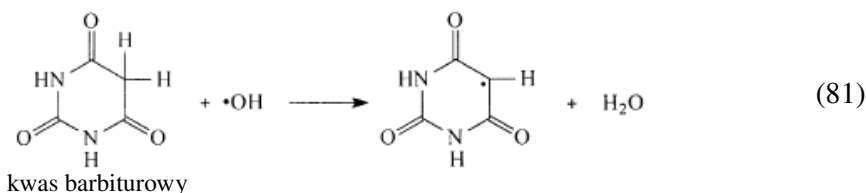


Rozkład nadtlenku wodoru katalizują metale (srebro, platyna), tlenek manganu(II) i jony jodkowe.

Rodniki hydroksylowe inicjują wiele reakcji w związkach organicznych, są też przyczyną niekorzystnych procesów w organizmach żywych (starzenie). Mogą być również wykorzystane do utylizacji odpadów lub przekształcania niebezpiecznych związków organicznych w mniej szkodliwe produkty.

Projekt pn. „Wzmocnienie potencjału dydaktycznego UMK w Toruniu w dziedzinach matematyczno-przyrodniczych” realizowany w ramach Poddziałania 4.1.1 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki

Przykładem wykorzystania rodników HO<sup>•</sup> jest reakcja z kwasem barbiturowym (malonylomocznik, nazwa systematyczna: pirymidyn-2,4,6-trion), w wyniku której powstaje alloksan (ang. *1,3-diazinane-2,4,5,6-tetrone*) znajdujący zastosowanie w badaniach biomedycznych (badanie cukrzycy) [16]. W pierwszym etapie reakcji, rodnik HO<sup>•</sup> odrywa atom wodoru z kwasu barbiturowego (81), następnie HO<sup>•</sup> ulega przyłączeniu do pierścienia heterocyklicznego (82). Powstający kwas dialurowy ulega utlenieniu tlenem z powietrza dając w produktach alloksan i rodnik ponadtlenkowy (83). Obecność powstających w tej reakcji rodników potwierdzono metodą spektroskopii EPR.

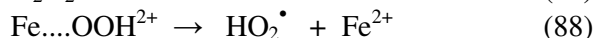
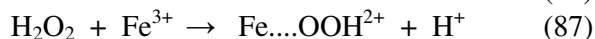
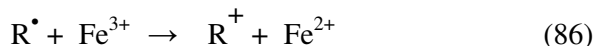


## 7. Reakcje Fentona

Reakcje z udziałem odczynnika Fentona, czyli reaktywnej mieszaniny jonów żelaza(II) z nadtlenkiem wodoru, polegają na efektywnym utlenianiu związków organicznych. Jest to spowodowane reakcjami rodnika hydroksylowego powstającego podczas utleniania jonów żelaza(II) do jonów żelaza(III). Oprócz rodnika HO<sup>•</sup> w tej reakcji powstaje też jon wodorotlenowy:



Potencjał utleniający rodnika hydroksylowego jest wysoki (2,7mV), stąd jego efektywne działanie utleniające i szereg reakcji łańcuchowych:



Projekt pn. „Wzmocnienie potencjału dydaktycznego UMK w Toruniu w dziedzinach matematyczno-przyrodniczych” realizowany w ramach Poddziałania 4.1.1 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki



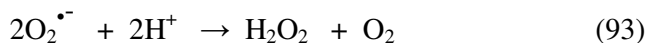
O wydajności reakcji Fentona decydują zarówno stężenia reagentów i temperatura ale też obecność innych substancji o właściwościach utleniająco-redukujących.

Analogiczne reakcje, różniące się szybkością, zachodzą między związkami żelaza(II) i wodoronadtlenkami organicznymi ROOH, które powstają m. in. w reakcji (90). Podobne złożone reakcje redoks nadtlenu (rodnikowo-jonowe) zachodzą z jonami innych metali przejściowych na niższych stopniach utlenienia (np.  $Cu^+$ ,  $Ti^{3+}$ ,  $Cr^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ), które występują w roztworach wodnych w formie skompleksowanej:



gdzie L oznacza ligand.

Należy dodać, że nadtlenek wodoru powstaje w przyrodzie w katalitycznych reakcjach z tlenem atmosferycznym (92-94), stąd rodniki nadtlenkowe odgrywają dużą rolę w procesach biologicznych. Produktem pośrednim jest anionorodnik ponadtlenkowy ( $O_2^{\bullet-}$ )



Odczynnik Fentona stosowany jest w chemii organicznej np. w reakcji utleniania alkoholi lub rodnikowej substytucji związków aromatycznych (przykładem jest reakcja otrzymania fenolu z benzenu) [17, 18].



Podczas reakcji odczynnika Fentona ze związkami organicznymi wydzielają się znaczne ilości ciepła.

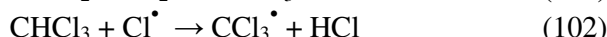
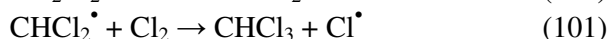
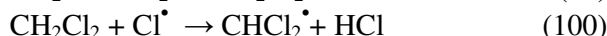
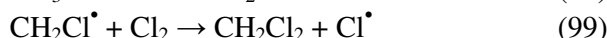
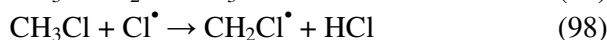
Reakcje utleniania odczynnikiem Fentona wykorzystywane są w technologiach oczyszczania ścieków przemysłowych, unieszkodliwiania pestycydów, destabilizacji zużytych emulsji olejowych, usuwania substancji humusowych z wody, a także jako środek dezynfekujący w zastosowaniach medycznych. Możliwy jest rozkład substancji odpornych na biodegradację, toksycznych, rakotwórczych, które są trudne do usunięcia tradycyjnymi metodami. Odczynnik Fentona jest też proponowany jako środek przyspieszający fotodegradację odpadów polimerowych.

## 8. Halogenowanie węglowodorów

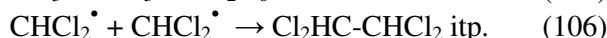
Halogenowanie np. chlorowanie węglowodorów alifatycznych jest metodą otrzymania ich chlorowcopochodnych. Reakcja może być inicjowana termicznie lub fotochemicznie i jest procesem łańcuchowym. W pierwszym etapie zachodzi homolityczny rozkład cząsteczki chloru na dwa rodnikowe atomy (reakcja inicjowania, 26), które następnie

Projekt pn. „Wzmocnienie potencjału dydaktycznego UMK w Toruniu w dziedzinach matematyczno-przyrodniczych”  
 realizowany w ramach Poddziałania 4.1.1 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki

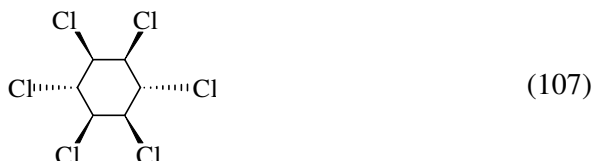
reagują z węglowodorem (np. metanem, reakcja 96), a powstające rodniki inicjują kolejne reakcje prowadzące do nowych rodników (etap propagacji, reakcje 96-103)



Efektem fotochemicznego chlorowania są pochodne metanu o różnej ilości atomów chloru w cząsteczkach. Zakończenie tego kinetycznego łańcucha reakcji jest spowodowane reakcjami rekombinacji dowolnych rodników, co prowadzi do otrzymywania alkanów i chloropochodnych alkanów (104-106).



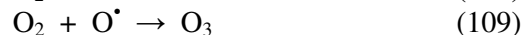
Podobne reakcje chlorowania zachodzą w związkach alicyklicznych (również z jodem). Natomiast reakcja fotochemicznego chlorowania benzenu prowadzi do powstania heksachlorocykloheksanu, produktu addycji atomów chloru do pierścienia aromatycznego (107).



## 9. Reakcje w atmosferze

Promieniowanie słoneczne inicjuje rodnikowe reakcje chemiczne gazowych składników atmosfery [19,20]. Skład atmosfery i energia promieniowania w różnych warstwach atmosfery zmienia się, a więc zmieniają się też produkty reakcji fotolizy gazów i ich stężenia.

W stratosferze pod wpływem wysokoenergetycznego promieniowania UVC (100-280 nm) z tlenu powstaje ozon:

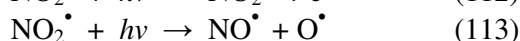
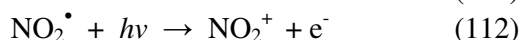
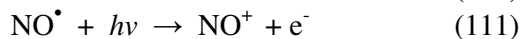
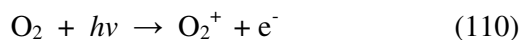


W skład górnych warstw atmosfery, oprócz tlenu i ozonu wchodzi  $\text{CO}_2$ ,  $\text{CO}$ ,  $\text{H}_2$ ,  $\text{NO}_x$ ,  $\text{SO}_2$ , węglowodory lekkie i ich pochodne. W troposferze znajdują się ponadto związki pochodzenia biologicznego (np.  $\text{CH}_4$ ,  $\text{CS}_2$ ,  $\text{H}_2\text{S}$ ,  $\text{HCl}$ ) oraz zanieczyszczenia wynikające z działalności człowieka. Mogą one ulegać fotolizie lub fotojonizacji dając różnorodne produkty,

Projekt pn. „Wzmocnienie potencjału dydaktycznego UMK w Toruniu w dziedzinach matematyczno-przyrodniczych”  
realizowany w ramach Poddziałania 4.1.1 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki

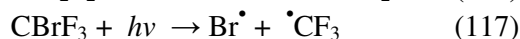
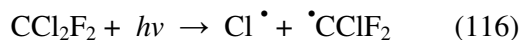
stanowiące reaktywne zanieczyszczenia atmosfery ziemskiej. Energia jonizacji cząsteczek jest na ogół wyższa od energii homolitycznej dysocjacji wiązań chemicznych.

Najważniejsze reakcje tego typu przedstawiają równania (110-115), z których 3 ostatnie prowadzą do powstania atomów rodnikowych:

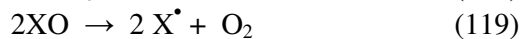
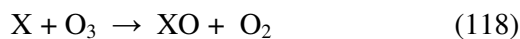


Zarówno rodnikowe atomy, jonorodniki i atomy, bądź cząsteczki wzbudzone w wyniku absorpcji fotonu reagują z innymi składnikami atmosfery. Reakcje opisujące powstawanie i rozkład ozonu w atmosferze nazywane są cyklem Chapmana.

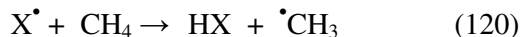
Ozon absorbuje promieniowanie ultrafioletowe i stanowi naturalną warstwę ochronną dla życia na Ziemi. Jego stężenie w atmosferze jest zmienne – zależy od położenia geograficznego, strefy klimatycznej i wprowadzonych przez człowieka zanieczyszczeń. Nadmierny rozkład ozonu prowadzi do naruszenia równowagi w ekosystemie. Za rozkład ozonu odpowiedzialne są halogenowęglowodory (freony), stosowane dawniej jako ciecze chłodnicze lub gazy w aerozolach. Są one bardzo trwałe w warunkach ziemskich, jednak po przedostaniu się do górnych warstw atmosfery ulegają fotolizie pod wpływem promieniowania UV o dużej energii ( $\lambda \leq 220\text{nm}$ ). Najszybciej pęka wiązanie C-Cl lub C-Br:



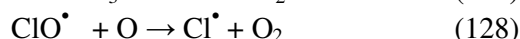
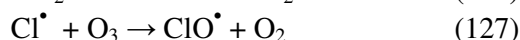
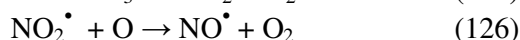
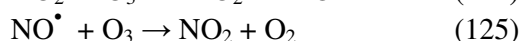
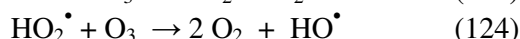
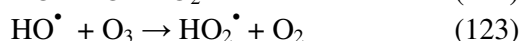
Atom chlorowca (X) atakuje ozon, przyczyniając się do destrukcji warstwy ozonowej:



Reakcje mają charakter łańcuchowy i biegają tak długo aż atom X ulegnie dezaktywacji np. w reakcji z metanem:



Inne reakcje zachodzące w atmosferze ilustrują równania (121-128):



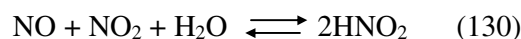
Projekt pn. „Wzmocnienie potencjału dydaktycznego UMK w Toruniu w dziedzinach matematyczno-przyrodniczych” realizowany w ramach Poddziałania 4.1.1 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki

Rodniki hydroksylowe również odgrywają dużą rolę w procesach zachodzących w przyrodzie. Szybkość ich powstawania zależy głównie od stężenia ozonu i wody oraz ciśnienia atmosferycznego. Nawet jeżeli stężenie produktów w ww. procesach jest niewielkie, mają one duży wpływ na procesy wtórne z innymi składnikami atmosfery.

Źródłem rodników hydroksylowych powstających w reakcji z parą wodną mogą być atomy tlenu w stanie wzbudzonym ( $O^*$ ):



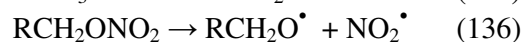
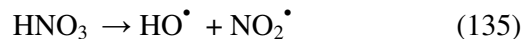
W obecności wody, tlenki azotu (II) i (IV) znajdują się w równowadze z powstającym kwasem azotowym (III), który absorbuje promieniowanie o długościach 310-400 nm i ulega fotolizie:



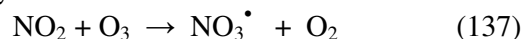
Podobnym zakresem absorpcji charakteryzują się estry kwasu azotowego (III), które rozkładają się na rodniki alkoksylowe i monotlenek azotu:



Gazowy  $HNO_3$  i azotany (V) absorbują promieniowanie o długości fal  $< 310$  nm, które wywołuje ich rozpad:



Z kolei reakcja tlenku azotu (IV) z ozonem prowadzi do powstania rodnika  $NO_3^\bullet$  o stosunkowo długim czasie życia:

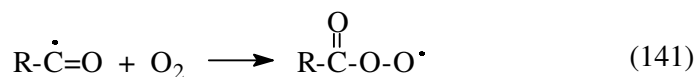
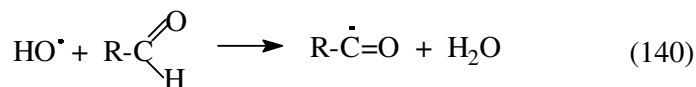


$NO_3^\bullet$  tworzy się też w reakcji dysproporcjonowania pentatlenku diazotu:

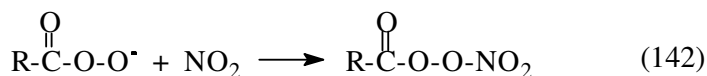


Rodniki  $NO_3^\bullet$  absorbują promieniowanie widzialne (570-670 nm), pod wpływem którego rozkładają się bezpośrednio głównie na  $NO_2$  i  $O$  (częściowo powstaje też  $NO$  i  $O_2$ ). Rodniki  $NO_3^\bullet$  biorą udział w procesach atmosferycznego utleniania aldehydów, alkanów, węglowodorów aromatycznych, a także w analogicznych procesach w hydrosferze.

Wolne rodniki z atmosfery uczestniczą w reakcjach z zanieczyszczeniami tworzącymi smog. W dużych miastach lub w obszarach przemysłowych atmosfera zawiera lotne produkty spalania bogate w węglowodory i ich pochodne, które są mało aktywne, zatem akumulują się w środowisku. Ulegają one jednak reakcjom utleniania w obecności tlenków azotu i rodników  $HO^\bullet$ .



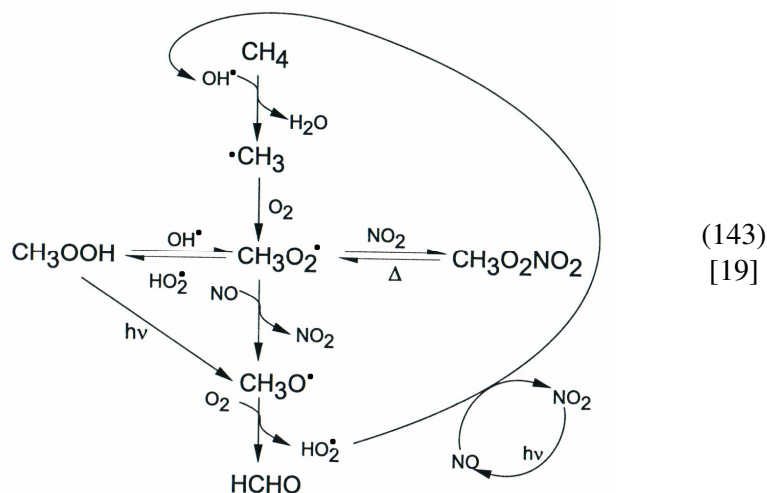
Projekt pn. „Wzmocnienie potencjału dydaktycznego UMK w Toruniu w dziedzinach matematyczno-przyrodniczych” realizowany w ramach Poddziałania 4.1.1 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki



Gdy R jest podstawnikiem metylowym, w reakcji 142 powstaje azotan peroksyacetalowy, produkt znaleziony w smogu.

Ilości metanu występującego w troposferze są znaczące, stąd produkty jego utleniania mogą wywierać istotny wpływ na otoczenie. Poniższy schemat (143) ilustruje mechanizm fotochemicznego utleniania metanu w obecności tlenków azotu, inicjowany rodnikami hydroksylowymi [19].

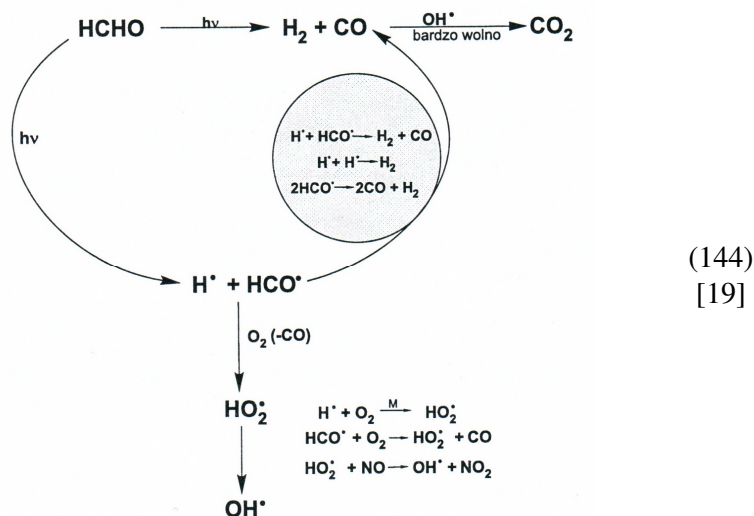
Głównym produktem tego cyklu reakcji jest aldehyd mrówkowy (metanal). Tlenki azotu pełnią rolę fotokatalizatora. Rozkład cięższych węglowodorów i ich pochodnych przebiega ze znacznie większą szybkością niż przedstawione tu utlenianie metanu.



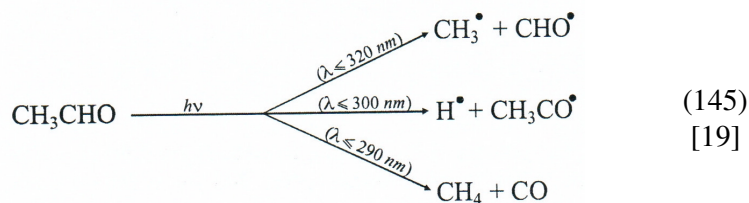
Rozkład aldehydów (oprócz reakcji 140) może zachodzić bezpośrednio pod wpływem promieniowania z zakresu bliskiego nadfioletu. Mechanizm reakcji na przykładzie aldehydu mrówkowego przedstawia schemat (144).



Projekt pn. „Wzmocnienie potencjału dydaktycznego UMK w Toruniu w dziedzinach matematyczno-przyrodniczych”  
realizowany w ramach Poddziałania 4.1.1 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki



Rozkład aldehydu octowego (etanal) zależy od energii promieniowania elektromagnetycznego (145). Pod wpływem promieniowania o długości fali z zakresu 290-320 nm powstają głównie rodniki różnego typu; bezpośredni rozkład do tlenku węgla i metanu wymaga promieniowania krótkofalowego ( $\lambda \leq 290\text{nm}$ ).

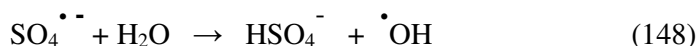
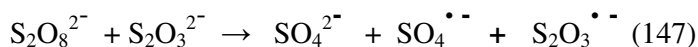


## 10. Reakcje polimeryzacji

Jedną z ważnych dziedzin przemysłowych, w których wykorzystuje się wolne rodniki jest synteza polimerów służących do otrzymywania powszechnie stosowanych na wielką skalę tworzyw sztucznych. Polimeryzacja addycyjna, podczas której substrat, czyli monomer, ulega wielokrotnej reakcji przyłączania, może wprawdzie przebiegać nie tylko według mechanizmu rodnikowego ale i jonowego, jednak ten pierwszy sposób jest najczęściej stosowany w praktyce.

Polimeryzacja rodnikowa jest typową reakcją łańcuchową składającą się z etapu inicjowania, propagacji (wzrostu) i terminacji (zakończenia) [12, 21]. Monomerami są nienasycone związki organiczne (np. etylen, styren, chlorek winylu, metakrylan metylu, butadien), a inicjatorami – nietrwałe nadtlenuki organiczne, alifatyczne związki azowe, nadsiarczan amonu lub potasu, a także nadtlenek wodoru. Do inicjowania stosuje się też układy redoks: odczynnik Fentona, czy nadsiarczan (146) lub mieszaninę nadsiarczanu z tiosiarczanem (147):

Projekt pn. „Wzmocnienie potencjału dydaktycznego UMK w Toruniu w dziedzinach matematyczno-przyrodniczych”  
 realizowany w ramach Poddziałania 4.1.1 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki



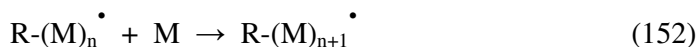
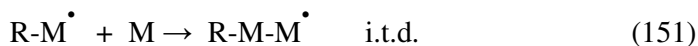
Rozpad inicjatora (I) na rodniki ( $\text{R}^\bullet$ ) zachodzi najczęściej pod wpływem ciepła (inicjowanie termiczne) lub pod wpływem promieniowania elektromagnetycznego (inicjowanie fotochemiczne).



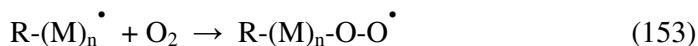
Po określonym okresie indukcji,  $\text{R}^\bullet$  przyłącza się do wiązania podwójnego monomeru (M) tworząc następne centrum rodnikowe:



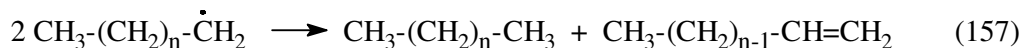
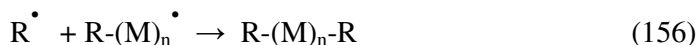
Propagacja, czyli wzrost kinetycznego łańcucha polimeryzacji, jest to przyłączanie kolejnych cząsteczek monomeru do rosnącego makrorodnika, co prowadzi do powstania makrocząsteczek o bardzo dużych masach cząsteczkowych:



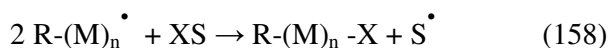
Reakcję polimeryzacji hamuje tlen atmosferyczny, który reaguje zarówno z rodnikami inicjującymi jak i makrorodnikami.



Terminacja jest procesem prostej rekombinacji dowolnych rodników (154-156) lub dysproporcjonowania makrorodników (157):



Możliwa jest też reakcja zakończenia polimeryzacji rodnikowej wskutek przeniesienia łańcucha kinetycznego na cząsteczkę inną niż monomer, np. rozpuszczalnik (XS):



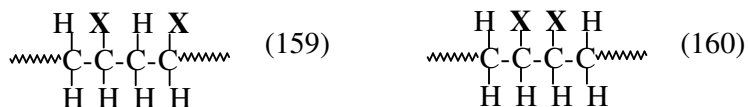
Wszystkie trzy reakcje: inicjowanie, propagacja i terminacja przebiegają z różną szybkością. Przyjmuje się, że w większości procesów polimeryzacji rodnikowej, szybkości

Projekt pn. „Wzmocnienie potencjału dydaktycznego UMK w Toruniu w dziedzinach matematyczno-przyrodniczych”  
realizowany w ramach Poddziałania 4.1.1 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki

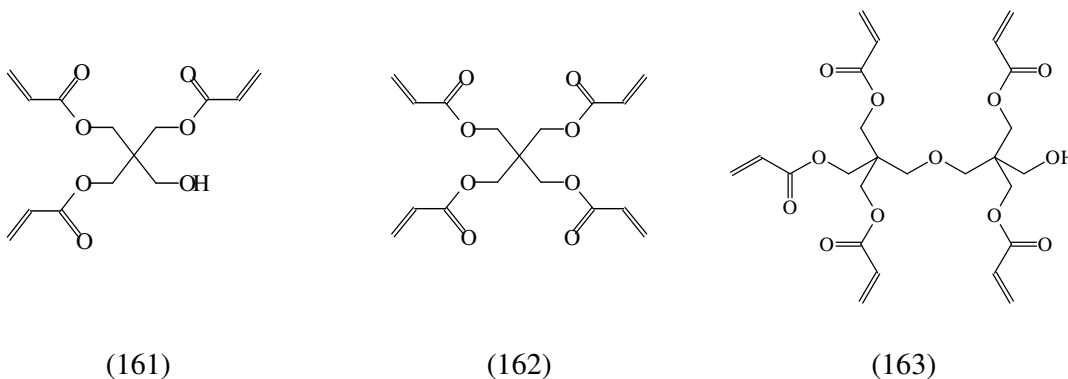
inicjowania i terminacji są równe, stąd stężenie rosnących rodników  $R-(M)_n^\bullet$  jest stałe. Jest to tzw. założenie stanu stacjonarnego. Jednak w niektórych przypadkach obserwuje się efekt autokatalityczny polegający na znacznym zmniejszeniu szybkości zakończenia z powodu wzrostu lepkości układu. W rezultacie powoduje to przyspieszenie polimeryzacji. W roztworach o dużej lepkości makrorodniki mają ograniczoną ruchliwość, stąd trudniej rekombinują, podczas gdy małe cząsteczki monomeru są wciąż mobilne i reaktywne.

Ze względu na tworzenie się podczas polimeryzacji makrocząsteczek o różnych długościach, opisując polimer stosujemy średnie ciężary cząsteczkowe (np. wagowo lub liczbowo średnie:  $\overline{M}_w, \overline{M}_n$ ) lub średnie stopnie polimeryzacji (DP). Polimer otrzymany w polimeryzacji rodnikowej charakteryzuje się rozrzutem mas cząsteczkowych, czyli polidispersją definiowaną najczęściej jako  $\overline{M}_w / \overline{M}_n$ .

Polimer przeważnie ma strukturę *głowa do ogona* (159), która jest uprzywilejowana ze względu na możliwość rezonansu niesparowanego elektronu rosnącego rodnika z podstawnikiem X oraz z powodów sterycznych. Nieco rzadziej powstaje konfiguracja *głowa do głowy* (160), stanowiąca defekt strukturalny.



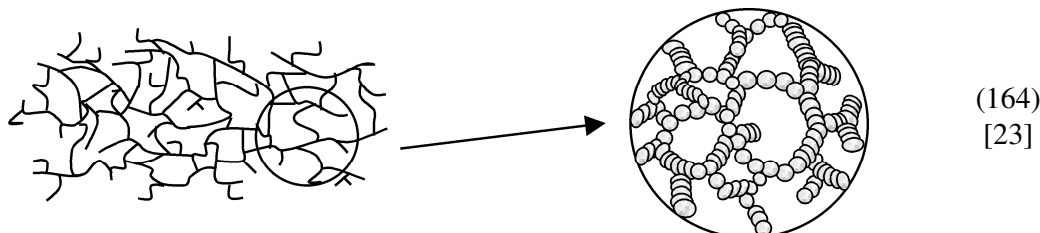
Budowa polimeru zależy od ilości grup funkcyjnych tj. wiązań podwójnych w cząsteczce monomeru. Jedno wiązanie podwójne w monomerze prowadzi do powstawania liniowych cząsteczek polimeru, chociaż reakcje przeniesienia łańcucha mogą być przyczyną powstawania rozgałęzień. Polimeryzacja monomerów wielofunkcyjnych pozwala na uzyskanie polimeru o bardzo dużym stopniu usieciowania, którego właściwości są odmienne od polimeru liniowego. Przykłady wielofunkcyjnych monomerów akrylanowych przedstawiają struktury 161-163 [22].



Polimer usieciowany tworzy trójwymiarową sieć (164), wskutek czego staje się nierozpuszczalny w typowych rozpuszczalnikach. Zachowuje jednak zdolność do pęcznienia

Projekt pn. „Wzmocnienie potencjału dydaktycznego UMK w Toruniu w dziedzinach matematyczno-przyrodniczych”  
realizowany w ramach Poddziałania 4.1.1 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki

dzięki znacznej objętości swobodnej. Wskutek sieciowania na ogół wzrasta jego wytrzymałość mechaniczna i chemiczna, wadą jest jednak kruchość.



Polimeryzację rodnikową można prowadzić w masie (tj. bez udziału rozpuszczalnika), w roztworze lub emulsji, co szczegółowo opisują podręczniki do chemii polimerów [12,21].

Szczególnym rodzajem polimeryzacji rodnikowej jest proces inicjowany fotochemicznie lub radiacyjnie.

Fotoinicjowana polimeryzacja (fotopolimeryzacja) jest procesem bardzo szybkim, zachodzi w temperaturze pokojowej i nie wymaga użycia rozpuszczalników organicznych szkodliwych dla zdrowia i środowiska [24,25]. Fotopolimeryzacja jest stosowana do otrzymywania powłok ochronnych (utwardzania lakierów), produkcji elementów elektronicznych (fotorezysty), w dentystyce (plomby światłoutwardzalne), w medycynie (chirurgia).

Wykorzystanie takich procesów w praktyce wymaga właściwego doboru fotoinicjatora oraz odpowiedniego źródła promieniowania. Fotoinicjatory możemy podzielić na [26]:

- $\alpha$ -dysocjujące (ang.  *$\alpha$ -cleavage*) – np. benzoina i jej pochodne, ketony aromatyczne, aminoketony, ketosulfidy;
- $\beta$ -dysocjujące ( *$\beta$ -cleavage*) – ketosulfony, chlorowcopochodne acetofenonu (np. trichloro-(4-*tert*-butylo)acetofenon);
- inne, posiadające w cząsteczce słabe wiązania typu C-S, O-O, S-S (np. aromatyczne nadtlenki i nadestry, organiczne sulfoazozwiązki), związki metaloorganiczne (tytanoceny);

Osobną grupę stanowią inicjatory polimerowe. Są to inicjatory, w których grupa światłoczuła jest przyłączona do łańcucha polimeru. W zależności od budowy grupy promienioczułej, wolne rodniki powstają bądź to w wyniku dysocjacji homolitycznej, bądź w wyniku przeniesienia atomu wodoru.

Istnieje możliwość stosowania złożonych (dwu- lub trójskładnikowych) układów inicjujących, w skład których wchodzi substancje absorbujące promieniowanie (często są to barwniki polimetionowe) oraz koinicjatory [27]. Zaletą takich układów jest absorpcja promieniowania z zakresu widzialnego (o mniejszej energii niż UV), a zatem bardziej bezpiecznego dla człowieka.

Radiacyjna polimeryzacja pozwala na otrzymanie żeli o dużym stopniu usieciowania, które znajdują wielorakie zastosowania. Polimer po przekroczeniu dawki żelowania tworzy sieć przestrzenną. Żel powstaje jeżeli średnio jedno wiązanie poprzeczne przypada na makrocząsteczkę.

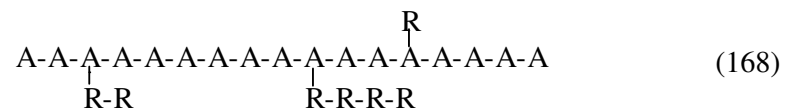
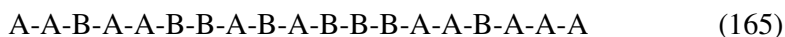
Projekt pn. „Wzmocnienie potencjału dydaktycznego UMK w Toruniu w dziedzinach matematyczno-przyrodniczych”  
realizowany w ramach Poddziałania 4.1.1 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki

Przykładem zastosowania takich sieci polimerowych otrzymywanych metodą radiacyjną mogą być hydrożele na bazie poli(kwasu akrylowego), poli(alkoholu winylu), poliwinylpirolidonu, poli(glikolu etylenowego) lub ich mieszanin z polimerami pochodzenia naturalnego (agar, pektyna, celuloza, skrobia, chityna). Hydrożele otrzymane z wymienionych polimerów, dzięki dużej przepuszczalności pary wodnej, stanowią nową generację opatrunków na trudnogojące się rany. Radiacyjnie usieciowane polimery są materiałem do produkcji soczewek kontaktowych, czy implantów zastępujących naturalne organy, ponadto są też stosowane jako matryce do kontrolowanego uwalniania leków. Dodatkowo możliwość radiacyjnego otrzymywania nanocząstek metali (np. srebra) w matrycach (żelach) polimerowych nadaje im właściwości bakteriobójcze.

Zaletami technik radiacyjnych jest możliwość przeprowadzenia reakcji niezależnie od temperatury (nawet w temperaturach poniżej 0°C), brak konieczności stosowania rozpuszczalników organicznych i innych substancji (katalizatorów, stabilizatorów) zanieczyszczających produkt końcowy, równoczesna sterylizacja.

Twórcą nowoczesnej technologii produkcji hydrożelowych opatrunków z wykorzystaniem promieniowania wysokoenergetycznego jest prof. Janusz Rosiak z Instytutu Techniki Radiacyjnej Politechniki Łódzkiej [28,29].

W przypadku użycia do procesu polimeryzacji dwóch (np. A i B) lub trzech różnych monomerów otrzymuje się kopolimery lub terpolimery. Do najważniejszych typów kopolimerów otrzymywanych w procesach rodnikowych można zaliczyć kopolimery statystyczne o przypadkowej budowie (165) oraz bardziej uporządkowane: naprzemienne (166) i blokowe - zbudowane z długich odcinków jednego typu merów (167). Jeszcze inny typ stanowią kopolimery szczepione (168), w których łańcuch główny zbudowany jest z jednego typu merów (A), a łańcuchy boczne zawierają drugi typ merów (168).



Szczepienie jest metodą modyfikacji powierzchni polimerów. Dzięki zaszczepieniu komonomeru zawierającego grupy polarne na polimerze hydrofobowym można zwiększyć jego hydrofilowość i poprawić właściwości adhezyjne, czy zdolność do drukowania. Z kolei szczepienie cząsteczkami o dużej hydrofobowości pozwala na otrzymanie tworzyw sztucznych (np. włókien, syntetycznego szkła) odpornych na brud, „samoczyszczących się”.

Mechanizm kopolimeryzacji jest analogiczny do mechanizmu homopolimeryzacji. Na przebieg procesu wpływ ma reaktywność rosnących macrorodników, o której decyduje głównie ostatni i przedostatni mer. Struktura kopolimerów, determinująca ich właściwości, zależy od wielu czynników takich jak: warunki procesu, budowa chemiczna i stosunek

Projekt pn. „Wzmocnienie potencjału dydaktycznego UMK w Toruniu w dziedzinach matematyczno-przyrodniczych” realizowany w ramach Poddziałania 4.1.1 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki

molowy ko-monomerów oraz ich współczynniki reaktywności  $r_A$ ,  $r_B$ , które są odpowiednio zdefiniowane jako:

$$r_A = \frac{k_{AA}}{k_{AB}} \quad (169) \qquad r_B = \frac{k_{BB}}{k_{BA}} \quad (170)$$

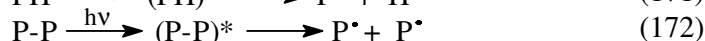
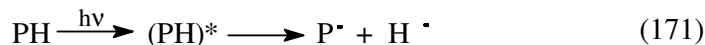
gdzie  $r_A$  - stosunek stałej szybkości rodnika A z monomerem A do stałej szybkości rodnika A z monomerem B;  $r_b$  - stosunek stałej szybkości rodnika B z monomerem B do stałej szybkości rodnika B z monomerem A.

Możemy rozważyć kilka typowych przypadków kopolimeryzacji:

- Jeżeli  $r_A \cdot r_B = 1$  skład powstającego kopolimeru jest proporcjonalny do wyjściowego składu monomerów;
- Jeżeli  $r_A = r_B = 0$ , powstają kopolimery naprzemienne;
- Jeżeli  $r_A < 1$  i  $r_B < 1$  łatwo otrzymujemy kopolimer, który nie zawiera dłuższych segmentów jednego monomeru;
- Jeżeli  $r_A > 1$  i  $r_B > 1$  otrzymuje się mieszaninę homopolimerów;
- Jeżeli  $r_A > 1$  i  $r_B < 1$  kopolimer będzie wzbogacony w mery typu A.

## 11. Reakcje degradacji polimerów

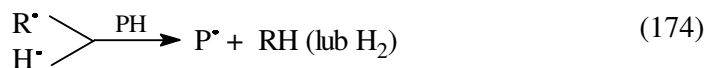
Degradacja polimerów może być wywołana działaniem ciepła (wysokiej lub zmiennej temperatury), promieniowania elektromagnetycznego, mikroorganizmów, czynników chemicznych, atmosferycznych lub mechanicznych. W przypadku degradacji inicjowanej promieniowaniem nadfioletowym mówimy o fotodegradacji, a w obecności tlenu – o fotodegradacji utleniającej [24,30,31]. Procesy degradacyjne polimerów najczęściej przebiegają wg mechanizmu rodnikowego. Warunkiem reakcji fotochemicznej jest absorpcja kwantu promieniowania i wzbudzenie cząsteczki polimeru.



gdzie PH i P-P oznaczają cząsteczki polimeru, a \* stan wzbudzony.

Makrocząsteczka wzbudzona może znajdować się w stanie singletowym lub trypletowym, a reakcje wtórne zachodzą z obu tych stanów.

Nawet jeżeli polimer nie posiada w swojej strukturze grup chromoforowych (np. polietylen), to i tak ulega powolnej fotodegradacji (fotostarzeniu) wskutek obecności absorbujących zanieczyszczeń, RH, (pozostałości katalizatorów lub innych substancji z procesu polimeryzacji), a także defektów strukturalnych, do których można zaliczyć struktury *głowa-do głowy*, grupy karbonylowe czy nadtlenkowe.



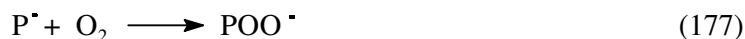
W obecności sensybilizatorów (S) możliwy jest proces przeniesienia energii wzbudzenia:



30

Projekt pn. „Wzmocnienie potencjału dydaktycznego UMK w Toruniu w dziedzinach matematyczno-przyrodniczych”  
realizowany w ramach Poddziałania 4.1.1 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki

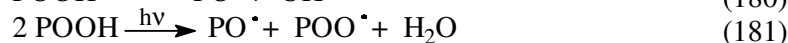
Najważniejsze reakcje zachodzące podczas propagacji to reakcje makrorodników ( $P^\bullet$ ) z tlenem atmosferycznym oraz z nowymi makrocząsteczkami  $P_1H$ :



Makrorodnik nadtlenkowy ( $POO^\bullet$ ) może reagować z tą samą lub inną cząsteczką polimeru odrywając od niej atom wodoru:



Grupy wodoronadtlenkowe powstające w tej reakcji charakteryzują się małą fotostabilnością i pod wpływem następných kwantów promieniowania szybko ulegają fotolizie:



Głównymi reakcjami zachodzącymi podczas działania promieniowania UV na polimery i tworzywa sztuczne jest pękanie łańcucha głównego, depolimeryzacja, odrywanie atomów wodoru i grup bocznych, tworzenie wiązań nienasyconych, grup funkcyjnych zawierających atomy tlenu (grupy karbonylowe różnego typu), powstawanie rozgałęzień bocznych i poprzecznych wiązań sieciujących.

Te reakcje powodują zmianę właściwości fizykochemicznych i użytkowych polimerów. Przypadkowe pękanie łańcucha głównego powoduje zmniejszanie średnich ciężarów cząsteczkowych polimeru. Depolimeryzacja zachodząca na końcach łańcucha ma nieznaczny wpływ na ciężar cząsteczkowy, a zatem i na właściwości mechaniczne, lecz wydzielanie i kumulowanie monomeru może być bardzo niekorzystne ze względu na jego toksyczność czy rakotwórczość (jak w przypadku styrenu, czy chlorku winylu).

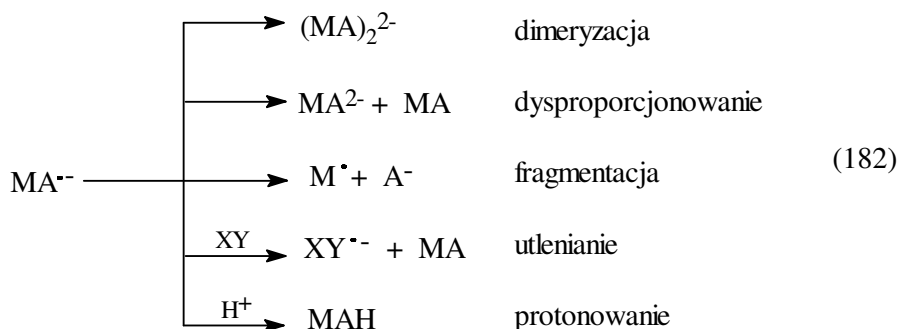
Reakcje degradacji wolnorodnikowej polimerów komplikują się w przypadku złożonych układów (polimerów modyfikowanych, mieszanin czy kompozytów polimerowych). W układach niemieszalnych, charakteryzujących się występowaniem odrębnych domen, procesy pierwotne prowadzące do powstania rodników zachodzą w obu polimerach ale możliwe są wzajemne oddziaływania między produktami reakcji (zarówno rodnikowymi jak i nierodnikowymi) na granicy faz. Poza tym małe aktywne rodniki są zdolne do dyfuzji w fazie drugiego polimeru. Powodzi to do powstania bardzo złożonej mieszaniny produktów fotodegradacji.

Fotodegradacja polimerów jest zjawiskiem pożądanym w przypadku produkcji degradowalnych tworzyw jednorazowego użytku, które po zużyciu rozkładają się samorzutnie pod wpływem światła słonecznego. W celu nadania polimerom degradowalności lub przyspieszenia ich powolnego procesu fotostarzenia stosuje się promotory degradacji – substancje uaktywniające się w określonych warunkach (np. na wysypiskach śmieci). Zwykle fotodegradację łączy się z biodegradacją, co wymaga odpowiedniej modyfikacji struktury makrocząsteczek.

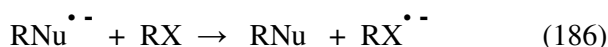
Projekt pn. „Wzmocnienie potencjału dydaktycznego UMK w Toruniu w dziedzinach matematyczno-przyrodniczych” realizowany w ramach Poddziałania 4.1.1 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki

## 12. Reakcje jonorodników

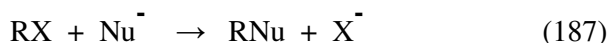
**Anionorodniki** powstają w wyniku aktywacji termicznej lub fotochemicznej w obecności donorów elektronów np. metali alkalicznych, czy solwatowanych elektronów. Reakcje anionorodników są zestawione na poniższym schemacie [7]:



Charakterystyczną reakcją anionorodników jest też podstawienie nukleofilowe rodników, które przez analogię do  $S_N1$ , oznacza się  $S_{RN}1$ . Oznaczenie to zostało zaproponowane przez Kornbluma w 1966 r dla związków alifatycznych, a w 1970 r. przez Bunnetta dla związków aromatycznych. Jest to reakcja łańcuchowa złożona z etapu inicjowania - powstania anionorodnika (183), który następnie rozkłada się na anion i rodnik  $R^{\cdot}$  (184) ulegający podstawieniu nukleofilowemu (185). W końcowym etapie zachodzi przeniesienie elektronu (186), a w produktach powstaje związek z podstawionym Nu (w miejscu X). Rozpuszczalniki o charakterze kwaśnym i wodoro-donorowe hamują  $S_{RN}1$ .



Sumarycznie proces ten przedstawia reakcja:



Fragmentacja (184) zachodzi łatwo gdy X jest halogenem. Czynnikiem nukleofilowym (Nu) może być np.  $\text{PhO}^-$ ,  $\text{PhS}^-$ , czy  $\text{PhSe}^-$ . Aktywność aromatycznych chlorowcopochodnych w tej reakcji można uszeregować następująco:

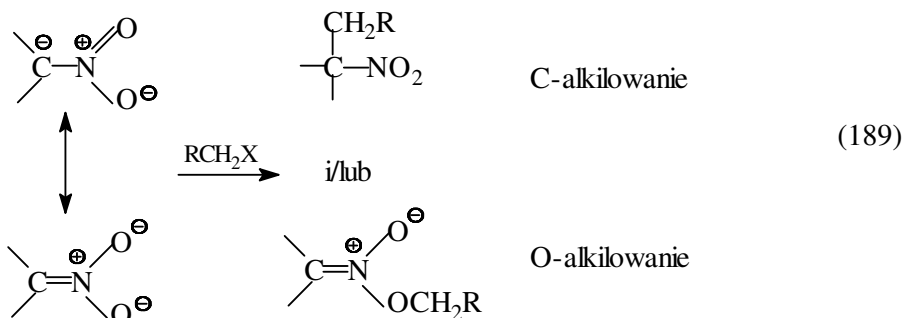


Reakcje przyłączenia są mniej zależne od przeszkód sterycznych niż klasyczne reakcje  $S_N2$  i mogą prowadzić do produktów rozgałęzionych. Zawierający dwa centra nukleofilowe



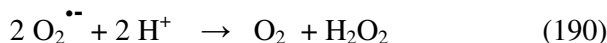
Projekt pn. „Wzmocnienie potencjału dydaktycznego UMK w Toruniu w dziedzinach matematyczno-przyrodniczych” realizowany w ramach Poddziałania 4.1.1 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki

anion 2-nitropropanu (jon ambidentny) ulega C-alkilowaniu wg  $S_{RN}1$  i O-alkilowaniu wg  $S_N1$  dając dwa różne produkty (189) [7]:



Warunkiem reakcji na obu centrach jest mezomeria układu.

Przykładem znanego anionorodnika jest  $\text{O}_2^{\bullet\ominus}$  powstający przez redukcję tlenu cząsteczkowego, zaliczany do aktywnych form tlenu. Jest silną zasadą Brönsteda, a w środowisku aprotycznym - silnym czynnikiem nukleofilowym. Charakteryzuje się właściwościami redukującymi bądź utleniającymi. W wodzie ulega dysproporcjonowaniu:



W środowisku wodnym  $\text{O}_2^{\bullet\ominus}$  jest lepszym utleniaczem niż  $\text{O}_2$ .

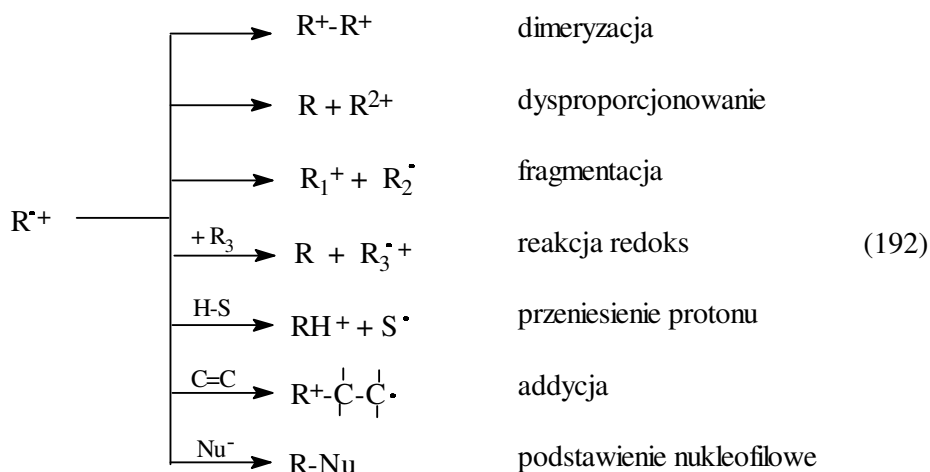
**Kationorodniki** tworzą się wskutek oderwania elektronu z cząsteczki obojętnej przez czynniki utleniające np.  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ , stężony kwas siarkowy (VI), kwasy Lewisa ( $\text{AlCl}_3$ ,  $\text{SbCl}_3$ ), jony metali:  $\text{Mn}^{3+}$ ,  $\text{Co}^{3+}$ ,  $\text{Ce}^{4+}$  pod wpływem promieniowania elektromagnetycznego. Kationorodniki, w których niesparowany elektron jest zlokalizowany na tym samym atomie co ładunek dodatni, są bardzo nietrwałe. Jeżeli ładunek znajduje się na innym atomie niż centrum rodnikowe, trwałość takich kationorodników (191) jest znacznie większa:



Obecność takich jonów potwierdza spektrometria mas.

Znaczny wzrost trwałości niektórych kationorodników jest wywołany delokalizacją elektronów dzięki obecności pierścieni aromatycznych. Kationorodniki biorą udział w licznych reakcjach związków organicznych (192), w których na ogół są produktami przejściowymi.

Projekt pn. „Wzmocnienie potencjału dydaktycznego UMK w Toruniu w dziedzinach matematyczno-przyrodniczych”  
realizowany w ramach Poddziałania 4.1.1 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki



### 13. Metody badania rodników

Niesparowany spin nadaje cząsteczkom właściwości paramagnetyczne, stąd możliwość ich badania za pomocą spektroskopii spinowego rezonansu magnetycznego (EPR - *Electron Paramagnetic Resonance* lub ESR - *Electron Spin Resonance*) i spektroskopii elektronowej. EPR jest zjawiskiem absorpcji rezonansowej promieniowania mikrofalowego przez cząsteczki paramagnetyczne w obecności słabego pola magnetycznego (w porównaniu z silnym polem magnetycznym stosowanym w NMR) [32-35].

Pierwszy udany eksperyment EPR został wykonany przez Ewgenija Zawojskiego w 1944 r. dla hydratu chlorku miedzi(II).

Ze względu na dużą reaktywność i nietrwałość rodników ich stężenie w medium reakcyjnym jest małe, stąd konieczność prowadzenia badań w szczególnych warunkach (w próżni, w atmosferze beztlenowej, w niskich temperaturach, w stanie zamrożonym, w obecności pułapek spinowych).

Moment magnetyczny rodnika, różny od zera, może mieć orientację zgodną lub przeciwną do pola magnetycznego. Efektem tego jest rozszczepienie poziomów magnetycznych rodnika. Jest to tzw. efekt Zeemana (lub rozszczepienie Zeemana). Różnica energii między poziomami jest wyrażona zależnością:

$$\Delta E = h\nu = g \cdot \mu_B \cdot B \quad (193)$$

gdzie  $g$  – współczynnik rozszczepienia spektroskopowego (zwany też współczynnikiem Landego lub współczynnikiem żyromagnetycznym),  $\mu_B$  - magneton Bohra (jednostka elektronowego momentu magnetycznego) i  $B$  - indukcja pola magnetycznego. Jednostką pola magnetycznego w układzie SI jest tesla (T) ale często wyraża się ją w gaussach (Gs).

$$1 \text{ T} = 10^4 \text{ Gs.}$$

Współczynnik  $g$  dla swobodnego elektronu przyjmuje wartość równą 2,0023, a w rodnikach zależy od otoczenia niesparowanych spinów.

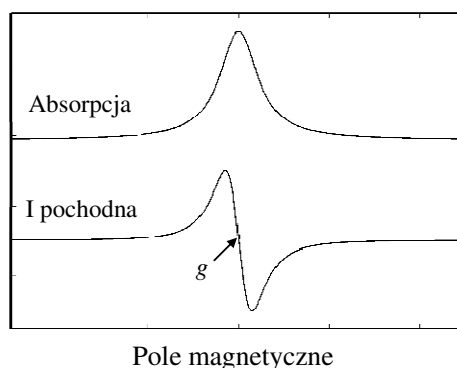
Projekt pn. „Wzmocnienie potencjału dydaktycznego UMK w Toruniu w dziedzinach matematyczno-przyrodniczych” realizowany w ramach Poddziałania 4.1.1 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki

Działanie promieniowania mikrofalowego o określonej energii (typowe częstotliwości – 10GHz dla pola magnetycznego 3500G) powoduje przeniesienie elektronu z poziomu o niższej energii ( $E_1$ ) na poziom o wyższej energii ( $E_2$ ).

Istnieją pewne analogie między techniką NMR, w której bada się spiny jąder atomowych i EPR (spiny elektronów). W NMR protony, a w EPR elektrony ulegają uporządkowania, a ściślej ich momenty magnetyczne, zgodnie lub przeciwnie do kierunku pola magnetycznego.

EPR jest to metoda jakościowego i ilościowego oznaczania wolnych rodników i innych substancji paramagnetycznych takich jak jony metali d-elektronowych, czy pierwiastki ziem rzadkich. Pozwala na wykrywanie defektów w dielektrykach, materiałach węglowych oraz elektronów przewodnictwa w metalach i półprzewodnikach. Jest metodą bardzo czułą, można wykrywać rodniki o bardzo małym stężeniu, nawet rzędu  $10^{-8}$  mol/dm<sup>3</sup>.

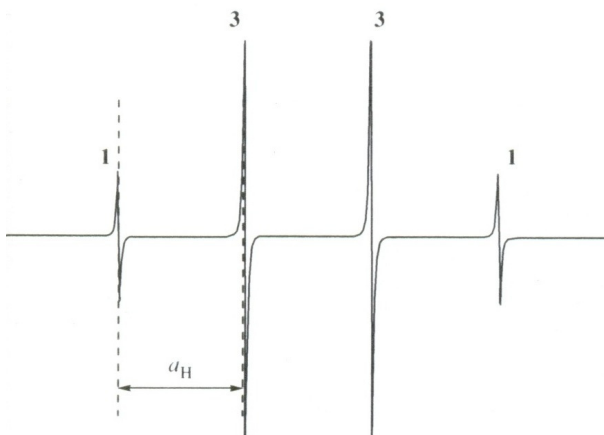
Kształt widma EPR można opisać funkcją Lorentza lub Gaussa. Szerokość linii zależy od oddziaływań z sąsiadującym otoczeniem i czasów relaksacji. Ze względu na małe intensywności pasm absorpcyjnych, widmo EPR najczęściej rejestruje się w postaci pierwszej pochodnej (Rysunek 2). Zaletą takiego sposobu rejestracji widm jest możliwość rozdzielania nakładających się pików.



Rys. 2. Kształt widma absorpcyjnego i pierwszej pochodnej absorpcji.

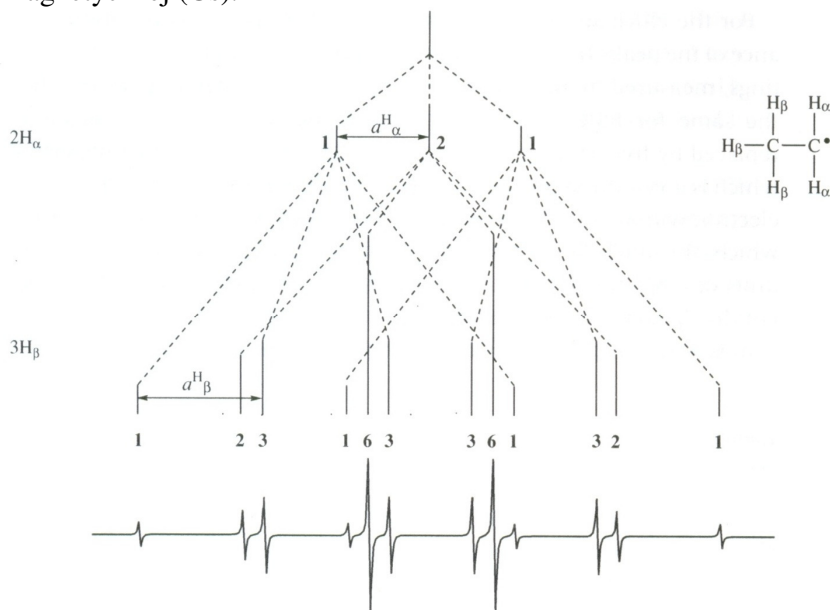
Oddziaływanie atomu zawierającego niesparowany elektron z atomami sąsiednimi o spinie jądrowym różnym od zera powoduje rozszczepienie sygnału EPR na składowe, co pozwala na identyfikację struktury rodnika. Na rysunku 3 przedstawiono widmo EPR rodnika metylowego: 4 linie o stosunku intensywności 1:3:3:1 pochodzą z rozszczepienia sygnału przez 3 ekwiwalentne atomy wodoru w rodniku  $\cdot\text{CH}_3$ . W ten sposób powstaje struktura subtelna widma.

Projekt pn. „Wzmocnienie potencjału dydaktycznego UMK w Toruniu w dziedzinach matematyczno-przyrodniczych” realizowany w ramach Poddziałania 4.1.1 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki



Rys. 3. Widmo EPR rodnika metylowego [5].

Rodnik etylowy  $\cdot\text{C}_2\text{H}_5$  wykazuje strukturę nadsubtelną – jego widmo EPR jest złożone z 12 linii (Rysunek 4). Dwa atomy H z grupy metylenowej ( $\text{H}_\alpha$ ) powodują podział sygnału na 3 linie, a atomy H z grupy metylowej ( $\text{H}_\beta$ ) są przyczyną dodatkowego podziału każdej linii na 4 składowe. W opisie widm EPR podaje się wartości rozszczepienia  $a^{\text{H}_\alpha}$  i  $a^{\text{H}_\beta}$  w jednostkach indukcji magnetycznej (Gs).

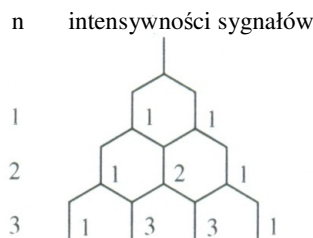


Rys. 4. Widmo EPR rodnika etylowego [5].

Widmo EPR rodników tryfenylometylowych (3) teoretycznie powinno się składać ze 126 linii (jednak ich detekcja zależy od zdolności rozdzielczej aparatu) [35].

Projekt pn. „Wzmocnienie potencjału dydaktycznego UMK w Toruniu w dziedzinach matematyczno-przyrodniczych”  
realizowany w ramach Poddziałania 4.1.1 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki

W przypadku zahamowanej rotacji wiązań chemicznych (spowodowanej zarówno czynnikami strukturalnymi jak i niską temperaturą), wartości rozszczepienia  $a$  są mniejsze. Obowiązuje tu analogiczna jak w NMR reguła piramidy (trójkąt Pascala) wskazująca względne intensywności rozszczepionych sygnałów (Rysunek 5).



Rys. 5. Trójkąt Pascala [5].

Wielkość sygnału EPR (tj. pole powierzchni pasma absorpcyjnego) jest proporcjonalna do liczby wolnych rodników. Oznaczanie ilościowe polega przeważnie na pomiarach względem wzorca, którym najczęściej jest trwały rodnik DPPH (2).

Wykonując pomiar dla nieznannej próbki i wzorca obliczamy ilość wolnych rodników:

$$N_x = N_{wz} \frac{P_x}{P_{wz}} \quad (194)$$

gdzie  $N_x$  – liczba rodników w badanej próbce,  $N_{wz}$  – liczba rodników we wzorcu,  $P_x$  i  $P_{wz}$  – pole powierzchni sygnału próbki i wzorca.

EPR jest metodą niskoenergetyczną, niedestrukcyjną, dzięki czemu znajduje zastosowanie w materiałoznawstwie (minerały, defekty strukturalne, pochodzenie skał), chemii (kinetyka reakcji rodnikowych, reakcje katalityczne, związki metaloorganiczne, reakcje redoks, reakcje polimeryzacji) i fizyce ciała stałego (badanie kryształów kowalencyjnych i jonowych, przewodników, półprzewodników, stanów wzbudzonych), naukach biologicznych i biochemicznych (wolne rodniki w tkankach, reakcje enzymatyczne, fotosynteza, wpływ promieniowania na materiały biologiczne). EPR pozwala również na wykrywanie wolnych rodników w systemach biologicznych *in vivo*.

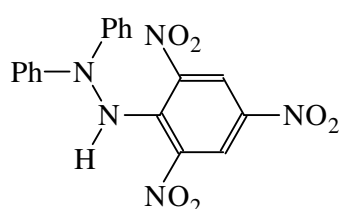
W przemyśle EPR wykorzystuje się m. in. w badaniach wpływu domieszek na właściwości półprzewodników, badaniu procesów korozji, sieciowania polimerów, degradacji farb i lakierów, analizie żywności. EPR znajduje też zastosowanie w datowaniu obiektów archeologicznych i dzieł sztuki.

Pomiar EPR może polegać na bezpośredniej detekcji rodników lub ich wykrywania metodami pośrednimi: za pomocą pułapek spinowych (*spin trapping*), czy też przez chemiczną modyfikację. W sposób bezpośredni wykrywa się rodniki semichinonowe, nitroksydowe i in. a metodami pośrednimi np. rodniki ponadtlenkowe, hydroksylowe, alkilowe, NO.

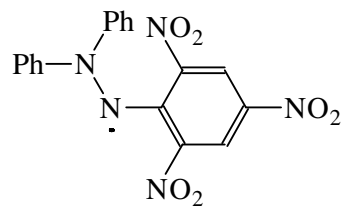
Innymi metodami stosowanymi w badaniach rodników, podobnie jak w badaniach nierodnikowych związków organicznych, są metody spektroskopowe (FTIR, UV-Vis), spektrometria mas, radioliza impulsowa (omówiona w części II).

Projekt pn. „Wzmocnienie potencjału dydaktycznego UMK w Toruniu w dziedzinach matematyczno-przyrodniczych” realizowany w ramach Poddziałania 4.1.1 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki

Widma absorpcyjne rodników w zakresie UV-Vis często wykazują znaczne przesunięcie batochromowe (tj. w kierunku dłuższych fal) oraz większe wartości molowych współczynników absorpcji ( $\epsilon$ ) charakterystycznych pasm w stosunku do ich odpowiedników nierodnikowych [7].



(195)



(196)

W widmie związku (195) występuje pasmo absorpcyjne przy  $\lambda_{\max} = 319$  nm o  $\epsilon = 15\ 000$ , które w widmie rodnika DPPH (196) jest przesunięte do  $\lambda_{\max} = 332$  nm ( $\epsilon = 19\ 000$ ), dodatkowo pojawia się drugie pasmo przy 530 nm ( $\epsilon = 14\ 000$ ). Roztwór zawierający formę rodnikową DPPH staje się barwny.

## Literatura

1. C. Walling, Forty Years of Free Radicals, w: Organic free Radicals, W. Pryor, ACS Symposium Series, Washington, DC, 1978.
2. L. Stolarczyk, U. Stolarczyk, Wolne rodniki, Omega Wiedza Powszechna, Warszawa 1973.
3. R. M. Acheson, The Discovery of Free Radicals, *J. Chem. Educ.*, 73, 1996, 32.
4. Radical reactions, rozdział 39 (str.1019-1052) w: J. Clayden, N. Greeves, S. Warren, P. Wothers, Organic Chemistry, Oxford University Press, Oxford, 2001.
5. A. F. Parsons, An Introduction to Free Radical Chemistry, Backwell Science, 2000.
6. N.A. Punchard, F.J. Kelly, Free Radicals. A practical Approach, Oxford University Press, Oxford, 1996.
7. J. Fossey, D. Lefort, J. Sorba, Free Radicals in Organic Chemistry, John Wiley & Sons, Chichester, 1995.
8. D. I. Davies, M. J. Parrott, Free radicals in organic synthesis (seria Reactivity and Structure vol. 7) Springer-Verlag, Berlin, 1978.
9. S. Paszyc, Podstawy fotochemii, PWN, Warszawa, 1992.
10. J. Kroh, Wolne rodniki w chemii radiacyjnej, PWN, Warszawa 1967.
11. A. Kordus, Plazma – właściwości i zastosowanie w technice, Wydawnictwo Wiedzy Powszechnej Omega, Warszawa 1985.
12. Chemia polimerów, praca zbiorowa pod red. Z. Florjańczyka, S. Penczka, T.I, Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej, 1995.
13. F.W.D.B. Bouo, J.K. Kouame, Y. Tchetche, R.N. Kre, M.L. Mousse, P. Assamoi, *Chemosphere*, 84, 2011, 1617-1629.
14. G. Bartosz, Druga twarz tlenu. Wolne rodniki w przyrodzie, PWN, Warszawa, 2008.
15. M.M. Halman Photodegradation of water pollutants, CRC Press Boca Raton 1996.
16. H.J. Brömme, W. Mörke, E. Peschke, *J. Pineal Res.* 33, 2002, 239-247.

Projekt pn. „Wzmocnienie potencjału dydaktycznego UMK w Toruniu w dziedzinach matematyczno-przyrodniczych”  
realizowany w ramach Poddziałania 4.1.1 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki

17. A Masarawa, S. Rachmilovich-Calis, N. Meyerstein, D. Meyerstein, *Coord. Chem. Rev.* 249, 2005, 1937-1943.
18. S. Wang, *Dyes and Pigment*, 76, 2008, 714-720.
19. Z. Stasicka, *Procesy fotochemiczne w środowisku*, Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków, 2001.
20. G. Wenska, *Fotochemia środowiska*, Wydawnictwo Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza, Poznań, 1997.
21. M.P. Stevens, *Polymer Chemistry. An Introduction*, Oxford University Press, N. York 1999.
22. H. Kaczmarek, I. Vuković-Kwiatkowska, *eXPRESS Polymer Letters*, 6, 2012, 78-94.
23. <http://homepages.rpi.edu/~plawsky/Research/Processing.htm>
24. *Fotochemia Polimerów. Teoria i zastosowanie*, praca zbiorowa pod red. J. Pączkowskiego, Wydawnictwo UMK, Toruń, 2003.
25. *Radiation Curing in Polymer Science and Technology*, praca zbiorowa, red. J.P. Fouassier, J.F. Rabek, Elsevier Applied Science, Essex, 1993.
26. A. Wrzyszczyński, *Organiczne związki siarki jako inicjatory i koinicjatory fotopolimeryzacji rodnikowej*, Wydawnictwo ATR, Bydgoszcz, 2004.
27. J. Kabatc, *Mono- i wielokationowe barwniki polimetinowe jako sensybilizatory w dwu- i trójskładnikowych układach fotoinicjujących polimeryzację wolnorodnikową oraz sondy spektroskopowe*, Wydawnictwo UTP, Bydgoszcz, 2012.
28. N.P. Bartoszek, P. Ulański, J. M. Rosiak, *International Journal of Chemical Kinetics* 43, 2011, 474–481.
29. A. Henke, S. Kadłubowski, M. Wolszczak, P. Ulański, V. Boyko, T. Schmidt, A. Karl-Friedrich, J. M. Rosiak, *Macromol. Chem. Phys.*, 212(23), 2011, 2529-2540.
30. J. F. Rabek, *Photodegradation of Polymers. Physical Characteristics and Applications* Springer, Berlin, 1996.
31. H. Kaczmarek, *Efekty przyspieszania fotochemicznego rozkładu polimerów przez substancje mało- i wielkocząsteczkowe*, Wydawnictwo UMK, Toruń, 1998.
32. D. J. E. Ingram, *Free radicals as studied by electron spin resonance*, Butterworths Scientific Publications, London, 1958.
33. P-O. Kinell, B. Ranby, *ESR Applications to Polymer Research*, John Wiley & Sons, Chichester, 1973.
34. W. Przygocki, *Metody fizyczne badania polimerów*, PWN, Warszawa, 1990.
35. C. Walling, *Free Radicals in Solution*, John Wiley & Sons, London, 1957.

Projekt pn. „Wzmocnienie potencjału dydaktycznego UMK w Toruniu w dziedzinach matematyczno-przyrodniczych”  
realizowany w ramach Poddziałania 4.1.1 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki

Alina Sionkowska

## CZEŚĆ II. WOLNE RODNIKI W BIOLOGII I MEDYCYNIE

### 14. Źródła wolnych rodników w organizmach żywych i stres oksydacyjny

Wolny rodnik to indywiduum, które ma na zewnętrznej powłoce elektronowej jeden niesparowany, bardzo aktywny chemicznie elektron. Wolny rodnik z łatwością utlenia białka, kwasy nukleinowe i lipidy błon komórkowych. Wśród wolnych rodników dominują rodniki tlenowe:  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{OH}^\cdot$ ,  $\text{O}_2^{\cdot-}$  i inne. Powstają one nieustannie w mitochondriach jako produkt odpadowy pozyskiwania energii w szlaku fosforylacji oksydacyjnej. Często nazywane są reaktywnymi formami tlenu, w skrócie RTF (nazwa angielska: *reactive oxygen species ROS*). Reakcja przyłączania wodoru do tlenu w warunkach normalnych przebiega w ten sposób, że 2 atomy wodoru przenoszone są z  $\text{NADH}_2$  na  $\text{O}_2$  i powstaje  $\text{H}_2\text{O}_2$ , czyli woda utleniona. Jest ona szybko neutralizowana przez dysmutazę nadtlenkową (enzym, który w mitochondriach jest obsługiwany przez mangan, a w cytoplazmie przez cynk lub miedź):



Jednak niewielka część wody utlenionej, zanim zostanie rozłożona, może zdążyć zareagować z jakąś cząsteczką i utlenić ją, bądź też przejść w jakąś inną postać rodnika tlenowego. Wolne rodniki powstają w organizmie w wielu naturalnych reakcjach chemicznych, są zatem integralną częścią życia. Jednym z miejsc, gdzie są one generowane celowo w organizmie jest ognisko zapalne, w którym są wytwarzane w dużych ilościach przez leukocyty w celu niszczenia drobnoustrojów. Nie można więc powiedzieć, że działanie wolnych rodników jest tylko i wyłącznie złe [1]. Jednak nadmiar wolnych rodników jest niewskazany, zatem powinny być one dezaktywowane w organizmach żywych. Dezaktywowanie wolnego rodnika jest więc nadrzędnym zadaniem komórki. Może ono zajść na dwa sposoby: poprzez dodanie brakującego elektronu (redukcja) albo zabranie nadaktywnego elektronu (utlenianie).

Wiele rodników tlenowych powstaje w wyniku naturalnie zachodzących procesów metabolicznych w organizmach żywych, takich jak oddychanie tlenowe oraz procesy zapalne [1]. Wolne rodniki oddziałują na komórki sygnalizujące lub cząsteczki przekaźnikowe, co sprawia, że odgrywają istotną rolę w prawidłowym funkcjonowaniu komórki. Uczestniczą w wielu procesach, m.in. w skurczach mięśni, wydzielaniu hormonów, w funkcjonowaniu układu obronnego, regulacji napięcia naczyniowego. Warunkują aktywność bakteriobójczą i bakteriostatyczną śliny, a także biorą udział w usuwaniu leków z ustroju. Działanie destrukcyjne zaczyna się dopiero wtedy, kiedy rodniki są wytworzone w nadmiarze. Tlenowe związki reaktywne są wytwarzane w mitochondrialnym łańcuchu oddechowym przez oksydazę  $\text{NADPH}$ , dysmutazę ponadtlenkową, oksydazy flawoprotein. Reaktywne formy tlenu doprowadzają do zniszczenia kwasów nukleinowych i białek w komórce [1, 2].

W układzie oddechowym istnieją układy odpowiedzialne za przenoszenie elektronów. Nazywane są one kompleksami łańcucha oddechowego. Kompleksy łańcucha oddechowego (I, III i IV) przenoszą parzystą ilość atomów wodoru lub elektronów na tlen (reakcje dwuelektronowe). Te kompleksy to: I – dehydrogenaza  $\text{NADH}$ , III – kompleks cytochromów



Projekt pn. „Wzmocnienie potencjału dydaktycznego UMK w Toruniu w dziedzinach matematyczno-przyrodniczych” realizowany w ramach Poddziałania 4.1.1 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki

bc1, IV – oksydaza cytochromowa c [1,3]. Mimo to część z nich opuszcza łańcuch oddechowy redukując tlen na drodze procesu jednoelektrodowego prowadząc do wytworzenia wolnych rodników tlenowych [1,4]. Głównymi kompleksami odpowiedzialnymi za „przeciekanie” elektronów są kompleks I oraz ubichinon. Przyłączenie elektronu do cząsteczki tlenu przekształca tę cząsteczkę w anionorodnik ponadtlenkowy, główny przedstawiciel wolnych rodników w organizmie. Przyłączenie drugiego elektronu przyczynia się do powstania nadtlenu wodoru, najważniejszego prekursora wolnych rodników. Z kolei dołączenie trzeciego elektronu wytwarza toksyczny rodnik hydroksylowy, natomiast przyłączenie następnego elektronu generuje cząsteczkę wody, czyli związku niereaktywnego wobec składników komórki. Wytworzony rodnik hydroksylowy wywiera destrukcyjny wpływ na komórkę, ponieważ niezbędne mu elektrony zdobywa ze związków w niej występujących. W tabeli 1 przedstawiono tlenowe związki reaktywne i ich prekursory.

Tabela 1. Tlenowe związki reaktywne i ich prekursory [1,3,5]

Rodniki	Prekursory wolnych rodników
Rodnik hydroksylowy OH <sup>•</sup>	Nadtlenoazotyn ONOO <sup>-</sup>
Anionorodnik ponadtlenkowy O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Kwas chlorowy I (in. kwas podchlorawy) HOCl
Rodnik wodoronadtlenkowy HO <sub>2</sub> <sup>•</sup>	Nadtlenek wodoru H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Rodnik alkoksylowy RO <sup>•</sup>	Tlen singletowy <sup>1</sup> O <sub>2</sub>
Rodnik nadtlenkowy ROO <sup>•</sup>	Ozon O <sub>3</sub>

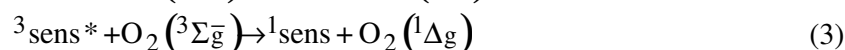
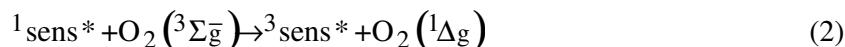
Endogennymi źródłami wolnych rodników są także komórki śródbłonna naczyń płuc. Dodatkowym źródłem są granulocyty kwasochłonne i obojętnochłonne, monocyty oraz makrofagi. Wiele rodników tworzy się w reakcjach biologicznych, np. w metabolizmie ksenobiotyków jako czynnik naturalnych procesów detoksykacyjnych w ustroju [5]. Wiele czynników zewnętrznych (egzogennych) może spowodować przyspieszenie ich powstawania w nadmiarze, np. nieprawidłowa dieta, palenie tytoniu i spożywanie alkoholu. Wzmożone tempo oddychania podczas wysiłku fizycznego, zanieczyszczenia środowiskowe i przemysłowe, działanie promieniowania jonizującego stanowi dodatkowe źródło wytwarzania znacznej ilości wolnych rodników.

Pod wpływem działania promieniowania elektromagnetycznego mogą zajść procesy fotobiologiczne i fotoutlenianie. Większość komórek w organizmach żywych nie jest jednak zbyt czuła na działanie światła. Wyjątkiem są barwne komórki skóry oraz czopki i pręciki w oku, a także komórki odpowiedzialne za fotosyntezę w roślinach i niektórych bakteriach. Jednak obecność fotosensybilizatorów, zarówno egzogennych jak i endogennych może indukować zmiany, które mogą doprowadzić do śmierci komórki. Można wymienić kilka czynników, które determinują rozmiar uszkodzeń spowodowanych obecnością fotosensybilizatorów:

Projekt pn. „Wzmocnienie potencjału dydaktycznego UMK w Toruniu w dziedzinach matematyczno-przyrodniczych”  
realizowany w ramach Poddziałania 4.1.1 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki

- a) Łatwość wzbudzenia sensybilizatora światłem o różnej długości fali
- b) Dostęp sensybilizatora do komórki
- c) Ważność uszkodzonego składnika komórkowego dla całej tkanki.

Informacje na temat pierwszego z czynników są ogólnie znane, ale zarówno zmiany środowiskowe jak i pH, czy też polarność środowiska mogą wpływać na zachowanie się fotosensybilizatorów. Fotosensybilizacja w obecności tlenu może być podzielona na dwie grupy zależnie od mechanizmu: pierwszy mechanizm z udziałem tlenu singletowego, oraz drugi mechanizm wolnorodnikowy. Powstające rodniki mogą być obojętne, jak również obdarzone ładunkiem. Zależnie od potencjału redukcyjnego mogą mieć właściwości utleniające lub redukujące. W obecności sensybilizatorów może również powstawać tlen singletowy. Cząsteczka tlenu w stanie podstawowym posiada multipletowość spinu 3, czyli jest w stanie trypletowym ( $^3\Sigma_g^-$ ). Dwa najniższe stany wzbudzone tlenu w fazie gazowej to stany singletowe ( $^1\Delta_g$  i  $^1\Sigma_g^+$ ). Tlen singletowy może być produkowany na drodze rozkładu nadtlenu albo przeniesienia energii. W układach biologicznych najczęściej powstaje na skutek przeniesienia energii ze wzbudzonej cząsteczki sensybilizatora ( $\text{sens}^*$ ) do cząsteczki tlenu w stanie podstawowym. Niski poziom energetyczny tlenu singletowego  $\text{O}_2(^1\Delta_g)$  ( $E = 0.98 \text{ eV}$  lub  $94.5 \text{ kJmol}^{-1}$ ) oznacza, że wiele sensybilizatorów posiada wystarczająco wysoką energię w stanie singletowym i trypletowym aby doprowadzić  $\text{O}_2(^3\Sigma_g^-)$  do stanu wzbudzonego. To oznacza, że wydajność kwantowa powstawania  $\text{O}_2(^1\Delta_g)$  może być nawet 2 [6,7].



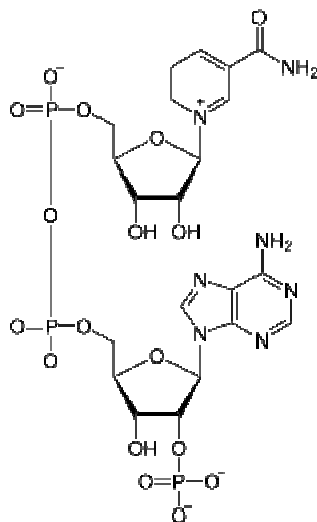
Czas życia stanu singletowego musi być wystarczająco długi oraz różnica energii pomiędzy stanem trypletowym i singletowym ( $\Delta E(S_1-T_1)$  i  $E(T_1)$ ) musi być wyższa niż  $E(\text{O}_2(^1\Delta_g))$ . Dlatego też produkcja  $\text{O}_2(^1\Delta_g)$  zachodzi głównie ze stanu trypletowego, gdyż zwykle  $\Delta E(S_1-T_1)$  jest zbyt mała i czas życia stanu singletowego jest zbyt krótki.  $\text{O}_2(^1\Delta_g)$  może reagować z wieloma składnikami komórkowymi prowadząc do utleniania, ale ze względu na krótki czas życia, jeśli reakcja nie zdąży zajść, zanika do stanu podstawowego ( $^3\Sigma_g^-$ ) albo przez procesy nieradiacyjne albo na drodze emisji światła w regionie 1270 nm (efekt luminescencji). Przy udziale sensybilizatorów mogą również powstawać nadtlenuki. Anionorodnik ponadtlenkowy ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) produkowany jest na drodze przeniesienia elektronu. Jest on produktem jednoelektrodowej redukcji tlenu:



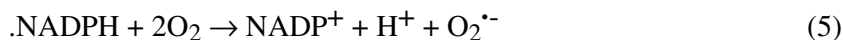
gdzie:  $\text{D}^*$  - sensybilizator w stanie singletowym lub trypletowym, Sensybilizator w stanie trypletowym może być produkowany na drodze radiolitycznej, fotochemicznej, elektrochemicznej, enzymatycznej (np. oksydazy) oraz w wyniku reakcji z nadtlenukami. W układach biologicznych wzbudzony sensybilizator powstaje z komórek fagocytowych (makrofagi, neutrofile, monocyty) i pomaga im w inaktywacji ciał obcych, takich jak wirusy czy bakterie. Prowadzi to do wzrostu konsumpcji tlenu i redukcji tlenu do

Projekt pn. „Wzmocnienie potencjału dydaktycznego UMK w Toruniu w dziedzinach matematyczno-przyrodniczych”  
realizowany w ramach Poddziałania 4.1.1 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki

nadtlenków. Reakcje tego typu są katalizowane przez NADPH (dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy), przedstawiony na rys.1.



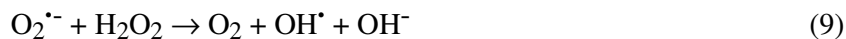
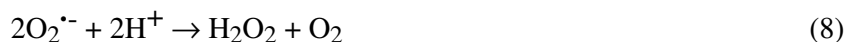
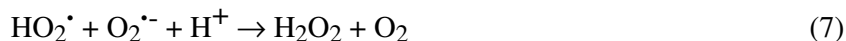
Rys. 1. Dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy



Nadtlenki i anionorodniki ponadnadtlenkowe mogą być generowane przez mitochondria czy chloroplasty w wyniku przenoszenia elektronów. Głównie zachodzi proces autoutleniania różnych białeczek, takich jak zredukowana forma cytochromu C czy hemoglobiny. Powstały nadtlenek może reagować z innymi cząsteczkami działając jako czynnik propagujący reakcje rodnikowe.

W roztworach wodnych i innych polarnych rozpuszczalnikach anion rodnik nadtlenkowy nie jest zbyt aktywny ze względu na jego ujemny ładunek i wysoką energię solwatacji. Jest on jednak zdysocjowaną formą rodnika wodoronadtlenkowego ( $\text{HO}_2^{\cdot}$ ), który jest słabym kwasem. W warunkach fizjologicznych tylko niewielka ilość nadtlenków jest reaktywna. Na przykład  $\text{HO}_2^{\cdot}$  może inicjować reakcję utleniania polinienasyconych kwasów tłuszczowych (*polyunsaturated fatty acids* - PUFA), natomiast nie może dokonać tego  $\text{O}_2^{\cdot-}$ .

W roztworach wodnych  $\text{HO}_2^{\cdot}$  i  $\text{O}_2^{\cdot-}$  mogą ze sobą reagować prowadząc w ten sposób do powstawania innych rodników, np. bardzo reaktywnych rodników hydroksylowych:



Projekt pn. „Wzmocnienie potencjału dydaktycznego UMK w Toruniu w dziedzinach matematyczno-przyrodniczych”  
realizowany w ramach Poddziałania 4.1.1 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki

Wyróżnia się dwa mechanizmy fotosensybilizowanego utleniania. Pierwszy mechanizm (typ I) polega na zaangażowaniu rodników, drugi zaś (typ II) polega na reakcjach z tlenem singletowym. Schematycznie przedstawia te mechanizmy rysunek 2.

Mechanizm typu I zachodzi poprzez transfer atomu wodoru z substratu (RH) do stanu trypletowego sensybilizatora ( $^3\text{sens}^*$ ), co prowadzi do powstawania rodnika na atomie węgla ( $\text{R}^\cdot$ ). Taki rodnik na atomie węgla może reagować z tlenem prowadząc do powstania rodnika

nadtlenkowego ( $\text{RO}_2^\cdot$ ). Rodniki  $\text{RO}_2^\cdot$  atakują inne cząsteczki generując więcej rodników zlokalizowanych na atomach węgla propagując w ten sposób utlenianie. Jako reakcja uboczna może być też generowany tlen singletowy. Produktami reakcji przebiegającymi według tego mechanizmu są: alkohole, ketony, epoksydy, wodoronadtlenki.

W mechanizmie typu II tlen singletowy jest generowany poprzez transfer z  $^3\text{sens}^*$  do stanu podstawowego cząsteczki tlenu. W ten sposób tlen singletowy może utleniać szereg związków, np. lipidy, białka, DNA [8].

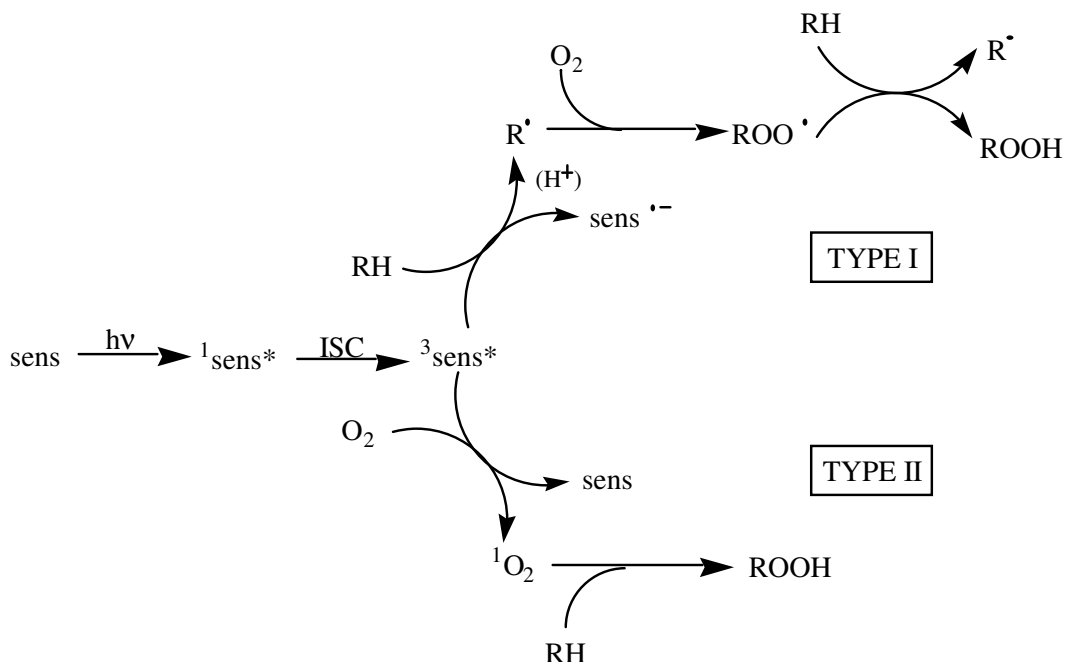
Najważniejszym stałym źródłem wolnych rodników w organizmie jest spalanie wodoru z tlenem. Z każdego litra tlenu, który zużywamy do spalania, 2% ulega niepełnemu spalaniu do wolnego rodnika tlenowego. Drugim ważnym źródłem wolnych rodników są różne procesy detoksykacji zachodzące głównie w wątrobie, w szczególności rozkładanie leków i toksyn. Proces tworzenia wolnych rodników w organizmie jest więc stały i dość intensywny, wymaga więc ciągłego ich usuwania.

W warunkach prawidłowych istnieje równowaga pomiędzy powstawaniem wolnych rodników a ich usuwaniem (wymiataniem). Wzrost wytwarzania wolnych rodników, zmniejszenie ilości zmiataczy, zmniejszenie aktywności systemów enzymatycznych odpowiedzialnych za ich usuwanie i spadek aktywności antyoksydacyjnej powoduje, że nie są one skutecznie usuwane przez mechanizmy obronne organizmu. Dochodzi do zachwiania równowagi w kierunku reakcji utleniania, co określa się mianem stresu oksydacyjnego. Narządami szczególnie narażonymi na stres oksydacyjny są: układ oddechowy, układ krążenia, mózg i narząd wzroku.

Do ochrony przed działaniem wolnych rodników organizm wykorzystuje cały szereg mechanizmów stanowiących ochronę antyoksydacyjną organizmu. Można w niej wyróżnić kilka elementów:

- Enzymy antyoksydacyjne: wykorzystywane do usuwania wolnych rodników tlenowych (dysmutaza nadtlenkowa, katalaza oraz peroksydaza glutationowa).
- Minerale niezbędne do pracy powyższych enzymów: np. dysmutaza nadtlenkowa wymaga cynku, miedzi, manganu, katalaza wymaga żelaza, a peroksydaza glutationowa wymaga selenu.
- Naturalne substancje antyoksydacyjne najczęściej dostarczane są z pożywieniem. Mogą być one jednokrotnego użytku, bądź też organizm może mieć zdolność regeneracji ich postaci zredukowanych. Można wśród nich wyróżnić: witaminy, koenzym Q10, glutation, kwas alfa-liponowy i inne pochodne tiolowe, oraz najróżnorodniejsze flawonoidy roślinne.

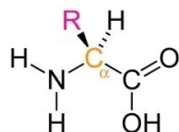
Projekt pn. „Wzmocnienie potencjału dydaktycznego UMK w Toruniu w dziedzinach matematyczno-przyrodniczych”  
realizowany w ramach Poddziałania 4.1.1 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki



Rys. 2. Schemat fotosensybilizowanego utleniania: typ I i typ II inicjowania

### 15. Reakcje rodnikowe w aminokwasach

Wszystkie białka w organizmach żywych są zbudowane z aminokwasów. Ogólny wzór aminokwasu przedstawia rysunek 3. W białkach występuje ponad 20 aminokwasów, które pełnią różne funkcje w organizmie.



Rys. 3. Wzór ogólny aminokwasu. R- grupa boczna, -COOH- grupa kwasowa, NH<sub>2</sub>- grupa aminowa

Wolne rodniki i tlen singletowy mogą atakować aminokwasy i prowadzić do utleniania aminokwasów siarkowych, aromatycznych oraz do powstawania grup karbonylowych. Niektóre aminokwasy mogą również reagować na drodze fotochemicznej z polinukleotydami prowadząc w ten sposób do tworzenia wiązań sieciujących pomiędzy białkami i DNA [5,9]. Kierunek i szybkość reakcji rodników hydroksylowych z aminokwasami zależy głównie od budowy aminokwasu (tj. rodzaju, ilości i położenia grup funkcyjnych w łańcuchu bocznym) oraz pH środowiska wodnego.

Projekt pn. „Wzmocnienie potencjału dydaktycznego UMK w Toruniu w dziedzinach matematyczno-przyrodniczych”  
realizowany w ramach Poddziałania 4.1.1 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki

Główne kierunki reakcji rodnika  $\cdot\text{OH}$  z aminokwasami to:

- odrywanie atomu wodoru od węgla  $\alpha$  oraz wodorów z grup funkcyjnych w łańcuchu bocznym (np. -SH),

- przyłączanie do układów p- lub s- elektronowych grup funkcyjnych.

W przypadku aminokwasów alifatycznych, pierwszy kierunek reakcji dominuje w warunkach  $\text{pH} < \text{pK}_a(\text{NH}_3^+)$ . Rodnik  $\cdot\text{OH}$  reaguje tutaj głównie przez oderwanie atomu wodoru z łańcucha bocznego [9].



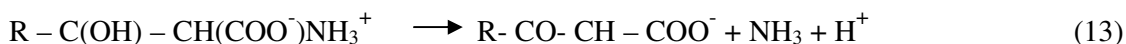
Reakcje te zachodzą ze stosunkowo niewielkimi szybkościami. Głównymi produktami cząsteczkowymi reakcji rodnika  $\cdot\text{OH}$  z aminokwasami alifatycznymi w  $\text{pH}$  zbliżonym do obojętnego są: amoniak, kwasy karboksylowe i ketokwasy. W niewielkich ilościach jest obserwowane również powstawanie dwutlenku węgla. Za zachodzącą pod wpływem rodników  $\cdot\text{OH}$  deaminację odpowiedzialna jest reakcja dysproporcjonowania:



i następująca po niej hydroliza powstałego kwasu  $\alpha$ -iminokarboksylowego:



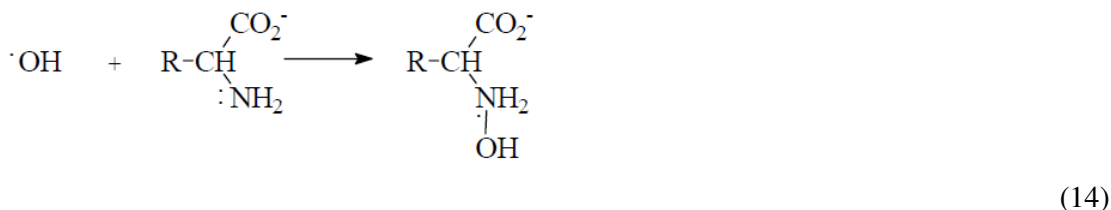
W przypadku aminokwasów czynnych optycznie reakcji dysproporcjonowania towarzyszy racemizacja układu. Jeszcze łatwiejszy jest proces deaminacji w przypadku aminokwasów zawierających grupę  $\cdot\text{OH}$  w pozycji  $\beta$  do grupy aminowej. Proces ten zachodzi zgodnie z ogólnym równaniem:



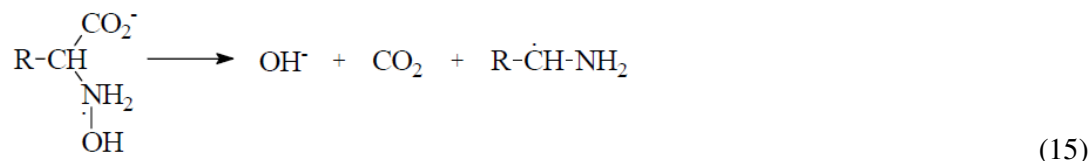
Dla  $\text{pH} > \text{pK}_a(\text{NH}_3^+)$  dla ataku rodnika elektrofilowego dostępna staje się wolna para elektronowa zlokalizowana na azocie grupy aminowej, stąd wzrost  $\text{pH}$  powoduje wyraźne zwiększenie stałej szybkości reakcji rodnika  $\cdot\text{OH}$  z aminokwasami.

Zwiększenie wydajności dekarboksylacji wraz ze wzrostem  $\text{pH}$  nie jest obserwowane w aminokwasach alifatycznych, w których grupa karboksylowa i aminowa znajdują się przy różnych atomach węgla ( $\beta$ -alanina, kwasy 3- i 4- aminobutyłowe). Mechanizm procesu dekarboksylacji zakłada powstawanie adduktu (14), w wyniku ataku rodnika hydroksylowego na wolną parę elektronową azotu:

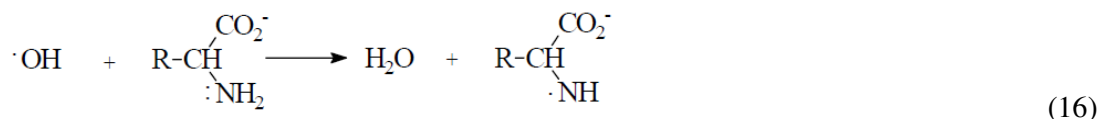
Projekt pn. „Wzmocnienie potencjału dydaktycznego UMK w Toruniu w dziedzinach matematyczno-przyrodniczych”  
realizowany w ramach Poddziałania 4.1.1 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki



który następnie ulega dekarboksylacji:

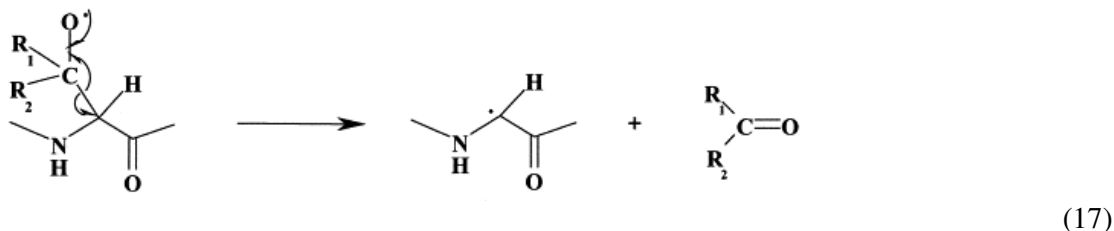


Powstające w tej reakcji rodniki  $\alpha$ -aminoalkilowe są stabilizowane rezonansowo poprzez oddziaływanie z wolną parą elektronową azotu. Wykazana została także możliwość konkurencyjnego do addycji, odrywania atomu wodoru od deprotonowanej grupy aminowej prowadząca do powstania rodnika aminylowego:



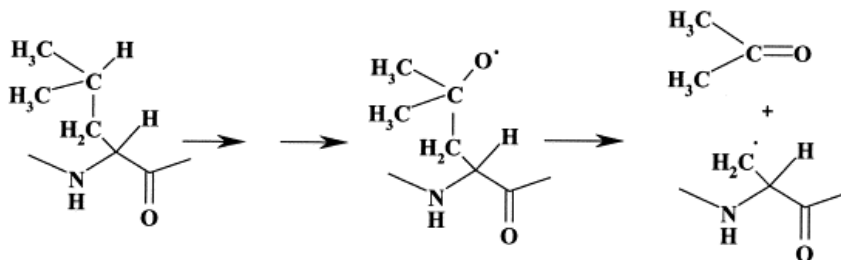
Powstające w wyniku tej reakcji rodniki aminylowe najprawdopodobniej zanikają w reakcji międzycząsteczkowego przeniesienia protonu, której produktem są rodniki z miejscem rodnikowym ulokowanym na jednym z węgli w łańcuchu alifatycznym aminokwasu. Dalszym etapem reakcji może być dekarboksylacja.

W wyniku reakcji tlenu singletowego i rodników hydroksylowych mogą powstawać rodniki alkoksyłowe. Rodniki alkoksyłowe tworzące się przy atomie węgla C-3 w alaninie mogą prowadzić do powstania rodnika na węglu  $-\alpha-$  prowadząc do rozerwania łańcucha. Jeśli  $\text{R}=\text{H}$  wówczas może uwalniać się formaldehyd (znany jako genotoksyna u zwierząt, czynnik rakotwórczy).



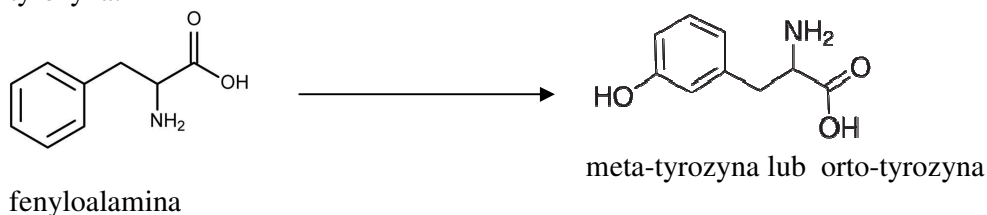
W wyniku reakcji utleniania leucyny i rozerwania łańcucha z rodnikiem alkoksyłowym w pozycji  $\beta$  ( $\beta$ -scission) powstaje aceton.

Projekt pn. „Wzmocnienie potencjału dydaktycznego UMK w Toruniu w dziedzinach matematyczno-przyrodniczych”  
realizowany w ramach Poddziałania 4.1.1 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki

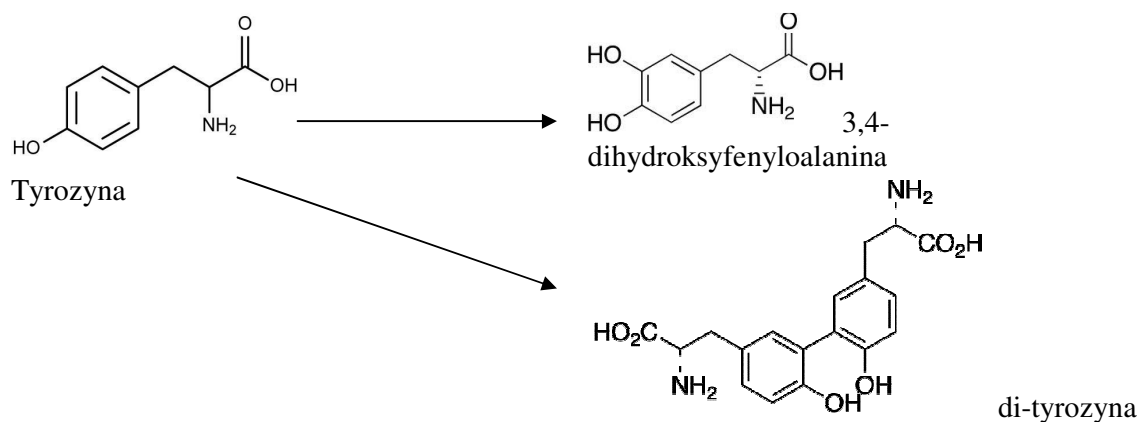


(18)

W aminokwasach aromatycznych (fenyloalanina, tyrozyna, tryptofan, histydyna) dominującym kierunkiem reakcji jest przyłączenie rodnika  $\cdot\text{OH}$  do pierścieni aromatycznych. Są to reakcje bardzo szybkie (z reguły stałe szybkości są o dwa rzędy wyższe od stałych szybkości w aminokwasach alifatycznych) gdyż powstające addukty OH, o charakterze rodnikowym, są stabilizowane przez oddziaływania rezonansowe układu aromatycznego [9,10,11]. Schematy reakcji aminokwasów aromatycznych i powstające produkty reakcji rodnikowych przedstawiono na rysunkach 4-8. W wyniku fotoutleniania fenyloalaniny powstaje tyrozyna, a w wyniku utleniania tyrozyny powstaje dihydroksyfenyloalanina lub di-tyrozyna.



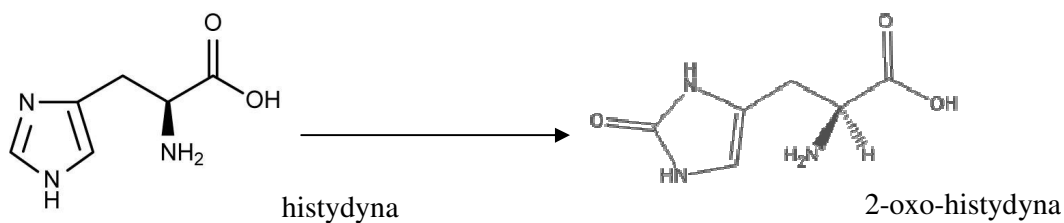
Rys.4. Reakcja zachodząca w fenyloalaninie z udziałem tlenu singletowego



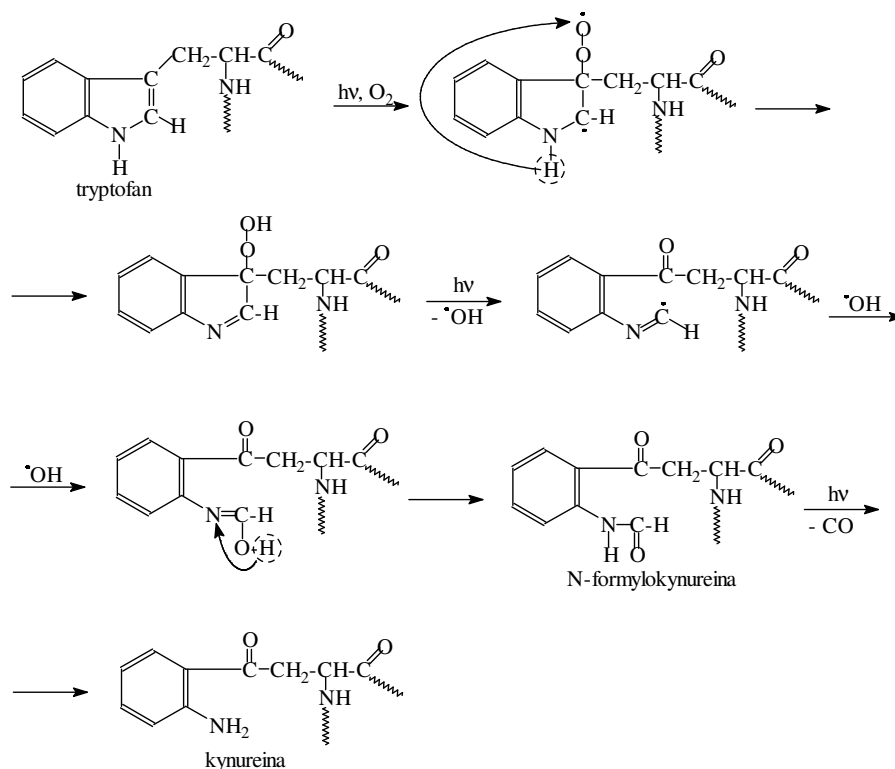
Rys .5. Reakcje zachodzące w tyrozynie z udziałem tlenu singletowego



Projekt pn. „Wzmocnienie potencjału dydaktycznego UMK w Toruniu w dziedzinach matematyczno-przyrodniczych”  
realizowany w ramach Poddziałania 4.1.1 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki

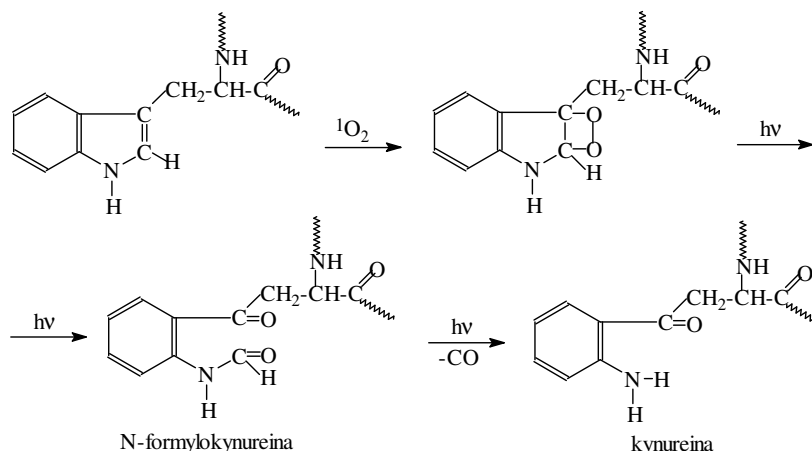


Rys. 6. Reakcja utleniania rodnikowego histydyny



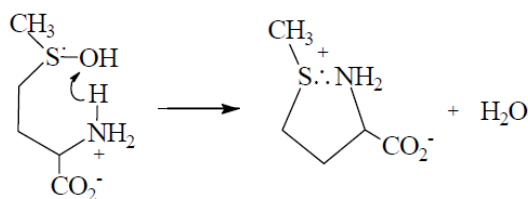
Rys. 7. Reakcje fotochemiczne tryptofanu [11]

Projekt pn. „Wzmocnienie potencjału dydaktycznego UMK w Toruniu w dziedzinach matematyczno-przyrodniczych”  
realizowany w ramach Poddziałania 4.1.1 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki



Rys.8. Reakcje tryptofanu z tlenem singletowym [11]

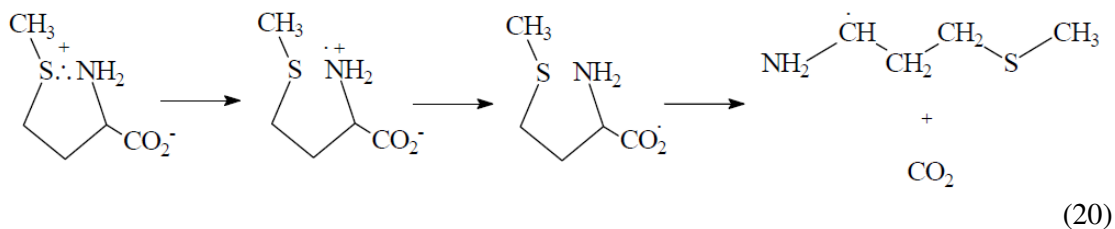
Głównym kierunkiem reakcji rodnika  $\cdot\text{OH}$  z aminokwasami zawierającymi atom siarki jest addycja rodnika do układu elektronów p- siarki tioeterowej i tworzenie rodnika hydroksysulfuranylowego. Sposób rozpadu tego rodnika silnie zależy od pH środowiska, które decyduje o formie jonowej pozostałych grup funkcyjnych aminokwasu ( $\text{NH}_2/\text{NH}_3^+$ ,  $\text{COO}^-/\text{COOH}$ ), a w konsekwencji o ich roli w przemianach rodnikowych. W zakresie niskiego pH,  $\text{pH} < \text{pK}_a(\text{COOH})$ , rodnik hydroksysulfuranylowy eliminuje wodę z udziałem protonów środowiska dając monomeryczny kationorodnik  $>\text{S}^{++}$ , który jest stabilizowany przez addycję do nieutlenionej grupy tioeterowej drugiej cząsteczki aminokwasu tworząc kationorodnik dimerowy z międzycząsteczkowym wiązaniem trójelektronowym. Kationorodnik dimerowy jest dość stabilny (czas życia rzędu  $\mu\text{s}$ ) i zanika poprzez deprotonację, dając rodniki  $\alpha$ -(alkilotio)alkilowe [12]. Z kolei, w miarę podwyższania pH,  $\text{pH} > \text{pK}_a(\text{COOH})$  rodnik hydroksysulfuranylowy może eliminować wodę w procesie wewnątrzcząsteczkowym z udziałem protonu z protonowanej grupy aminowej. W konsekwencji, w przypadku metioniny następuje szybkie zamknięcie pięciocłonowego pierścienia prowadzące do powstania kationorodnika z wewnątrzcząsteczkowym wiązaniem trójelektronowym S $\cdot$ :N:



(19)

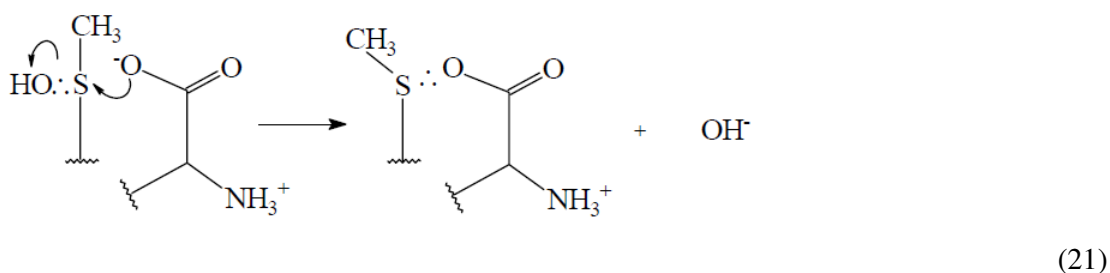
Projekt pn. „Wzmocnienie potencjału dydaktycznego UMK w Toruniu w dziedzinach matematyczno-przyrodniczych” realizowany w ramach Poddziałania 4.1.1 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki

Siłą napędową tego procesu jest stabilność wiązania S:N oraz powstawanie uprzywilejowanego przestrzennie pierścienia pięciocząłowego. Indywiduum to zanika w rezultacie przeniesienia elektronu z grupy karboksylowej do azotu, prowadzącego do utlenienia grupy karboksylowej i dekarboksylacji.



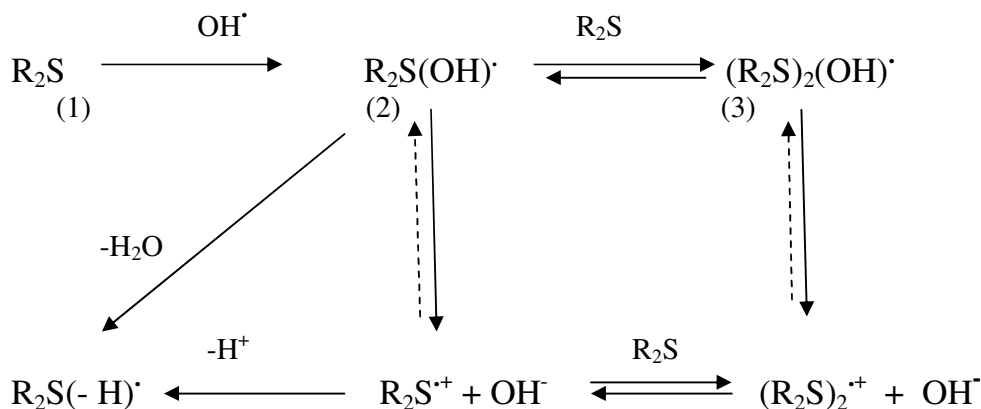
Z kolei, siłą napędową procesu dekarboksylacji (20) jest powstawanie stabilizowanych rezonansowo, poprzez oddziaływanie z wolną parą elektronową azotu, rodników  $\alpha$ -aminoalkilowych

Proces dekarboksylacji zachodzi efektywnie wtedy, gdy grupa karboksylowa aminokwasu jest deprotonowana,  $\text{pH} > \text{pK}_a(\text{COOH})$ . Pozwala to na przedstawienie drugiego, alternatywnego mechanizmu utleniania metioniny, zakładającego bezpośredni udział zjonizowanej grupy karboksylowej w dehydratacji rodnika hydroksysulfuranylowego. Postuluje się zachodzącą na atomie siarki reakcję podstawienia anionu hydroksylowego ( $\text{OH}^-$ ) przez  $-\text{COO}^-$  (w procesie między lub wewnątrzcząsteczkowym) [12].



Ogólny schemat reakcji rodników  $\cdot\text{OH}$  z aminokwasami zawierającymi atom siarki przedstawia rysunek 9.

Projekt pn. „Wzmocnienie potencjału dydaktycznego UMK w Toruniu w dziedzinach matematyczno-przyrodniczych” realizowany w ramach Poddziałania 4.1.1 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki



Rys. 9. Ogólny mechanizm utleniania alkilowych związków zawierających atom siarki: (1) związek zawierający atom siarki; (2) powstawanie rodnika hydroksysulfuranylowego; (3) tworzenie kompleksu z inną cząsteczką tioeteru.

## 16. Reakcje rodnikowe w białkach

Białka ze względu na ich duże występowanie w układach biologicznych są głównym celem ataku głównych utleniaczy. Dane kinetyczne wskazują, że stałe szybkości podstawowych utleniaczy z białkami są bardzo duże. Utlenianie zachodzi zarówno w szkieletcie łańcucha głównego białka jak również w łańcuchach bocznych. Przebieg reakcji utleniania zależy od wielu czynników. Niektóre utleniacze uszkadzają tylko wybrane miejsca w cząsteczce, podczas gdy inne jak np. rodniki hydroksylowe prowadzą do wielu niespecyficznych reakcji utleniania. W wyniku reakcji utleniania powstają nadtlenki, które również nie są obojętne dla białka i mogą prowadzić do dalszych reakcji. Szczególnie istotne jest utlenianie metioniny w białkach przez szereg utleniaczy, np. powstający w wyniku utleniania metioniny sulfotlenek metioniny może być specyficznym markerem uszkodzenia oksydacyjnego.

Reakcje rodnikowe z udziałem aminokwasów występujących w białkach mogą prowadzić do uszkodzeń takich jak: agregacja, sieciowanie, fragmentacja, utrata własności enzymatycznych oraz do zmiany konformacji cząsteczek [7-9,13-15]. Degradacja białek zachodzi głównie pod wpływem stresu oksydacyjnego. Zmiany oksydacyjne w białkach są nieodłącznym efektem tlenowego metabolizmu komórkowego i mimo licznych układów ochronnych nie mogą zostać całkowicie wyeliminowane. Gromadzenie się utlenionych produktów białkowych upośledza funkcje komórki i może doprowadzić nawet do śmierci komórki [7-9]. Podczas stresu oksydacyjnego dochodzi do utlenienia komórkowych grup -SH bezpośrednio przez reaktywne formy tlenu (RFT): aniono rodnik ponadtlenkowy ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), nadtlenek wodoru ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) i rodnik hydroksylowy  $\text{OH}^\bullet$ . Produktem utlenienia grup -SH są wówczas rodniki tylowe  $\text{RS}^\bullet$ , które ulegają dimeryzacji do disulfidów. Reakcje te zachodzą według wzorów [7-9]:

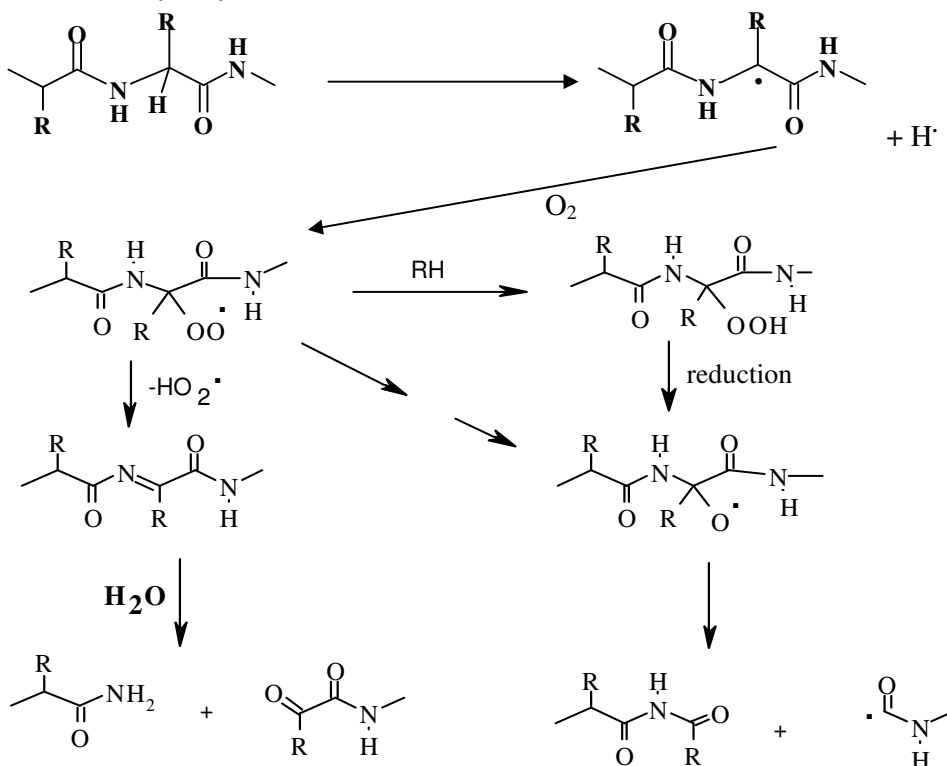


Projekt pn. „Wzmocnienie potencjału dydaktycznego UMK w Toruniu w dziedzinach matematyczno-przyrodniczych” realizowany w ramach Poddziałania 4.1.1 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki



Uszkodzenie oksydacyjne grup –SH powoduje szybką utratę aktywności biologicznej białka. Utlenianie grup tiolowych w błonach może doprowadzić do dezintegracji błon i zwiększenia ich przepuszczalności. Reakcje RFT z białkami prowadzą nie tylko do utleniania białek, ale także do powstawania w białkach grup redukujących. Grupy te mogą redukować cytochrom c i metale. Mogą one powstawać w wyniku uszkodzenia aminokwasów aromatycznych.

Szybkość reakcji nierodnikowych utleniaczy ze szkieletem białka nie jest zbyt duża i raczej prowadzi do zmian trudnych do zaobserwowania. Inaczej jest z reakcjami rodnikowych utleniaczy, które ze szkieletem białka reagują bardzo szybko, prowadząc głównie do oderwania atomu H w pozycji alfa (Rys.10). Rodnik ten jest stabilizowany przez elektrony grupy karbonylowej. Powstałe rodniki na atomie węgla alfa mogą reagować z tlenem lub innymi rodnikami obecnymi w układzie. W reakcji z tlenem powstają rodniki nadtlenkowe (Rys. 10). Może zajść reakcja eliminacji z uwolnieniem  $\text{HO}_2^\bullet$  i powstawaniem iminy, która podlega dalej reakcji hydrolizy prowadząc do fragmentacji łańcucha. Alternatywnie może nastąpić oderwanie atomu H z innego związku prowadząc do powstawania wodoronadtlenku. Rozkład wodoronadtlenków na rodniki prowadzi do fragmentacji szkieletu białka poprzez rodnik alkoksylowy.

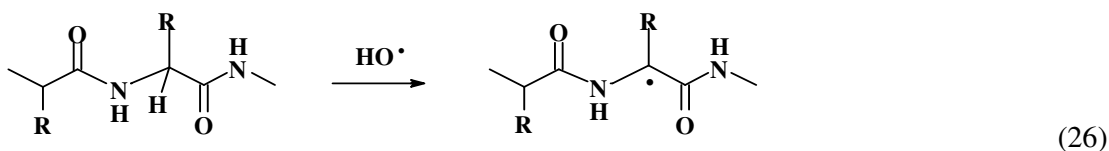


Rys. 10. Reakcje rodnika na atomie węgla alfa w łańcuchu białka

Projekt pn. „Wzmocnienie potencjału dydaktycznego UMK w Toruniu w dziedzinach matematyczno-przyrodniczych”  
realizowany w ramach Poddziałania 4.1.1 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki

Większość uszkodzeń w białkach jest nie do naprawienia i prowadzi do dalszych konsekwencji związanych ze zmianą w strukturze, a co za tym idzie zmianą właściwości biologicznych i dezaktywacji białka. Akumulacja utlenionych form białka może prowadzić do szeregu patologii w organizmach żywych.

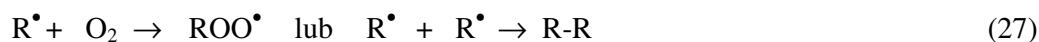
Oderwanie atomu wodoru w pozycji alfa może nastąpić w wyniku reakcji z rodnikami  $\cdot\text{OH}$ . Prowadzi to również do fragmentacji, czyli rozerwania łańcucha głównego białka.



Reakcje rodnikowe w łańcuchach bocznych białka mogą prowadzić do:

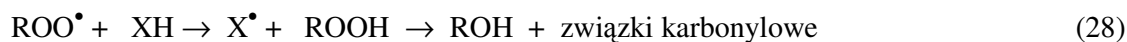
- oderwania atomu wodoru, głównie z łańcuchów alifatycznych,
- addycji, głównie z udziałem pierścieni aromatycznych, powstają zmienione łańcuchy boczne (reakcje te zostały omówione wcześniej dla poszczególnych aminokwasów aromatycznych),
- powstawania rodników nadtlenkowych w obecności tlenu.

Powstający rodnik na atomie węgla reaguje szybko z  $\text{O}_2$  dając rodniki nadtlenkowe. W warunkach bez udziału tlenu tworzą się dimery.



Dalsze reakcje rodników nadtlenkowych:

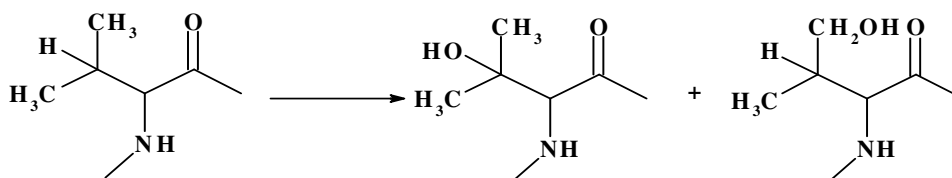
- Reakcja z innymi rodnikami nadtlenkowymi do  $\text{ROO-OOX}$  ( $\text{X} = \text{R}, \text{H}$ ).
- Oderwanie atomu wodoru – prowadzi do wodoronadtlenków:



Reakcje eliminacji zachodzą głównie w przypadku seryny (Ser) i treoniny (Thr) oraz niektórych innych aminokwasów.



Głównymi produktami reakcji rodnikowych w łańcuchach bocznych są: nadtlenki, alkohole i związki karbonylowe.



Rys. 11. Schemat utleniania przez wolne rodniki w łańcuchu bocznym waliny

Projekt pn. „Wzmocnienie potencjału dydaktycznego UMK w Toruniu w dziedzinach matematyczno-przyrodniczych” realizowany w ramach Poddziałania 4.1.1 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki

Czynniki redukujące, takie jak uwodniony elektron czy inne silne reduktory mogą prowadzić do przyłączenia elektronu do grupy karbonylowej wiązania peptydowego. Trwałe i nietrwałe produkty utleniania aminokwasów, peptydów i białek przedstawia tabela 2 i 3.

Tabela 2. Trwałe i nietrwałe produkty utleniania aminokwasów alifatycznych i aminokwasów zawierających atom siarki w łańcuchu bocznym [7]

Aminokwas	Produkt
Kwas glutaminowy	Wodoronadtlenki (nietrwałe)
Leucyna	Wodoronadtlenki (nietrwałe), alkohole alfa-ketokwasy. związki karbonylowe
Glicyna	Kwas aminomalonowy
Valina	Wodoronadtlenki (nietrwałe)
Lizyna	Alkohole, związki karbonylowe
Prolina	Wodoronadtlenki (nietrwałe), alkohole Kwas hydroksyaminowalerianowy Związki karbonylowe
Metionina	Sulfotlenki metioniny, sulfony metioniny
Cysteina	Cystyna (disiarczek cysteiny), oksokwasy, sulfonamidy

Tabela 3. Trwałe i nietrwałe produkty utleniania aminokwasów aromatycznych [7]

Aminokwas	Produkt
Fenylalanina	Orto-tyrozyna i meta-tyrozyna Tyrozyna
Tyrozyna	3,4-dihydroksyfenylalanina (DOPA) (nietrwałe) Dityrozyna (dimer C-C i dimer (C-O)) Nitrotyrozyna Alkohole
Tryptofan	N-formylokynureina Kynureina 5-hydroksytryptofan alkohol
Histydyna	2-oksohistydyna Hydronadtlenki Alkohole związki karbonylowe

Projekt pn. „Wzmocnienie potencjału dydaktycznego UMK w Toruniu w dziedzinach matematyczno-przyrodniczych”  
realizowany w ramach Poddziałania 4.1.1 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki

Obecnie jest wiele dowodów naukowych na to, że uszkodzenia rodnikowe w białkach mogą być przenoszone do innych układów biologicznych. Szczególnie dotyczy to reakcji z udziałem metioniny [8,16]. Rodniki tiolowe są zdolne do oderwania atomu wodoru przy węglu alfa. Doniesienia naukowe wskazują również na przeniesienie uszkodzeń z jednego łańcucha bocznego do innego, szczególnie dotyczy to układów łatwo ulegających reakcji oksydacji, np. Trp, Tyr, His, Cys i Met. Początkowa oksydacja metioniny poprzez rodniki hydroksylowe prowadzi do fragmentacji N-końcowych reszt seryny Ser i treoniny Thr w wyniku międzycząsteczkowego przeniesienia atomu wodoru.

Reakcje utleniania w białkach prowadzą do szeregu konsekwencji:

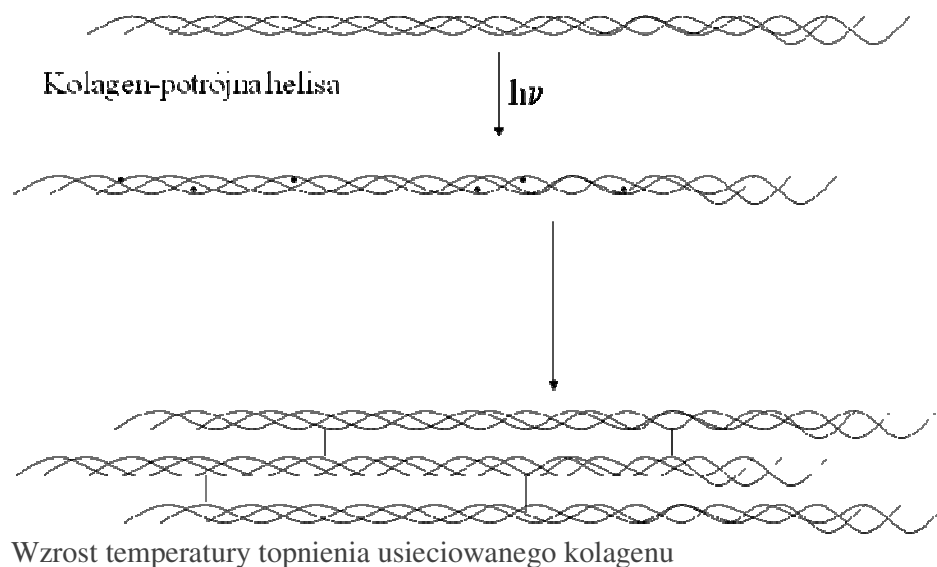
- Fragmentacja i dimeryzacja
- Agregacja

Sieciowanie zachodzi poprzez rodnikową dimeryzację rodników tyrozylowych (fenoksylowe rodniki tyrozyny).

Zmiany konformacyjne w białkach

Reakcje utleniania w białkach mogą prowadzić do zmian konformacyjnych, które w konsekwencji sprawiają, że białko nie będzie w stanie pełnić swoich funkcji biologicznych. Jeżeli zmiany zachodzą w łańcuchach bocznych może dodatkowo dodatkowo dojść do hydrofobizacji białka, np. deaminacji reszt lizyny. Dodatkowo utworzone grupy hydrofilowe w wyniku utleniania mogą prowadzić do nadmiernego oddziaływania między nimi, co w rezultacie doprowadzi do zmiany konformacji białka.

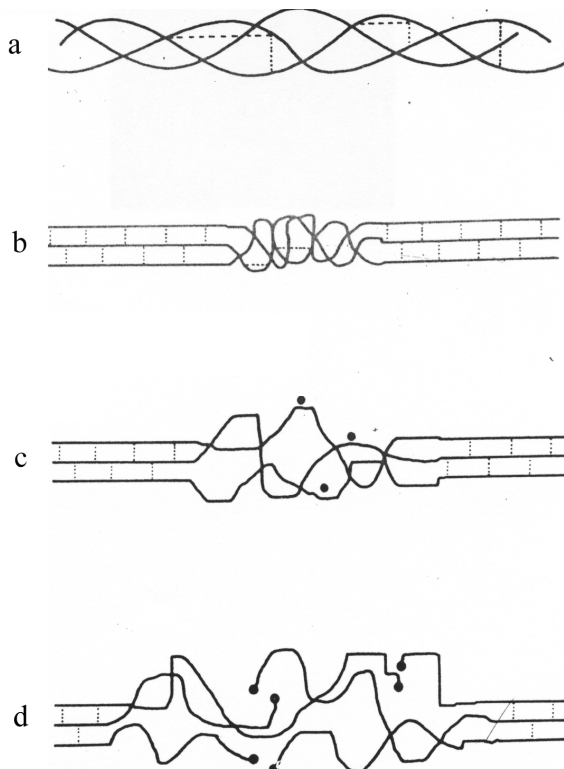
Rodnikowe zmiany w strukturze kolagenu oraz sieciowanie kolagenu przedstawia rysunek 12 i 13.



Rys. 12. Rodnikowe sieciowanie kolagenu



Projekt pn. „Wzmocnienie potencjału dydaktycznego UMK w Toruniu w dziedzinach matematyczno-przyrodniczych”  
realizowany w ramach Poddziałania 4.1.1 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki



Rys.13. Fotochemiczna degradacja kolagenu: a) potrójna helisa kolagenowa utrzymywana poprzez wiązania wodorowe; b) zniszczone częściowo wiązania wodorowe i początek zwijania się struktury; c) powstawanie wolnych rodników i dalsze niszczenie wiązań wodorowych; d) rozrywanie wiązań peptydowych prowadzące do degradacji łańcuchów kolagenu

Zmiany konformacyjne w kolagenie manifestowane są poprzez spadek lepkości roztworów kolagenowych, poprzez obniżenie temperatury denaturacji i poprzez zmianę skręcalności optycznej. W wyniku degradacji rodnikowej zmienia się również masa cząsteczkowa kolagenu. Sieciowanie kolagenu przejawia się wzrostem temperatury denaturacji oraz zmniejszeniem się rozpuszczalności białka.

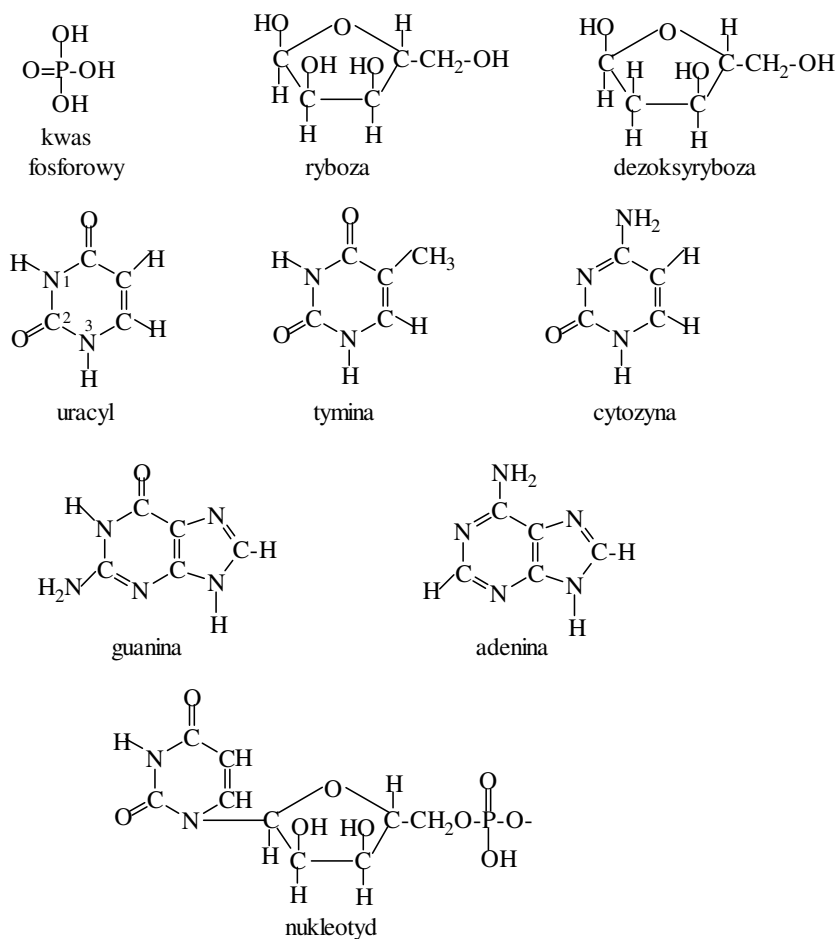
## 17. Reakcje rodnikowe w kwasach nukleinowych

Kwas nukleinowy jest biopolimerem, w którym jednostką powtarzającą się jest nukleotyd. Każdy nukleotyd zbudowany z kwasu fosforowego (P), cukru rybozy lub dezoksyrybozy (R), zasady pirymidynowej: tyminy (T), cytozyny (C) lub uracylu (U) oraz zasady purynowej: guaniny (G) lub adeniny (A). Struktury zasad purynowych i pirymidynowych przedstawia rysunek 14. Nukleotydy połączone są ze sobą w długi łańcuch polinukleotydowy.

Projekt pn. „Wzmocnienie potencjału dydaktycznego UMK w Toruniu w dziedzinach matematyczno-przyrodniczych”  
realizowany w ramach Poddziałania 4.1.1 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki

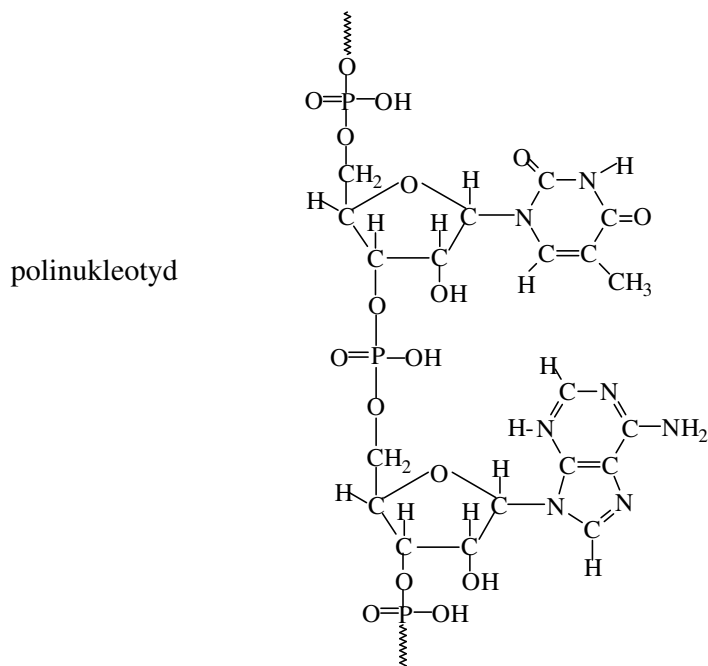
Kwas fosforowy z cukrem tworzą łańcuch, w którym zasada jest bocznym podstawnikiem. Te trzy składniki tworzą nukleotyd. Nukleotydy łączą się ze sobą tworząc łańcuch polinukleotydowy (Rys. 15).

Dwa takie łańcuchy biegnące równolegle tworzą strukturę spiralną (tzw. podwójna spirala), którą utrzymują wiązania wodorowe między występującymi w obu łańcuchach zasadami purynową i pirymidynową.



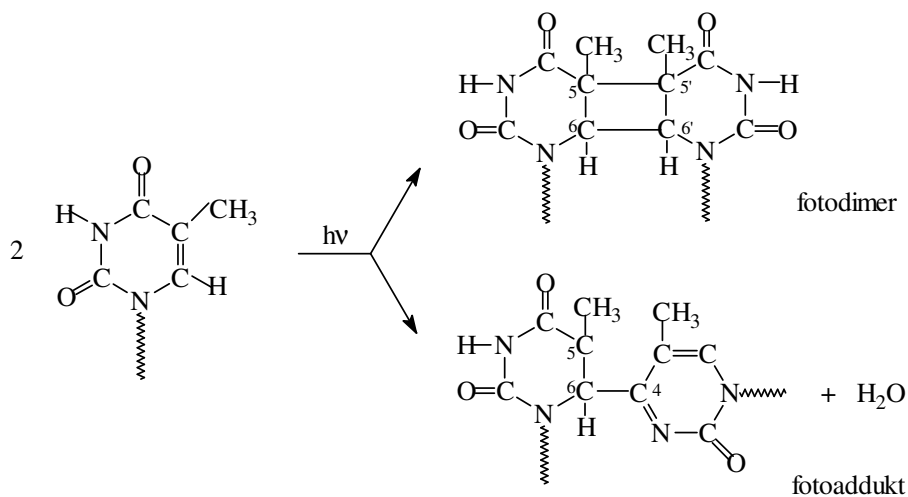
Rys. 14. Struktura chemiczna zasad azotowych wchodzących w skład kwasów nukleinowych oraz struktura przykładowego nukleotydu

Projekt pn. „Wzmocnienie potencjału dydaktycznego UMK w Toruniu w dziedzinach matematyczno-przyrodniczych”  
realizowany w ramach Poddziałania 4.1.1 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki



Rys. 15. Struktura polinukleotydu

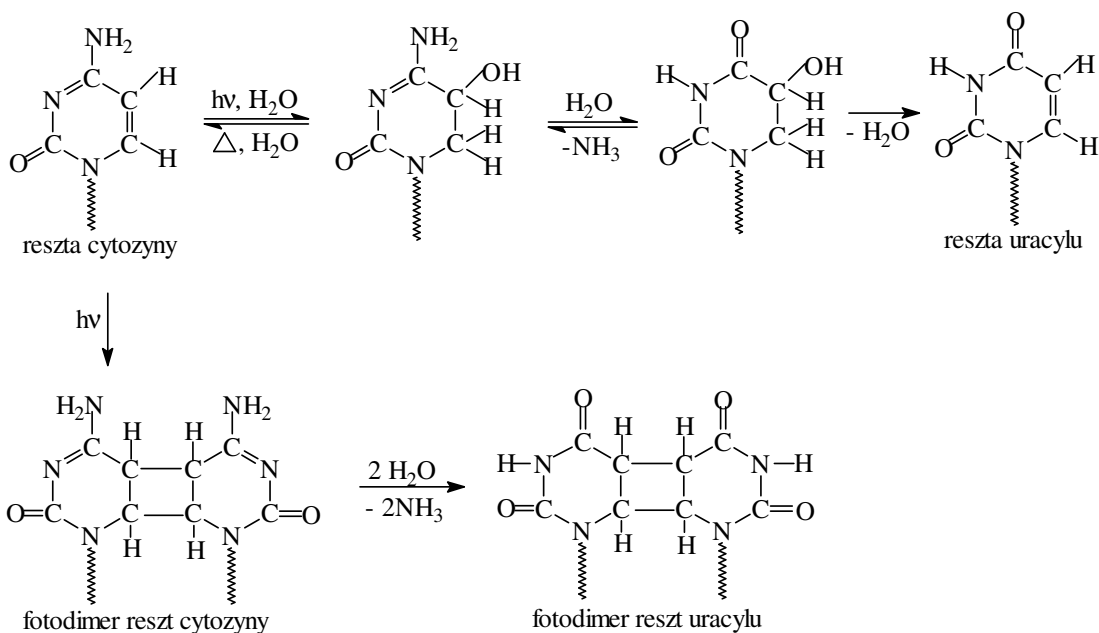
Najsilniejszymi chromoforami są w kwasach nukleinowych zasady pirymidowe. Maksimum ich absorpcji występuje przy 260-265 nm. Najważniejszą reakcją fotochemiczną w DNA jest dimeryzacja reszt tyminy poprzez atomy węgla 5, 6 oraz tworzenie trwałych adduktów poprzez 6 i 4 atom C.



Rys. 16. Dimeryzacja reszt tyminy spowodowana promieniowaniem UV

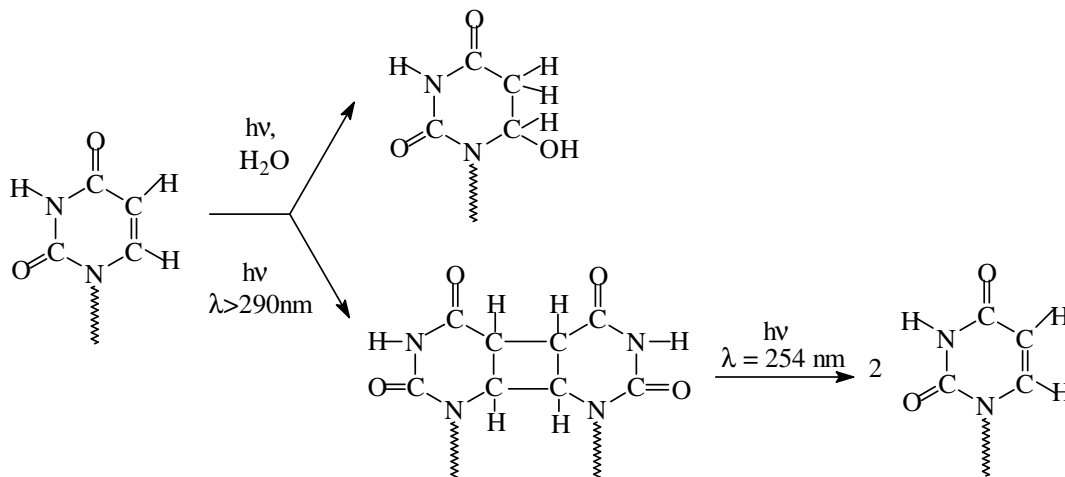
Projekt pn. „Wzmocnienie potencjału dydaktycznego UMK w Toruniu w dziedzinach matematyczno-przyrodniczych” realizowany w ramach Poddziałania 4.1.1 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki

Reszta cytozyny tworzy podobny addukt. Może też przyłączać cząsteczkę wody, którą traci w ciemności ale też w obecności wody ulega deaminacji, a po utracie wody przyjmuje budowę uracylu. Przemiana ta prowadzi do mutacji w DNA. Uracyl bowiem w DNA nie występuje. Jest to zasada wchodząca w skład RNA.



Rys. 17. Dimeryzacja reszt cytozyny spowodowana promieniowaniem UV

Reszty cytozyny mogą dimeryzować. Powstały dimer jest nietrwały. W obecności wody ulega deaminacji i przekształca się w fotodimer reszt uracylowych. Reszty uracylu po wzbudzeniu fotochemicznym ulegają fotohydratacji i dimeryzacji.



Rys. 18. Dimeryzacja i fotohydratacja reszt cytozyny spowodowana promieniowaniem UV

Projekt pn. „Wzmocnienie potencjału dydaktycznego UMK w Toruniu w dziedzinach matematyczno-przyrodniczych” realizowany w ramach Poddziałania 4.1.1 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki

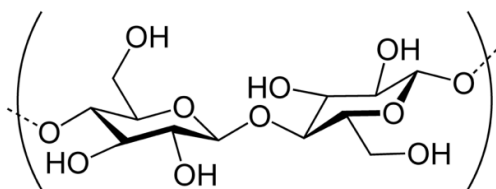
Fotodimery reszt uracylu i tyminy są związkami stabilnymi ale pod wpływem promieniowania o  $\lambda = 254$  nm rozpadają się na wyjściowe monomery.

Wzbudzone reszty zasad purynowych w minimalnym stopniu biorą udział w wyżej przedstawionych przemianach fotochemicznych. W związku z tym nie mają większego znaczenia biologicznego [19-21].

Większość głównych uszkodzeń rodnikowych w DNA jest przenoszona i naprawiana, jednak niektóre zmiany mogą akumulować się w komórkach prowadząc do uszkodzeń i zmian genetycznych [21].

## 18. Reakcje rodnikowe w polisacharydach

Do jednych z bardziej rozpowszechnionych w przyrodzie polisacharydów należą skrobia, glikogen i celuloza gromadzone odpowiednio w nasionach, wątrobie i występujące w drewnie. Zbudowane są z  $\beta$ -D(+) glukozy, której cząsteczki łączą się wiązaniami glikozydowymi powstającymi pomiędzy 1 i 4 atomem węgla kolejnych jednostek monomerycznych polimeru. Różnią się masą cząsteczkową, długością łańcucha i jego kształtem. Są to łańcuchy proste jak w celulozie i części skrobi – amylozie oraz rozgałęzione jak w amylopektynie (wchodzącej w skład skrobi) i glikogenie. Strukturę celulozy przedstawia rysunek 19.

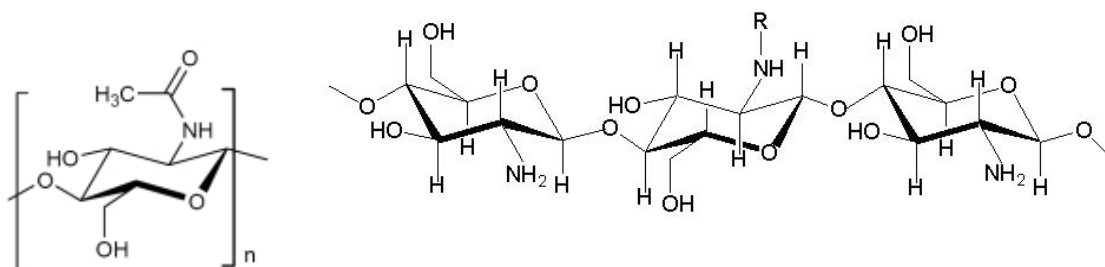


Rys. 19. Struktura celulozy

Niektóre polisacharydy zawierają w strukturze również grupy aminowe, jak np. chitina i chitozan (Rys. 20). Wiązania glikozydowe i grupy acetalowe absorbują promieniowanie o  $\lambda \sim 260$  nm. Zaabsorbowane promieniowanie może prowadzić do powstawania wolnych rodników i postępującej fotodegradacji. Wydajność tego procesu zależy od warunków takich jak obecność powietrza, wilgoci, czy zanieczyszczeń. W czasie fotodegradacji ulegają

Projekt pn. „Wzmocnienie potencjału dydaktycznego UMK w Toruniu w dziedzinach matematyczno-przyrodniczych”  
realizowany w ramach Poddziałania 4.1.1 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki

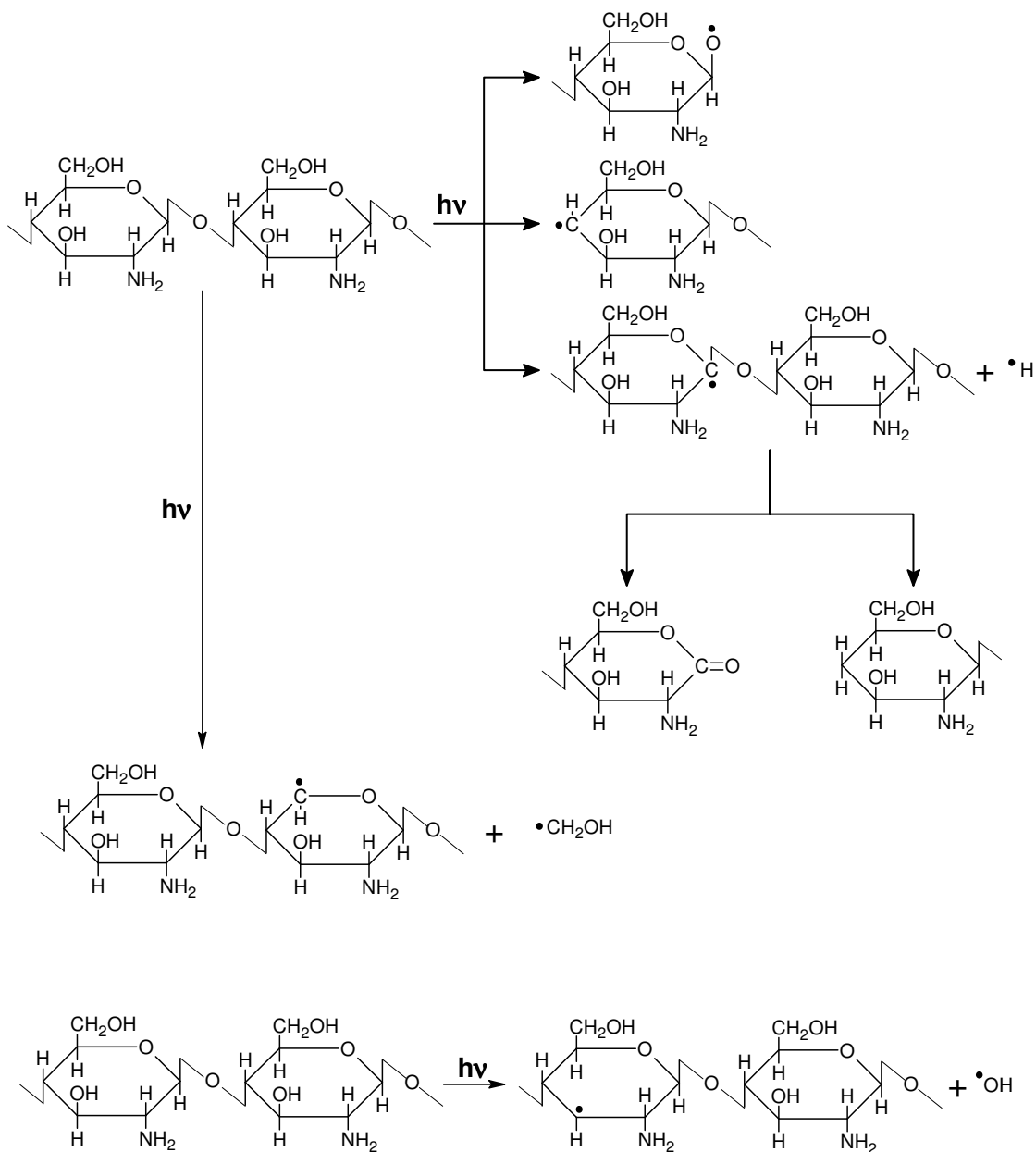
rozerwaniu wiązania glikozydowe, może też zachodzić dehydrogenacja, dehydroksylacja przy 2, 3 lub 6 atomie węgla lub dehydroksymetylacja z rozerwaniem wiązania między 5 i 6 atomem węgla, a także rozerwanie pierścienia glukozy między 2 i 3 atomem węgla. W wyniku wyżej wymienionych reakcji powstają rodniki  $H^\bullet$ ,  $\bullet OH$ ,  $\bullet CH_2OH$  i makrorodniki o różnej budowie. W reakcjach wtórnych makrorodniki ulegają rekombinacji, a przy dostępie powietrza mogą tworzyć makrorodniki nadtlenkowe, które poprzez hydroksynadtlenki i ich rozkład prowadzą do fotodegradacji oksydacyjnej. W obecności wilgoci proces ten zachodzi z większą wydajnością, gdyż wpływa ona (w semikrystalicznej strukturze celulozy) na zmianę stosunku fazy krystalicznej do amorficznej, na korzyść tej ostatniej. Jest ona, w przeciwieństwie do fazy krystalicznej, dostępna i łatwiej przenikalna dla promieniowania UV jak też i tlenu. Również drobne zanieczyszczenia oraz produkty utlenienia tego polisacharydu mają wpływ na przebieg procesów fotodegradacyjnych celulozy [11,22].



Rys. 20. Struktura chityny i chitozanu

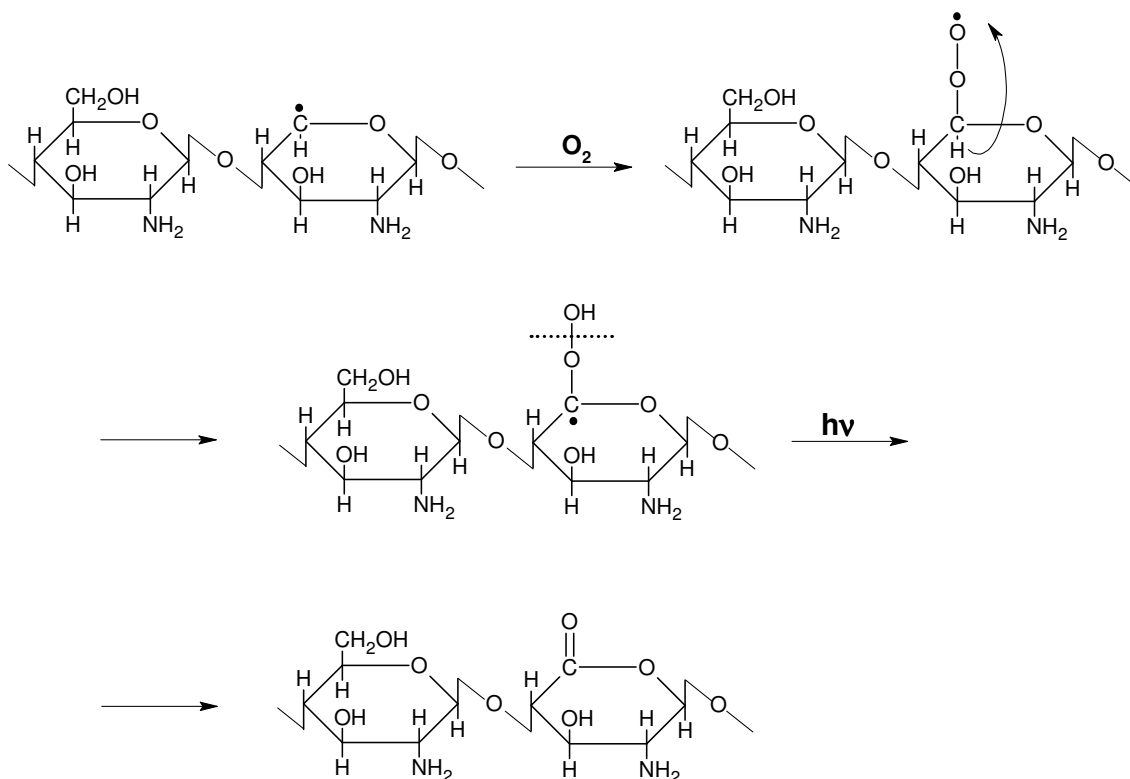
Przebieg rodnikowej degradacji chitozanu przedstawiono na rysunku 21. W czasie fotodegradacji ulegają rozerwaniu wiązania glikozydowe. Może też zachodzić dehydrogenacja lub dehydroksylacja. Mogą powstawać ruchliwe rodniki wodorowe i hydroksylowe. W obecności tlenu zachodzi reakcja fotochemicznego utleniania (Rys. 22).

Projekt pn. „Wzmocnienie potencjału dydaktycznego UMK w Toruniu w dziedzinach matematyczno-przyrodniczych”  
realizowany w ramach Poddziałania 4.1.1 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki



Rys. 21. Mechanizm fotodegradacji chitozanu pod wpływem promieniowania UV [23]

Projekt pn. „Wzmocnienie potencjału dydaktycznego UMK w Toruniu w dziedzinach matematyczno-przyrodniczych”  
realizowany w ramach Poddziałania 4.1.1 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki



Rys. 22. Mechanizm fotodegradacji chitozanu w obecności tlenu [23]

## 19. Reakcje rodnikowe w lipidach

Lipidy to duża grupa związków nierozpuszczalnych w wodzie, ale rozpuszczalnych w związkach o charakterze hydrofobowym. Najbardziej rozpowszechnionymi w tej grupie związków są triglicerydy, czyli estry gliceryny z kwasami tłuszczowymi, nasyconymi lub nienasyconymi. Występują dość licznie w organizmach żywych, zatem są narażone na działanie wolnych rodników. Szczególnie duże znaczenie przypisuje się wolnym rodnikom w procesie peroksydacji lipidów (*lipid peroxidation LPO*). Jest to wolnorodnikowy proces utleniania nienasyconych kwasów tłuszczowych lub innych lipidów, w którym powstają nadtlenki tych związków [24]. Peroksydacja lipidów przebiega w trzech etapach:

- inicjacji,
- propagacji,
- terminacji.

Inicjacja peroksydacji lipidów polega na oderwaniu atomu wodoru od cząsteczki wielonienasyconego kwasu tłuszczowego lub reszty tego kwasu wchodzącej w skład fosfolipidu, głównego składnika budulcowego błon komórkowych. Zawarte w błonach komórkowych nienasycone kwasy tłuszczowe łatwo poddają się atakowi wolnych rodników.



Projekt pn. „Wzmocnienie potencjału dydaktycznego UMK w Toruniu w dziedzinach matematyczno-przyrodniczych”  
realizowany w ramach Poddziałania 4.1.1 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki

Peroksydacja lipidów może być zapoczątkowana przez rodnik hydroksylowy ( $\cdot\text{OH}$ ), oraz rodniki: nadtlenkowy ( $\text{LOO}\cdot$ ), alkoksylowy ( $\text{LO}\cdot$ ) lub alkiłowy ( $\text{L}\cdot$ ) [24]. Peroksydacja lipidów może też być zainicjowana przez ozon, tlenek i dwutlenek azotu, a także dwutlenki siarki i chloran (I). Podczas reakcji propagacji wolne rodniki alkiłowe ( $\text{L}\cdot$ ) reagują z tlenem i tworzą wolne rodniki nadtlenkowe  $\text{LOO}\cdot$  (reakcja 30). Te z kolei mogą odrywać atomy wodoru od kolejnych cząsteczek wielonienasyconych kwasów tłuszczowych LH (reakcja 31). W tej reakcji wolny rodnik nie ginie, ale reaguje z następną cząsteczkę kwasu tłuszczowego:



Cykl ten powtarza się wielokrotnie, do momentu reakcji terminacji. Reakcja ta może zachodzić pomiędzy dwoma wolnymi rodnikami alkiłowymi, nadtlenkowymi czy dwoma różnymi rodnikami, które występują w tym układzie. Produktami reakcji w błonach biologicznych są najczęściej dimery fosfolipidów. Peroksydacja lipidów w komórce następuje w błonach zawierających również białka, a wolne rodniki powstające podczas peroksydacji mogą też reagować z tymi białkami. Wolne rodniki białkowe uczestniczą w reakcjach terminacji i tworzą połączenia białkowo-lipidowe. Dalsze przemiany produktów utleniania lipidów zachodzą m.in. na drodze eliminacji, co prowadzi do rozpadu reszt wielonienasyconych kwasów tłuszczowych i powstania mniejszych fragmentów. Jednym z produktów degradacji utleniającej lipidów jest dialdehyd malonowy. Poza tym związkami powstają również inne aldehydy i hydroksyaldehydy (4-hydroksyalkenale, 2-alkenale, hepta-2,4-dienal, 5-hydroksyoktanal). Stężenie aldehydów w tkankach rośnie pod wpływem zwiększonego wytwarzania reaktywnych form tlenu RFT. Aldehydy, które powstają podczas peroksydacji lipidów mogą powodować fragmentację łańcucha DNA, są cytotoksyczne, działają mutagennie i kancerogennie [25].

Produkty utleniania lipidów modyfikują właściwości fizyczne błon komórkowych prowadząc do zwiększonej przepuszczalności błon dla jonów  $\text{H}^+$  i polarnych substancji. Zmniejsza się różnica potencjałów elektrycznych po obydwu stronach dwuwarstwy lipidowej. Peroksydacja lipidów powoduje również zahamowanie aktywności niektórych enzymów błonowych i białek transportujących.

Etapy reakcji rodnikowych w wielonienasyconych kwasach tłuszczowych można przedstawić następująco:

(1) Inicjacja w wielonienasyconych kwasach tłuszczowych (*polyunsaturated fatty acid* - PUFA) poprzez rodnik łańcucha  $\text{R}\cdot$ ,  $\text{RO}_2\cdot$  lub  $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ , prowadzi do powstania rodnika lipidu, który dalej może reagować z tlenem:



(2) Propagacja; czyli powstały rodnik nadtlenkowy generuje oderwanie atomu wodoru od innej cząsteczki wielonienasyconego kwasu tłuszczowego:



Projekt pn. „Wzmocnienie potencjału dydaktycznego UMK w Toruniu w dziedzinach matematyczno-przyrodniczych”  
realizowany w ramach Poddziałania 4.1.1 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki

Powstały rodnik PUFA<sup>•</sup> może reagować z tlenem prowadząc do kumulacji zmian oraz do nierodnikowych produktów (NRP).

(3) Terminacja;



## 20. Fotostarzenie i produkty promieniotwórcze

Starzenie się jest naturalnym, fizjologicznym procesem charakteryzującym wszystkie żywe organizmy. Jest to proces nieunikniony i w dużej mierze zaprogramowany genetycznie. Ze względu na to, że 60-70% masy ciała to woda, to właśnie zmiana jej zawartości wpływa na proces starzenia. Starzenie się to zmniejszenie zawartości wody w tkankach organizmu, ich odwodnienie, osłabienie komórkowej przemiany materii, prowadzące do stopniowego obumierania komórek. Plasma komórkowa młodego człowieka jest bardzo uwodniona, ma płynną konsystencję. W procesie starzenia następuje jej zagęszczenie, przybiera formę kleistego żelu tracącego właściwości wodochłonne. Zwalnia się proces przemiany materii na skutek osłabienia wymiany międzykomórkowej polegającej na pobieraniu substancji pokarmowych i wydalaniu zbędnych produktów powstałych w wyniku metabolizmu. Krew dociera z większą trudnością do tkanek, dostarczając mniej substancji odżywczych, co prowadzi do ich zwyrodnienia. Zaburzenia krążenia krwi powodują zaburzenia regulacji cieplnej i ochronnej, osłabiona jest naturalna odporność organizmu.

Czynniki przyspieszające proces starzenia

Wszystkie szkodliwe zmiany spowodowane zarówno przez czynniki endo- jak i egzogenne mogą wpływać na strukturę DNA i funkcjonowanie komórki.

Do szkodliwych czynników zalicza się: a) wolne rodniki, b) tlen singletowy.

Zgodnie z rodnikową teorią starzenia czynniki te przyczyniają się do:

- powstawania zmarszczek
- wysychania skóry
- zmniejszenia jędrności skóry.

Proces naturalnego starzenia przyspiesza szkodliwe działanie promieni słonecznych. Naturalną ochronę przed promieniowaniem UV zapewnia skórze naturalny pigment, melanina. Im większa zawartość melaniny w skórze, tym większa ochrona przed szkodliwym promieniowaniem słonecznym, a właściwie przed jego szkodliwym składnikiem, promieniowaniem nadfioletowym.

Światło nadfioletowe (ultrafioletowe, UV) stanowi część energii słonecznej o znacznej energii i długości fali w zakresie od około 220 do 400 nm, które jest progiem zakresu długości fal dla światła widzialnego.. Słoneczne spektrum UV jest podzielone na trzy regiony: region UVA od 320 do 400 nm, UVB od 290 do 320 nm oraz UVC (<290 nm). Energia promieniowania nadfioletowego pochodzącego ze słońca powoduje symptomy poparzeń słonecznych, wśród których można wymienić zaczerwienienia, ból, porażenia, pęcherze,

Projekt pn. „Wzmocnienie potencjału dydaktycznego UMK w Toruniu w dziedzinach matematyczno-przyrodniczych” realizowany w ramach Poddziałania 4.1.1 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki

opuchnięcia, i ewentualnie łuszczenie skóry. Energia promieniowania UV może generować nowotwory skóry i fotostarzenie się skóry oraz zmiany w kolorze i strukturze włosów. Skóra i włosy powinny być chronione przed szkodliwym działaniem promieniowania słonecznego. Szczególnie skóra powinna być chroniona przed poparzeniami słonecznymi nazywanymi erythema (aczkolwiek erythema jest tylko „zaczernionym” składnikiem poparzenia słonecznego). Promieniowanie słoneczne zawiera więcej promieniowania UVA niż UVB. Jednak krótsza długość fali promieniowania UVB (290–320 nm) powoduje znacznie większe uszkodzenia niż UVA o falach dłuższych (320–400 nm) [26].

#### Składniki środków przeciwsłonecznych

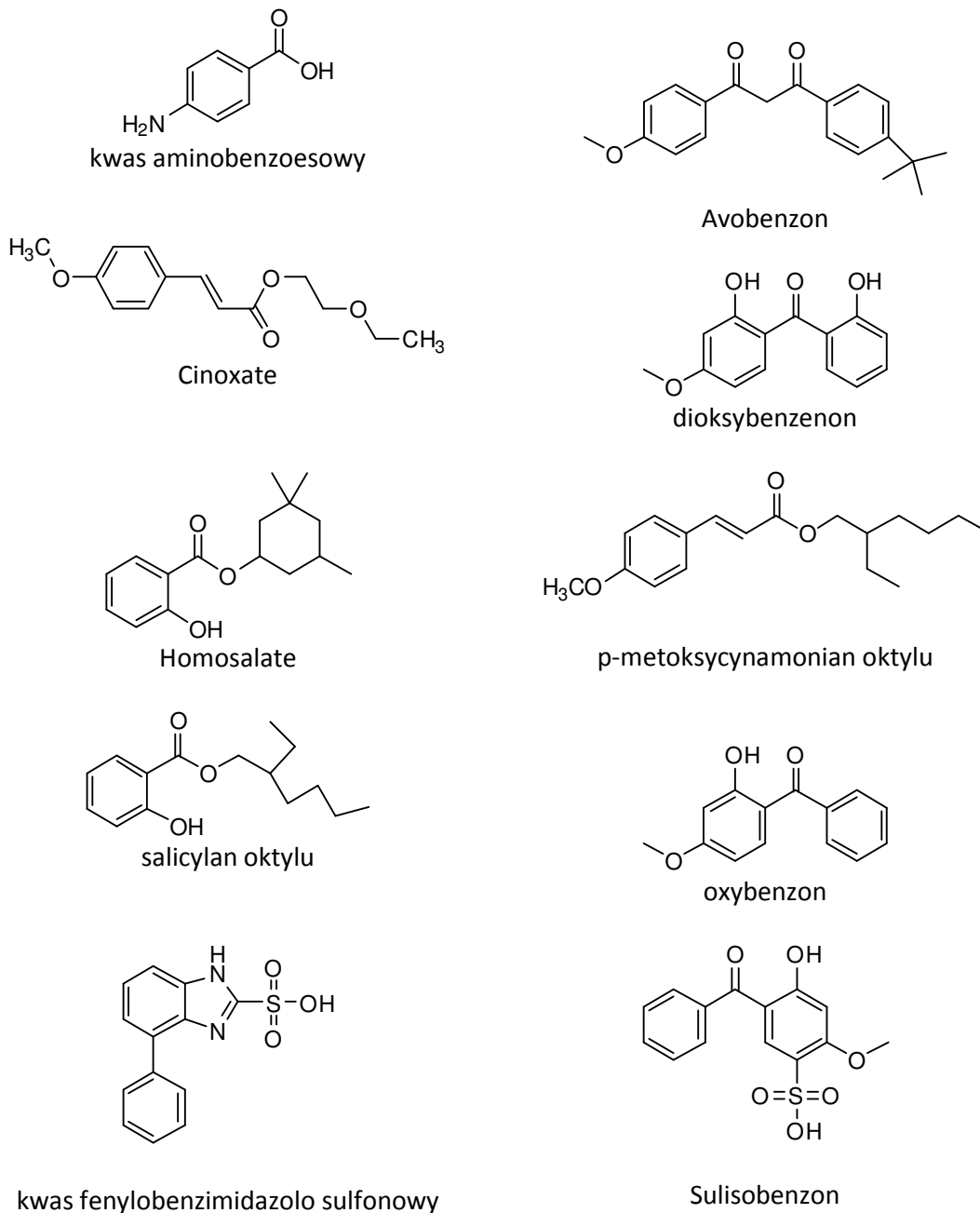
Składnikami środków przeciwsłonecznych są związki chemiczne, które absorbują lub rozpraszają padające promieniowanie. W ten sposób energia jest osłabiana zanim zacznie penetrować skórę. Użycie związków chemicznych w preparatach przeciwsłonecznych podlega odpowiednim regulacjom. Wiadomo, że absorpcja promieniowania zależy od struktury chemicznej związku. Z tego względu składniki czułe na działanie UV mogą absorbować tylko określone długości fali promieniowania.

Tabela 4. Składniki aktywne preparatów przeciwsłonecznych i ich dozwolone stężenie w produkcie [7,26]

Składnik	Maksymalne dozwolone stężenie [%]
Kwas aminobenzoesowy	15
Avobenzon	3
Cinoxate	3
Dioxybenzon	3
Homosalate	15
Metoxycinamonian oktylu	7.5
Salicylan oktylu	5
Oxybenzon	6
Phenylbenzimidazole sulfonic acid	4
Sulisobenzone	10
Ditlenek tytanu	25
Ditlenek cynku	25

W preparatach kosmetycznych chroniących przed szerokim spektrum promieniowania UV stosuje się kombinację kilku czynników aktywnych. Przykłady takich związków podano poniżej.

Projekt pn. „Wzmocnienie potencjału dydaktycznego UMK w Toruniu w dziedzinach matematyczno-przyrodniczych”  
realizowany w ramach Poddziałania 4.1.1 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki



Rys. 23. Przykłady związków chemicznych stosowanych do wyrobu filtrów słonecznych

Stężenie środka przeciwsłonecznego jest regulowane prawnie. Tabela 4 przedstawia przykłady dopuszczonych stężeń wybranych środków przeciwsłonecznych.

Projekt pn. „Wzmocnienie potencjału dydaktycznego UMK w Toruniu w dziedzinach matematyczno-przyrodniczych”  
realizowany w ramach Poddziałania 4.1.1 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki

### Faktor ochrony przeciwsłonecznej (*Sun protection factor SPF*)

Faktor ochrony przeciwsłonecznej (SPF) jest stopniem w jakim produkt promieniochronny ochrania skórę przeciw poparzeniu słonecznemu (*erythema*). SPF jest stosunkiem (współczynnikiem) minimalnej dawki powodującej oparzenia (*minimal erythema dose MED*) na skórze ludzkiej chronionej przez filtr przeciwsłoneczny do dawki MED bez obecności filtra. Minimalna dawka powodująca oparzenia MED to najmniejsza dawka energii UV powodująca wyraźnie odgraniczone oparzenie. Produkty rynkowe mają wartość SPF od 2 do co najmniej 60 (SPF stosunek MED z preparatem ochronnym do MED bez preparatu). Na przykład filtr z faktorem 2 przepuszcza 50% energii powodującej oparzenia, natomiast z SPF 15 przepuszcza 6.7%. Filtr z SPF równym 50 tylko 2%.

SPF jest głównie miarą protekcji przeciw UVB, ponieważ SPF jest miarą ochrony filtra przeciwsłonecznego przed oparzeniem, a oparzenia są powodowane przez UVB. Szacowanie ochrony przed UVA jest problematyczne ponieważ promieniowanie słoneczne jest zawsze mieszaniną UVA i UVB. Z tego powodu działanie długofalowego UVA jest maskowane efektami bardziej energetycznego promieniowania UVB.

## 21. Wolne rodniki jako przyczyny chorób

Aktywne formy tlenu generowane jako produkty uboczne przemian metabolicznych lub pochodzące ze środowiska (np. w wyniku działania czynników chemicznych czy promieniowania UV) są czynnikami biorącymi udział w wielu schorzeniach, takich jak: arteroskleroza, nowotwory, degeneracja tkanki łącznej. Oprócz tego aktywne formy tlenu biorą udział w procesach starzenia. Żywe komórki zaadaptowały się do reagowania na stres oksydacyjny poprzez system antyutleniaczy zarówno enzymatycznych (np. dysmutaza nadtlenkowa) jak i nieenzymatycznych (np. glutation). Oprócz tego endogennego systemu ochronnego komórki angażują do walki ze stresem oksydacyjnym również egzogenne antyutleniacze. Działają one głównie na zasadzie dostarczania atomu wodoru i zdolności przechwytywania wolnych rodników (np. witamina C czy E, flawonoidy).

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. W warunkach fizjologicznych procesy te znajdują się pod ścisłą kontrolą organizmu, jak wspomniano powyżej, w wyniku działania szeregu enzymatycznych i nieenzymatycznych mechanizmów ochronnych. 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 białeczki 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

Projekt pn. „Wzmocnienie potencjału dydaktycznego UMK w Toruniu w dziedzinach matematyczno-przyrodniczych”  
realizowany w ramach Poddziałania 4.1.1 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki

strukturze DNA prowadzące do mutacji lub efektów cytotoksycznych itp. Główną rolę odgrywają tutaj rodniki pochodzenia tlenowego:  $^1\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^{\bullet-}$  ( $\text{HO}_2^{\bullet}$ ),  $^{\bullet}\text{OH}$  oraz  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Ze względu na ogromną reaktywność rodnika  $^{\bullet}\text{OH}$  szczególnie interesująca jest jego rola w tych procesach. Rodnik ten reaguje z większością biocząsteczek ze stałymi szybkości  $k(^{\bullet}\text{OH} + \text{A})$  rzędu  $10^9 - 10^{10} \text{ dm}^3\text{mol}^{-1}\text{s}^{-1}$ , stąd jego czas życia w matrycy biologicznej jest bardzo krótki ( $\sim 1 \text{ ns}$ ). Reakcje rodnika  $^{\bullet}\text{OH}$  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. 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).

Następstwem stresu oksydacyjnego, przy braku sprawnie działających mechanizmów naprawczych komórki, jest utlenianie błon komórkowych, zmiana struktury oraz modyfikacja funkcji białek, uszkodzanie DNA. Przyczyniają się do powstania mutacji, co może inicjować rozwój chorób nowotworowych. Stres oksydacyjny jest ważnym czynnikiem w patogenezie wielu chorób, m.in. układu krążenia, płuc, oczu, zapalenia wątroby, zapalenia trzustki, cukrzycy, chorób degeneracyjnych układu nerwowego. Reaktywne formy tlenu w istotny sposób przyczyniają się do przyspieszenia procesów starzenia, akumulacji produktów oksydacyjnych uszkodzeń, odgrywają istotną rolę w procesach tworzenia się nowotworów [27].

Jednym z następstw stresu oksydacyjnego jest zmniejszenie stężenia ATP w komórce. Prowadzi to do m.in. uszkodzenia mitochondriów, hamowania glikolizy (głównie dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego), zwiększonego zużycie ATP. Konsekwencją stresu oksydacyjnego jest zmniejszenie stężenia glutationu (GSH), a zwiększenie stężenia jego formy utlenionej (GSSG). Wzmoczone uwalnianie GSSG z wątroby do krwi stanowi wskaźnik stresu oksydacyjnego [28]. Nasilone reakcje utleniania przyczyniają się do zwiększenia peroksydacji lipidów, a spadku GSH, co stymuluje wzrost aktywności enzymów kaskady przemian kwasu arachidonowego: cyklooksygenazy i lipooksygenazy, jak również powodują napływ jonów wapnia do komórki, co prowadzi do uszkodzenia błony komórkowej i jej receptorów.

Następstwem stresu oksydacyjnego jest zwiększenie przepuszczalności błony cytoplazmatycznej oraz uszkodzenie jądrowego i mitochondrialnego DNA (mtDNA). Jednym z procesów, w którym istotną rolę odgrywają reaktywne formy tlenu (ROS) jest zjawisko apoptozy, czyli programowanej śmierci komórki [28]. ROS powodują uszkodzenie komórki inicjujące apoptozę lub są sygnałem do jej inicjacji – co wynika z obniżenia aktywności mechanizmów antyoksydacyjnych. Nastęstwem apoptozy jest m.in. zwiększenie przepuszczalności wewnętrznej błony mitochondrialnej i redystrybucja cytochromu c z

Projekt pn. „Wzmocnienie potencjału dydaktycznego UMK w Toruniu w dziedzinach matematyczno-przyrodniczych”  
realizowany w ramach Poddziałania 4.1.1 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki

mitochondriów do frakcji cytozolowej [28]. W wyniku stresu oksydacyjnego dochodzi do peroksydacji lipidów, opisaną wcześniej w tym opracowaniu [28].

Jeśli w wyniku działania wolnych rodników i reaktywnych form tlenu dojdzie do powstania komórek nowotworowych, to sytuacja w organizmach żywych jest jeszcze bardziej skomplikowana. Z danych doświadczalnych wynika, że komórki nowotworowe mają znacznie obniżoną aktywność niektórych enzymów antyoksydacyjnych, w porównaniu z komórkami prawidłowymi. Mała aktywność dysmutazy ponadtlenkowej i katalazy może prowadzić do stresu oksydacyjnego, którego skutkiem są uszkodzenia DNA w komórkach nowotworowych [29]. Wykazano, że aktywność dysmutazy ponadtlenkowej jest zahamowana na skutek reakcji cząsteczek białka enzymatycznego z wolnymi rodnikami powstającymi zarówno w czasie metabolizmu etanolu, jak i acetaldehydu. Dotyczy to głównie rodnika hydroksylogowego, a także rodnika 1-hydroksyetylowego, których wytwarzanie jest związane z indukcją cytochromu P-450.

Szczególnie podatne na działanie wolnych rodników są aminokwasy aromatyczne i siarkowe w białkach, co pokazano w rozdziałach wcześniejszych. Badania wskazały, że to właśnie ocena zawartości grup tiolowych jest bardzo dobrym wskaźnikiem stresu oksydacyjnego [30]. Nastęstwem modyfikacji oksydacyjnej jest zmiana aktywności białek. Utlenienie grup tiolowych może prowadzić do zmiany struktury trzeciorzędowej lub agregacji białek. Najczęściej dochodzi do inaktywacji białka i wszystkich konsekwencji z tym związanych.

## 22. Metody badań reakcji rodnikowych w makrocząsteczkach pochodzenia biologicznego

Badanie reakcji rodnikowych w makrocząsteczkach pochodzenia biologicznego nie jest sprawą prostą. Wynika to ze skomplikowanej, często hierarchicznej budowy wielu białek, kwasów nukleinowych czy polisacharydów. Inaczej bada się zmiany w strukturze pierwszorzędowej białka niż w strukturze drugorzędowej czy strukturach wyższych rzędów. Również badanie poziomu stresu oksydacyjnego nie należy do prostych [31]. Aby ocenić aktywność przeciwutleniającą (AA – *Antioxidant Activity*) produktów zawierających antyutleniacze oznacza się całkowitą aktywność antyoksydacyjną (TAA – *Total Antioxidant Activity*), która jest sumą aktywności poszczególnych składników o charakterze antyoksydacyjnym. Można również oznaczać aktywność czystego składnika oddzielnie. Do oznaczania aktywności przeciwutleniającej stosuje się dwie kategorie metod polegających na:

1) redukcji jonów metali do jonów o niższym stopniu utlenienia przez badany antyoksydant, np. metoda FRAP (*ferric reducing ability of plasma*) i metoda CUPRAC:

- a) FRAP – redukcja jonu  $\text{Fe}^{+3} \rightarrow \text{Fe}^{+2}$
- b) CUPRAC – redukcja jonu  $\text{Cu}^{+2} \rightarrow \text{Cu}^{+1}$

2) zmiatanie wolnych, stabilnych rodników, np.: metody ABTS<sup>+</sup> i DPPH:

- a) ABTS<sup>+</sup> – wolny rodnik wytwarzany przed analizą z soli amonowej kwasu 2,2-azino-bis(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonowego
- b) DPPH – wolny trwały rodnik, 1,1-difenylo-2-pikrylohydrazyl (wzór 2, część I).

Projekt pn. „Wzmocnienie potencjału dydaktycznego UMK w Toruniu w dziedzinach matematyczno-przyrodniczych”  
realizowany w ramach Poddziałania 4.1.1 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki

Najczęściej do badań zaabsorbowanego promieniowania stosuje się spektrofotometrię w zakresie UV-Vis oraz fluorescencję. Do oceny zmian w strukturze makrocząsteczek stosuje się spektroskopię w podczerwieni, metody mikroskopowe, wiskozymetryczne, chromatograficzne i inne. Najtrudniej bada się krótkożyjące produkty przejściowe, rodniki i rodnikojony [32].

Spektroskopia elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR, ang. *Electronic Paramagnetic Resonance*) jest jedyną znaną dotychczas techniką pomiarową pozwalającą badać bezpośrednio układy (w tym układy biologiczne) zawierające wolne rodniki. Zjawisko rezonansu paramagnetycznego występuje w układach zawierających niesparowane elektrony. Niesparowane elektrony występują w wielu związkach chemicznych, m.in. w:

- wolnych rodnikach
- jonorodnikach
- jonach metali przejściowych
- stanach tripletowych wzbudzonych cząsteczek, np.  $^3\text{O}_2$
- cząsteczkach obojętnych o niezamkniętych powłokach elektronowych, takich jak NO czy  $\text{NO}_2$ .

Indywidualnie występują zarówno w układach nieożywionych jak i biologicznych. Występują one zarówno na poziomie biopolimerów:

- metaloproteiny
- flawoproteiny
- melaniny

jak i jako pośrednie produkty przemian biochemicznych takich jak:

- fotosynteza
- fosforylacja oksydacyjna
- metabolizm utleniająco-redukujący.

Do badania tych właśnie układów wykorzystuje się spektroskopię EPR. Technikę tę można również stosować do badania układów, w których normalnie nie występują centra paramagnetyczne. Wymaga to wprowadzenia ich sztucznie w postaci tzw. znaczników spinowych. Jako znaczniki spinowe stosuje się nieduże podstawniki lub cząsteczki posiadające trwałe centra paramagnetyczne. Metoda EPR została omówiona w części I.

Doskonałą metodą do oceny zmian w strukturze białka jest skaningowa kalorymetria różnicowa DSC. Pozwala ona ocenić zmiany w strukturze drugo- i trzeciorzędowej białka.

Inną metodą jest pomiar dichroizmu kołowego w makrocząsteczkach. Z wyników otrzymanych tą metodą można określić kształt makrocząsteczki.

Nowoczesnymi metodami, które są stosowane w badaniach czasu życia krótkożyjących związków chemicznych, w tym rodników i rodnikojonów są fotoliza błyskowa i radioliza impulsowa. Metody te zostały pokrótce opisane w rozdziałach następnych.

### 23. Fotoliza błyskowa

Fotoliza błyskowa jest jedną z metod, które pozwalają badać kinetykę i mechanizm szybkich reakcji chemicznych, w tym reakcji rodnikowych. Metoda ta polega na inicjowaniu reakcji krótkotrwałymi impulsami laserowymi (mikro-, nano-, piko-, femtosekundy) i badaniu



Projekt pn. „Wzmocnienie potencjału dydaktycznego UMK w Toruniu w dziedzinach matematyczno-przyrodniczych”  
realizowany w ramach Poddziałania 4.1.1 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki

(metodami optycznymi, np. absorpcja w zakresie UV-Vis) powstałych, szybko zanikających, produktów przejściowych. Lasery (Light amplification by stimulated emission of radiation) dają światło spójne, monochromatyczne o dużym natężeniu. Energia może być również dostarczona w postaci krótkotrwałego błysku światła widzialnego lub ultrafioletowego. W rezultacie pochłonięcia przez badany układ pewnej liczby kwantów światła zachodzą w nim mogą różnorodne procesy fizyczne i chemiczne, takie jak: wzbudzenie, jonizacja, dysocjacja cząsteczek, przegrupowanie wewnątrzcząsteczkowe itp. Powstałe szybko zanikające produkty przejściowe najczęściej rejestruje się za pomocą spektroskopii UV-Vis. Metoda ta pozwala na ustalenie rodzaju indywiduów krótkożyjących i ocenę czasu ich życia, na ustalenie mechanizmów reakcji rodnikowych, krótkożyjących indywiduów molekularnych (wolne rodniki i rodnikojony) zdolnych do reakcji np. uszkodzenia, tkanek i degradacji materiałów. Służy również do badania kinetyki reakcji rodnikowych [33].

Widma absorpcji dla krótkożyjących indywiduów nazywane są widmami przejściowymi. Wykorzystując zarejestrowane widma przejściowe z prawa Lamberta-Beera można wyliczyć stężenia odpowiednich związków pochłaniających światło.

Prawo Lamberta-Beera:

$$A = \varepsilon c l \quad (38)$$

gdzie:

- $A$  – absorbcja;
- $\varepsilon$  – molowy współczynnik absorpcji [ $\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ];
- $l$  – grubość warstwy absorbującej [cm];
- $c$  – stężenie substancji badanej [ $\text{mol dm}^{-3}$ ].

Szybkość reakcji ( $v$ ) jest miarą ilości zużytego substratu lub utworzonego produktu w czasie. Dla większości reakcji chemicznych prowadzonych w zamkniętym układzie można wyrazić ją wzorem:

$$v = \pm \frac{dc}{dt} \quad (39)$$

Jest to postać różniczkowa. Szybkość reakcji można też wyrazić za pomocą równania kinetycznego danej reakcji:

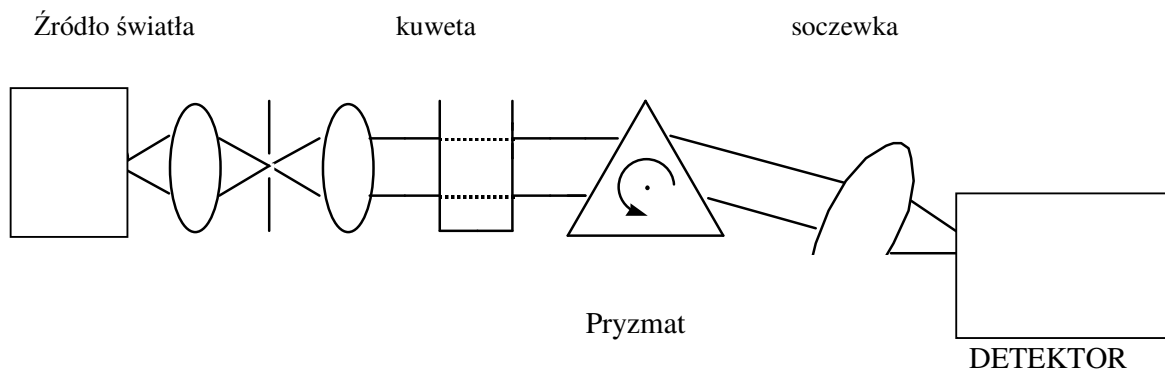
$$v = k[A]^a[B]^b[C]^c \dots \quad (40)$$

[A], [B], [C] są stężeniami reagentów a współczynniki  $a$ ,  $b$ ,  $c$  są wyznaczone eksperymentalnie (dla reakcji prostych w przybliżeniu równają się współczynnikom stechiometrycznym). Współczynnik proporcjonalności  $k$  w równaniu kinetycznym przyjęło nazywać się stałą szybkości reakcji. Sumę wykładników z równania kinetycznego nazywa się rzędem reakcji.

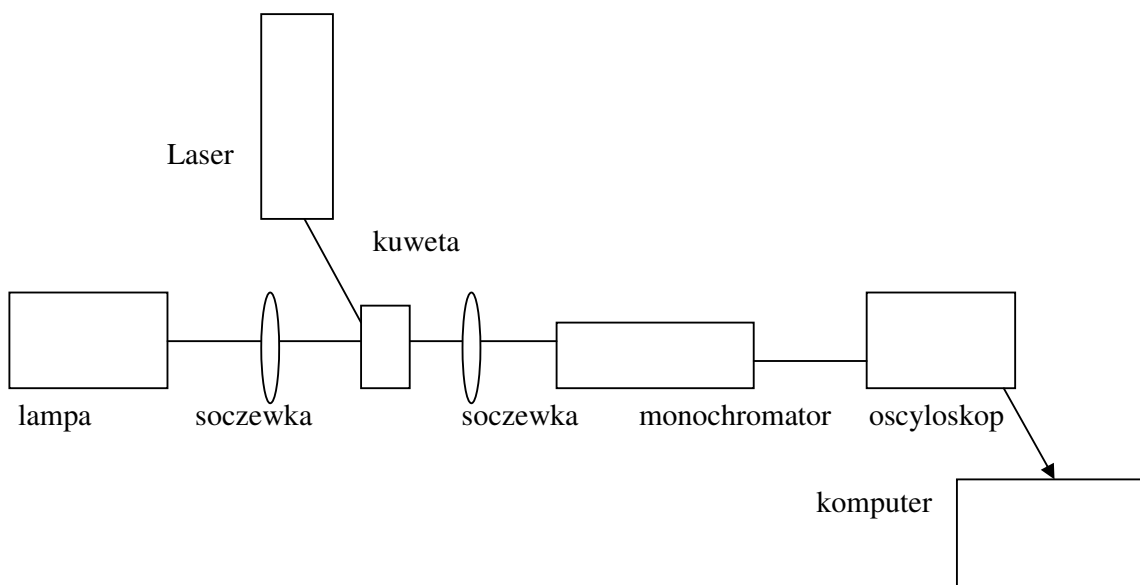
Projekt pn. „Wzmocnienie potencjału dydaktycznego UMK w Toruniu w dziedzinach matematyczno-przyrodniczych”  
realizowany w ramach Poddziałania 4.1.1 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki

$$n = a + b + c \quad (41)$$

Zestaw do pomiaru widm absorpcji przedstawia rysunek 24, natomiast zestaw do pomiaru absorpcji przejściowej przedstawia rysunek 25.



Rys. 24. Schemat spektrofotometru do rejestracji widm absorpcji



Rys. 25. Schemat zestawu do fotolizy błyskowej

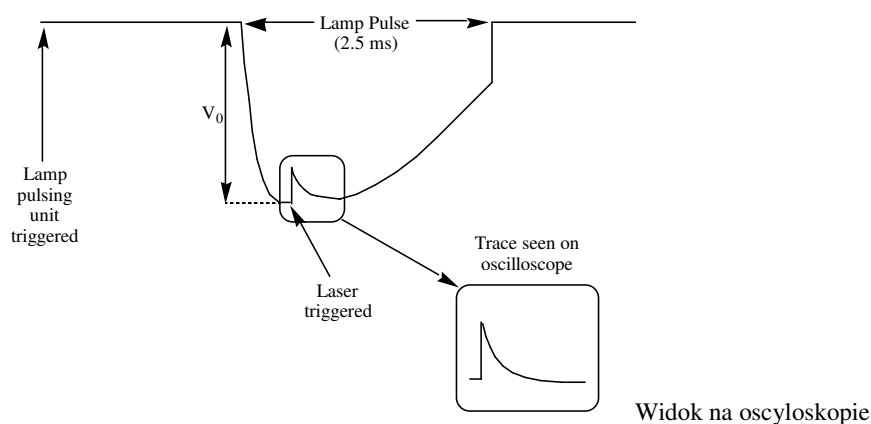
Projekt pn. „Wzmocnienie potencjału dydaktycznego UMK w Toruniu w dziedzinach matematyczno-przyrodniczych”  
realizowany w ramach Poddziałania 4.1.1 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki

W fotolizie błyskowej ważne jest aby impuls lasera był zsynchronizowany czasowo ze światłem analizującym lampy UV. Schemat czasowego załączania lasera nanosekundowego i lampy emitującej światło analizujące przedstawia rysunek 26. Dane otrzymane na ekranie oscyloskopu i komputera pokazują zmiany w intensywności światła przepuszczonego po impulsie laserowym. Zmiany absorbancji mogą być obliczone następująco:

Przed impulsem: 
$$A_1 = \log \frac{I_0}{I_t^0} \quad (42)$$

Po impulsie: 
$$A_2 = \log \frac{I_0}{I_t^x} \quad (43)$$

Gdzie  $A_1$  i  $A_2$  to absorbancja próbki przed impulsem i po impulsie,  $I_0$  to intensywność światła padającego,  $I_t^0$  oraz  $I_t^x$  są intensywnościami przed i w konkretnym czasie  $x$  po impulsie.



Rys. 26. Schemat czasowego załączania lasera nanosekundowego i lampy emitującej światło analizujące.

Obliczona różnica absorbancji:

$$\Delta A = A_2 - A_1 = \log \frac{I_0}{I_t^x} - \log \frac{I_0}{I_t^0} = \log \frac{I_t^0}{I_t^x} \quad (44)$$

Zgodnie z prawem Lamberta-Beer'a:

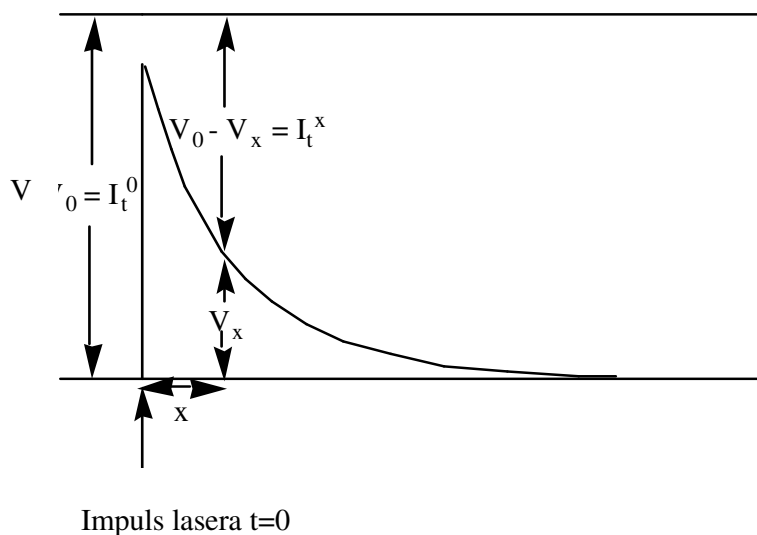
$$\log \frac{I_t^0}{I_t^x} = \Delta \epsilon [M^*]_x l \quad (45)$$

Gdzie  $\Delta \epsilon$  jest różnicą pomiędzy współczynnikiem absorpcji w stanie przejściowym i dla prekursora,  $[M^*]_x$  – stężenie w stanie przejściowym po czasie  $x$ ,  $l$  – droga światła przez próbkę.

Projekt pn. „Wzmocnienie potencjału dydaktycznego UMK w Toruniu w dziedzinach matematyczno-przyrodniczych” realizowany w ramach Poddziałania 4.1.1 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki

Napięcie przy wyłączonej lampie

Napięcie przy włączonej lampie



Rys. 27. Typowy przebieg zaniku absorpcji przejściowej w fotolizie błyskowej

Zmiany na oscyloskopie są rejestrowane jako zmiany napięcia (rysunek 27), dlatego też intensywność  $I_t^0$  jest rejestrowana jako  $V_0$  ( $V_0 \propto I_t^0$ ) i jest znacznie większa niż  $V_x$ , która jest proporcjonalna do zmiany intensywności światła spowodowanej przez absorpcję przejściową.

Zmiany absorbancji są obliczane następująco:

$$\Delta A = \log\left(\frac{V_0}{V_0 - V_x}\right) = \Delta \epsilon [M^*]_x l \quad (46)$$

Otrzymane widma przejściowe mogą być analizowane pod kątem kinetyki lub do budowania przejściowych widm różnicowych.

Obserwowane widma przejściowe pochodzą najczęściej od stanów wzbudzonych lub wolnych rodników. Pierwszorzędowa kinetyka zaniku najczęściej wskazuje na absorpcję przejściową stanów wzbudzonych, natomiast drugorzędowa wskazuje na absorpcję przejściową wolnych rodników.

W roztworach bez dostępu tlenu (odpowietrzonych) stany trypletowe znikają nieradiacyjnie zgodnie z kinetyką pierwszego rzędu:



$$\frac{d[{}^3M^*]}{dt} = -k_1 [{}^3M^*] \quad (48)$$

Gdzie  $k_1$  pierwszorzędowa stała zaniku  ${}^3M^*$ , oraz  $[{}^3M^*]_t$  jest stężeniem  ${}^3M^*$  po czasie  $t$ . To daje dalej:

Projekt pn. „Wzmocnienie potencjału dydaktycznego UMK w Toruniu w dziedzinach matematyczno-przyrodniczych” realizowany w ramach Poddziałania 4.1.1 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki

$$\ln [{}^3M^*] = \ln [{}^3M^*]_0 - k_1 t \quad (49)$$

Gdzie  $[{}^3M^*]_0$  jest początkowym stężeniem  ${}^3M^*$ .

Zmiana absorbancji ( $\Delta A_t$ ) jest proporcjonalna do stężenia  ${}^3M^*$ , stąd:

$$\ln \Delta A_t = \ln \Delta A_0 - k_1 t \quad (50)$$

Gdzie  $\Delta A_0$  jest różnicą w absorbancji bezpośrednio po impulsie. Zależność  $\ln \Delta A_t$  od  $t$  daje linię prostą ze współczynnikiem kierunkowym  $-k_1$ .

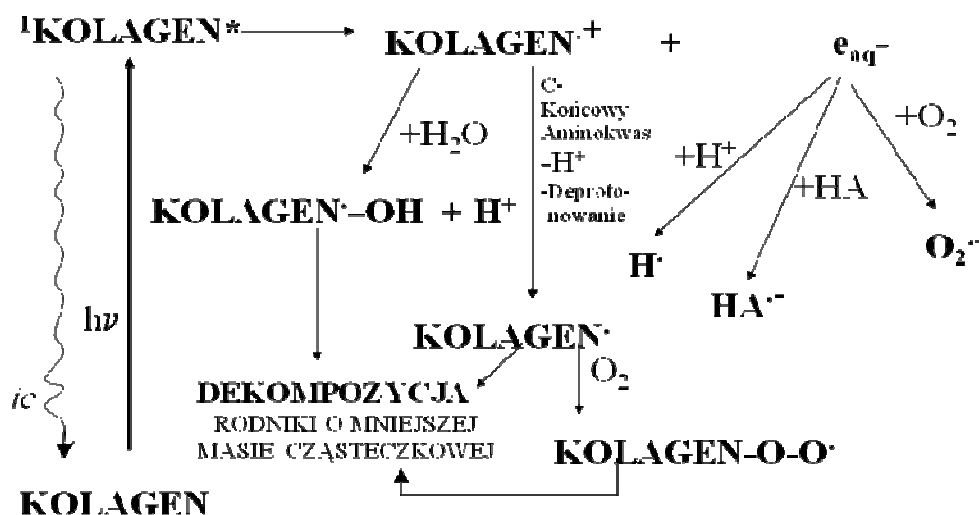
Program komputerowy używając metodę najmniejszych kwadratów oblicza wartości  $k_1$  i  $\Delta A_0$  z równania poniżej (przekształcone równanie wcześniejsze):

$$\Delta A_t = \Delta A_0 e^{-k_1 t} + \Delta A_\infty \quad (51)$$

W przypadku większej liczby widm przejściowych oblicza się sumę:

$$\Delta A_t = \sum_i \Delta A_i e^{-k_i t} \quad (52)$$

Fotoliza błyskowa jest dobrą metodą do ustalenia przebiegu reakcji rodnikowych w wielu związkach. Na podstawie wyników uzyskanych tą metodą można ustalać mechanizmy reakcji rodnikowych oraz wyznaczać stałe szybkości reakcji. Za pomocą fotolizy błyskowej ustalono mechanizmy reakcji rodnikowych w wielu białkach. Mechanizm reakcji zachodzących w roztworach wodnych kolagenu przedstawia rysunek poniżej [34]:



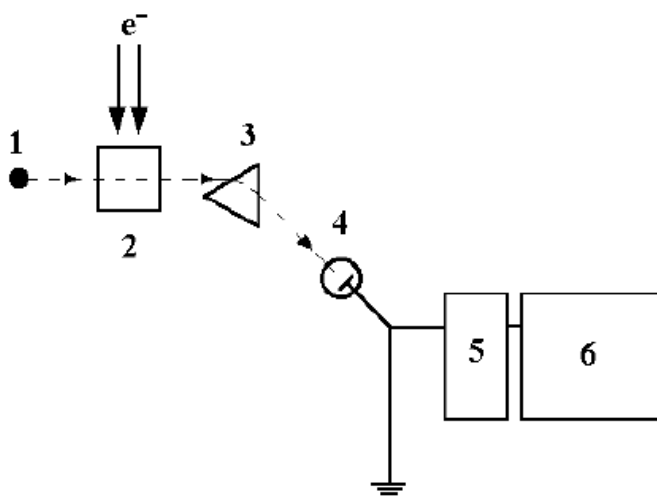
Rys. 28. Mechanizm reakcji rodnikowych zachodzących w roztworze kolagenu w kwasie octowym pod wpływem promieniowania laserowego powodującego fotojonizację [34]

Projekt pn. „Wzmocnienie potencjału dydaktycznego UMK w Toruniu w dziedzinach matematyczno-przyrodniczych” realizowany w ramach Poddziałania 4.1.1 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki

## 24. Radioliza impulsowa

Radioliza impulsowa jest techniką stosowaną w badaniach wykrywania nietrwałych produktów reakcji, w tym rodników i rodnikojonów. Metoda ta polega na poddaniu badanej próbki krótkotrwałym impulsom promieniowania elektronowego z akceleratora elektronów w celu wygenerowania rodników i rodnikojonów, a następnie detekcji metodami optycznymi (spektroskopia UV-ViS) produktów radiolizy. Pozwala ona na identyfikację krótkożyjących indywiduów chemicznych i śledzenie reakcji przebiegających w czasie rzędu nanosekund ( $10^{-9}$  s) a nawet krótszym [35].

W badaniach metodą radiolizy impulsowej reaktywne produkty pośrednie generowane są poprzez napromienienie badanego roztworu impulsem elektronowym wytwarzanym przez liniowy akcelerator elektronów lub poprzez promieniowanie generowane w Synchrotronach. Kuweta zawierająca badany roztwór umieszczana jest w miejscu, w którym wiązka elektronów przecina się z wiązką światła analizującego. Układ do radiolizy impulsowej składa się z dwóch głównych podukładów: układu wytwarzającego impuls elektronowy (akcelerator) oraz układu detekcji optycznej. Przedstawia to poniższy schemat:



Rys. 29. Uproszczony schemat układu do analizy impulsowej ( $e^-$  - wiązka przyspieszonych elektronów, 1- źródło światła analizującego, 2- kuweta z próbką, 3- monochromator, 4- fotopowielacz, 5- oscyloskop, 6- komputer)

Źródłem impulsów jonizujących jest najczęściej liniowy akcelerator elektronów. Akcelerator pozwala na formowanie impulsów elektronów o czasie trwania rzędu kilku ns do kilku  $\mu$ s. Przechodzące przez próbkę światło analizujące kierowane jest za pomocą układu soczewek i zwierciadeł na szczelinę wejściową monochromatora. Źródłem światła analizującego może być np. lampa ksenonowa. Przechodzące przez próbkę światło analizujące kierowane jest za

Projekt pn. „Wzmocnienie potencjału dydaktycznego UMK w Toruniu w dziedzinach matematyczno-przyrodniczych”  
realizowany w ramach Poddziałania 4.1.1 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki

pomocą układu soczewek i zwierciadeł na szczelinę wejściową monochromatora pryzmatycznego. Po wyjściu z monochromatora światło pada na katodę fotopowielacza. Sygnał z fotopowielacza rejestrowany jest za pomocą oscyloskopu. Do rejestracji i przetwarzania danych pomiarowych wykorzystuje się komputer sprzężony z oscyloskopem za pomocą interfejsu. Program obróbki danych wykonuje operację przeliczania wartości odczytywanych na absorpcję.

$$A = \log \frac{U_0}{U_0 - \Delta U} \quad (53)$$

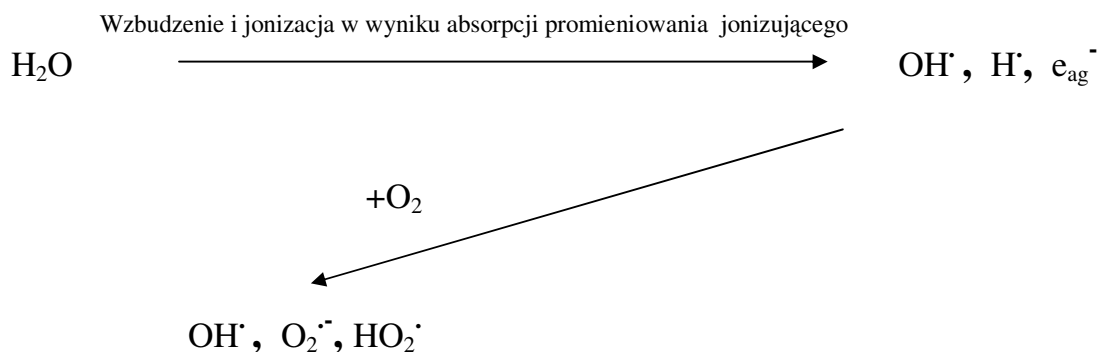
gdzie:

$U_0$  - wartość napięcia będącego miarą początkowego natężenia światła przechodzącego przez próbkę.

Wartość absorpcji jest powiązana z ilością wygenerowanego produktu znaną zależnością Lamberta-Beera (wzór 38).

Znajomość położenia pasma absorpcji, współczynnika  $\epsilon$  oraz zmian absorpcji w czasie pozwala na jakościową i ilościową interpretację widm.

W roztworach wodnych pod wpływem działania wiązki elektronów czy promieniowania jonizującego zachodzi proces radiolizy wody. Powstają w tym procesie rodniki, rodnikojony oraz uwodnione elektrony. Przedstawia to poniższy schemat:



Rys. 30. Schemat przedstawiający radiolizę wody

Powstające rodniki i rodnikojony są bardzo reaktywne i prowadzą do generowania innych rodników w układzie. 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.

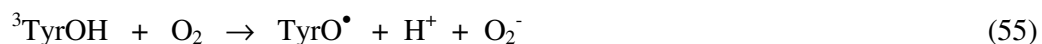
Projekt pn. „Wzmocnienie potencjału dydaktycznego UMK w Toruniu w dziedzinach matematyczno-przyrodniczych”  
realizowany w ramach Poddziałania 4.1.1 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki

Dopiero gdy ułamek molowy rozpuszczonego związku staje się porównywalny z ułamkiem molowym wody, w roztworze pojawiają się produkty bezpośredniej radiolizy związku rozpuszczonego. W wyniku radiolizy wody powstają obok siebie zarówno rodniki o właściwościach utleniających jak i redukujących, dlatego też badania prowadzi się w obecności różnego rodzaju zmiataczy, aby zapewnić środowisko wyłącznie utleniające lub wyłącznie redukujące. Na przykład w celu uzyskania środowiska silnie utleniającego stosuje się zmiatanie uwodnionego elektronu przez podtlenek azotu w reakcji



Metodą radiolizy impulsowej wykryto na przykład rodniki tyrozynowe w roztworach kolagenu naświetlanych promieniowaniem UV. W przypadku badanych roztworów kolagenowych w środowisku kwaśnym powstające w reakcji fotojonizacji uwodnione elektrony ulegają reakcji z jonami  $H^+$ , pochodzącymi z dysocjacji kwasu octowego. Powstałe w wyniku tej reakcji rodniki  $H^\bullet$  są bardzo ruchliwe i mogą inicjować szereg dalszych reakcji.

Z widm absorpcji przejściowej kolagenu wynika, że jako produkty przejściowe powstają krótkożyjące rodniki tyrozyłowe, natomiast stany trypletowe są wygaszane przez cząsteczki tlenu:



${}^3TyrOH$  może absorbować kolejny kwant energii:



Pod wpływem promieniowania UV w kolagencie mogą zachodzić następujące reakcje:



(KOL- Kolagen)

Metodami radiolizy impulsowej wyznaczono również stałe szybkości reakcji rodnika  $\cdot OH$  z różnymi makrocząsteczkami. Przedstawia je tabela 5.



Projekt pn. „Wzmocnienie potencjału dydaktycznego UMK w Toruniu w dziedzinach matematyczno-przyrodniczych” realizowany w ramach Poddziałania 4.1.1 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki

Tabela 5. Stałe szybkości reakcji rodnika  $\bullet\text{OH}$  z wybranymi makrocząsteczkami (pH ok. 7) [8,36].

Związek chemiczny	Stała szybkości ( $\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{s}^{-1}$ )
DNA	$8 \times 10^8$
RNA	$1 \times 10^9$
Kwas hialuronowy	$7 \times 10^8$
Kwas linoleinowy	$9 \times 10^9$
Kolagen	$4 \times 10^{11}$
Albumina	$8 \times 10^{10}$
Askorbinian	$1 \times 10^{10}$
GSH	$1.4 \times 10^{10}$
Trolox C (witamina E)	$6.9 \times 10^9$

## 25. Zmiatacze wolnych rodników w organizmach żywych. Antyutleniacze

Organizmy mające kontakt z tlenem wytworzyły różne mechanizmy obronne chroniące ich integralność przed działaniem wolnych rodników. Jednym z elementów takiego systemu jest odpowiednia organizacja strukturalna komórek, która umożliwia izolację miejsc, w których zachodzą reakcje z wytwarzaniem rodników jako produktów ubocznych [25].

Ważną rolę w ochronie przed rodnikami odgrywają różne mechanizmy metaboliczne. Podzielono je następująco [29,37,38]:

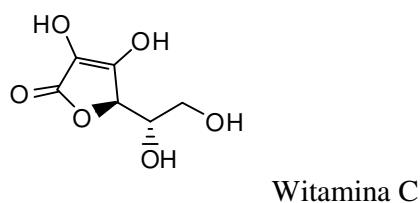
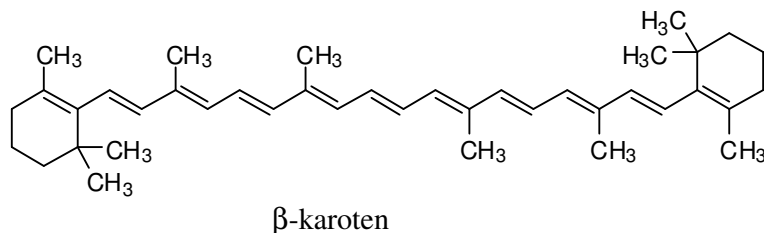
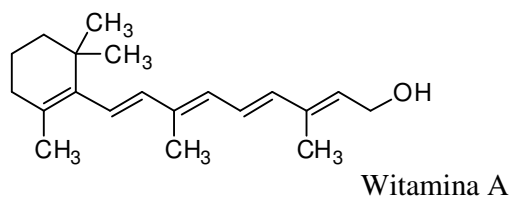
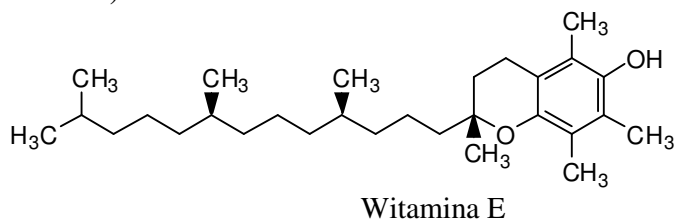
- Reakcje z udziałem związków wygaszających wzbudzone cząsteczki (karetonoidy, witamina E).
- Mechanizmy nieenzymatyczne: ceruloplazmina, transferyna, poliamidy, jony metali przejściowych, metalotioneiny.
- Mechanizmy enzymatyczne: dysmutaza ponadtlenkowa (SOD), katalazy (CT), peroksydaza glutationowa (GPx), reduktaza glutationowa (GRd), S-transferaza glutationu (GST) oraz grupa fosfolipaz wydzielniczych A2 (sPLA2).
- Reakcje z udziałem białek szoku cieplnego (HSP) – białka opiekuńcze i proteazy.

Usuwanie wolnych rodników odbywa się poprzez dwa mechanizmy:

1. System nieenzymatyczny, który tworzą substancje ochronne, które same przekazują wolnym rodnikom swoje elektrony, czyli przechodzą w postać utlenioną, która charakteryzuje się małą reaktywnością i tym samym uniemożliwiają utlenianie innych składników. Związki te określamy jako zmiatacze wolnych rodników. Reagują one z wolnymi rodnikami zabezpieczając komórki przed reakcjami wolnorodnikowymi. Wśród nich wyróżniamy związki egzogenne oraz endogenne. Do związków egzogennych należy m.in.:

Projekt pn. „Wzmocnienie potencjału dydaktycznego UMK w Toruniu w dziedzinach matematyczno-przyrodniczych”  
realizowany w ramach Poddziałania 4.1.1 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki

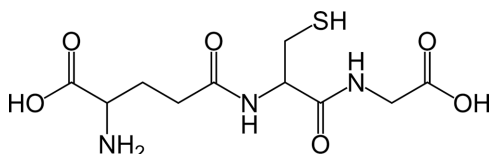
- Kwas askorbinowy (witamina C) – związek rozpuszczalny w wodzie, utleniając się chroni komórki przed atakiem wolnych rodników. Na ilość tego antyoksydanta ma wpływ wiele czynników, takich jak: dieta, styl życia, przebyte choroby, natężenie procesów metabolicznych.
- $\alpha$ -tokoferol (witamina E) – związek rozpuszczalny w tłuszczach, chroni przed utlenieniem błony komórkowe, lipidy i lipoproteiny oraz utrzymuje odpowiedni potencjał oksydoredukcyjny. Jego główna rola polega na zmiataniu wolnych rodników organicznych.
- Witamina i prowitamina A ( $\beta$ -karoten) –spełniają podobną rolę ochronną jak witamina E.  $\beta$ -karoten wykazuje zdolność usuwania tlenu singletowego i nadtlenków lipidów, chroniąc w ten sposób komórki m.in. przed nowotworami i starzeniem się organizmu.
- Koenzym Q10 (rozpuszczalny w tłuszczach) - ma zdolność regenerowania witaminy E i wzmacniania jej antyoksydacyjnej wydajności.
- Flawonoidy – związki występujące w roślinach.
- Kreatynina, neopteryna, melatonina, antocyjaniny, bilirubina, hormony płciowe (estron, estradiol).



Rys. 31. Struktury witamin pełniących funkcję antyutleniaczy

Projekt pn. „Wzmocnienie potencjału dydaktycznego UMK w Toruniu w dziedzinach matematyczno-przyrodniczych”  
realizowany w ramach Poddziałania 4.1.1 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki

Do związków endogennych należy zredukowany glutation (GSH) – tripeptyd zbudowany z kwasu glutaminowego, cysteiny i glicyny. Stanowi podstawowy wewnątrzkomórkowy mechanizm układu antyoksydacyjnego, chroniący komórki wątrobowe przed szkodliwym działaniem nadtlenków, toksyn oraz wolnych rodników. Ochrona odbywa się za pośrednictwem reakcji nieenzymatycznych lub katalizowanych przez S-transferazę glutationową. Jedną z przyczyn obniżenia stężenia GSH jest obniżenie jego syntezy. Szybkość syntezy glutationu zależy głównie od dostępności jego prekursorów – cysteiny i metioniny oraz aktywności enzymów biorących udział w jego syntezie, m.in. syntetazy glutamylcysteinowej i cystationazy. Oniżona synteza GSH wpływa na funkcjonowanie całego organizmu. Głównym źródłem glutationu dla krwi jest jego synteza w wątrobie.



Rys. 32. Struktura glutationu

Obniżenie stężenia GSH może być wynikiem jego zużycia w reakcjach z wolnymi rodnikami, wytworzonymi w nadmiernej ilości, czemu towarzyszy wzrost stężenia utlenionej formy glutationu (GSSG) oraz obniżenie potencjału utleniającego GSH/GSSG. Za główną przyczynę obniżenia się stosunku GSH/GSSG uważa się zmiany w aktywności enzymów biorących udział w metabolizmie glutationu [25,29].

System enzymatyczny tworzą wyspecjalizowane enzymy, które przeprowadzają reakcje usuwające wolne rodniki oraz zapobiegają ich powstawaniu (Rys. 33).

Do tych enzymów należy m.in.:

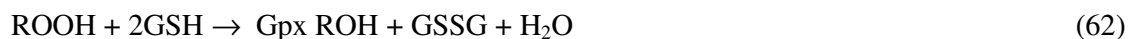
– dysmutaza ponadtlenkowa - SOD – enzym katalizujący reakcje rozkładu anionorodnika ponadtlenkowego do nadtlenku wodoru i tlenu cząsteczkowego:



SOD jest metaloenzymem i stanowi zasadniczy mechanizm obrony przeciwko toksycznemu oddziaływaniu nadtlenków w komórkach. Występuje w dwóch postaciach: wewnątrz- i zewnątrzkomórkowej. Bierze udział w redukcji nadtlenku wodoru do wody i przekształca zredukowany glutation w jego postać utlenioną, czyli w disulfid glutationu (GSSG):

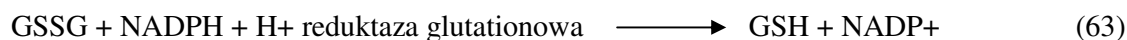


Redukuje również nadtlenki organiczne (np. nadtlenki lipidów) do alkoholi:

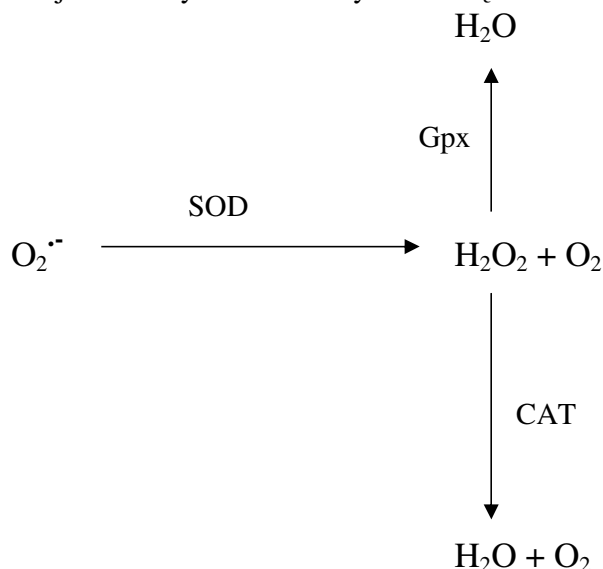


Projekt pn. „Wzmocnienie potencjału dydaktycznego UMK w Toruniu w dziedzinach matematyczno-przyrodniczych”  
realizowany w ramach Poddziałania 4.1.1 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki

Aby nie doszło do inaktywacji białek przez powstały GSSG, z peroksydazą glutationową współdziała reduktaza glutationowa, enzym odtwarzający zredukowaną formę glutationu kosztem utleniania NADPH:



lub jest on aktywnie usuwany na zewnątrz komórki kosztem energii zgromadzonej w ATP.



Rys. 33. Główne enzymy usuwające reaktywne formy tlenu

Zdolności antyoksydacyjne organizmu zależą również od zawartości i działania innych białek o właściwościach antyoksydacyjnych. Antyoksydanty prewencyjne zapobiegają wytwarzaniu się nowych reaktywnych form tlenu i zapobiegają peroksydacji lipidów. W osoczu krwi rolę tę pełnią m.in. ceruloplazmina, ferrytyna, transferyna, albumina – białka, które łączą się z uwolnionymi jonami metali przejściowych, np. miedzi i żelaza zawierającymi niesparowane elektrony, stanowiąc zabezpieczenie przed reakcjami wolnorodnikowymi. Właściwości antyoksydacyjne wykazuje także kwas moczowy, który wiąże jony metali i wychwytuje rodnik hydroksylowy.

Dysmutaza ponadtlenkowa (SOD), katalaza i peroksydaza glutationowa to enzymy katalizujące reakcję dysmutacji anionorodnika ponadtlenkowego [25]:



Dysmutaza ponadtlenkowa występuje w postaci wewnątrz- i zewnątrzkomórkowej. Postać wewnątrzkomórkowa ma formę mitochondrialną z manganem w centrum aktywnym (MnSOD) i cytoplazmatyczną z miedzią i cynkiem (Cu/Zn SOD). Postać

Projekt pn. „Wzmocnienie potencjału dydaktycznego UMK w Toruniu w dziedzinach matematyczno-przyrodniczych”  
realizowany w ramach Poddziałania 4.1.1 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki

zewnątrzkomórkowa (EC-SOD) rozkłada rodnik ponadtlenkowy w przestrzeni pozakomórkowej, dzięki czemu chroni powierzchnię naczyń przed działaniem rodnika ponadtlenkowego [25]. Istotną rolę w ochronie komórek przed produktami utleniania, czyli w procesie odtruwania organizmu, odgrywają S-transferazy glutationowe (EC 3.1.2.7). Jest to grupa enzymów drugiej fazy metabolizmu, która przeciwdziała procesom powstawania nowotworów. Enzymy te odgrywają znaczącą rolę w detoksykacji i redukcji reaktywnych form tlenu oraz ich produktów. Katalizują reakcje sprzęgania glutationu z różnymi związkami elektrofilowymi (w tym z ksenobiotykami).

Inną funkcją S-transferaz glutationowych w obronie przed reaktywnymi formami tlenu jest katalizowanie reakcji sprzęgania z glutationem aldehydowych produktów peroksydacji lipidów. Jedna z klas tych enzymów ma silne powinowactwo do 4-hydroksyalkenali [29]. Izoenzymy GST sklasyfikowano, jako alfa, pi oraz teta. Wykazują one różną dystrybucję i charakterystykę w poszczególnych tkankach. S-transferaza glutationu pi (GSTpi) odgrywa ważną rolę w procesach detoksykacji, chroniących komórki przed uszkodzeniem DNA, w tym także komórki nowotworowe przed toksycznością leków przeciwnowotworowych.

## Literatura:

- [1] A. Czajka, Wolne rodniki tlenowe a reakcje obronne organizmu, *Nowiny Lekarskie* 2006; 75: 582-586.
- [2] C.L. Hawkins, M. J. Davies, Generation and propagation of radical reactions on proteins, *Biochimica et Biophysica Acta* 2001; 1504: 196-219.
- [3] G. Bartosz, *Druga twarz tlenu*. PWN, Warszawa 2003.
- [4] L. Kłyszewko-Stefanowicz, *Mitochondria. Cytobiochemia*. PWN, Warszawa 1998, 579–622.
- [5] H.A. Headlam, M.J. Davies, Beta-scission of side-chain alkoxyl radicals on peptides and proteins results in the loss of side-chains as aldehydes and ketones, *Free Radical Biology & Medicine* 2002; 32: 1171–1184.
- [6] N.N. PUNCHARD, F.J. Kelly, *free Radicals-practical approach*, Oxford University Press 1996, 2-50.
- [7] M.J. Davies, Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2003; 305:761-770.
- [8] M.J. Davies, The oxidative environment and protein damage, *Biochimica et Biophysica Acta* 2005; 1703: 93– 109.
- [9] M. Gracanin, C.L. Hawkins, D.I. Pattison, M.J. Davies, Singlet-oxygen-mediated amino acid and protein oxidation: Formation of tryptophan peroxides and decomposition products, *Free Radical Biology & Medicine* 2009; 47: 92-102.

Projekt pn. „Wzmocnienie potencjału dydaktycznego UMK w Toruniu w dziedzinach matematyczno-przyrodniczych”  
realizowany w ramach Poddziałania 4.1.1 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki

- [10] E.R. Stadtman, Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions, *Annu. Rev. Biochem* 1993; 62: 797-821.
- [11] J. Pączkowski, (red), *Fotochemia polimerów. Teoria i zastosowanie*. Wydawnictwo Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, 2003.
- [12] K.J.A. Davies, M.E. Delsignore, Protein damage and degradation by oxygen radicals. III. Modification of secondary and tertiary structure. *J. Biol. Chem.* 1987; 262: 9908-9913.
- [13] K.J.A. Davies, Intracellular proteolytic systems may function as secondary antioxidant defenses: an hypothesis. *Free Rad. Biol. Med.* 1986; 2: 155-173.
- [14] K.J.A. Davies, Protein damage and degradation by oxygen radicals. I General aspect, *J. Biol. Chem.* 1987; 262: 9895-9901.
- [15] C.A. Miles, A. Sionkowska, S. L. Hulin, T.J. Sims, N.C. Avery, A.J. Bailey. Identification of an intermediate state in the helix-coil degradation of collagen by ultraviolet light. *Journal of Biological Chemistry* 2000; 275 (42) 33014-33019.
- [16] P. Morgan, R.T. Dean, M.J. Davies, Protective mechanisms against peptide and protein peroxides generated by singlet oxygen. *Free Radical Biology & Medicine*, 2004; 36: 484-496.
- [17] C.L. Hawkins, M.J. Davies, Oxidative damage to collagen and related substrates by metal ion/hydrogen peroxide systems: random attack or site-specific damage?, *Biochim. Biophys. Acta* 1997; 1360: 84-96.
- [18] A. Sionkowska, T. Wess, Mechanical properties of UV irradiated rat tail tendon (RTT) collagen, *International Journal of Biological Macromolecules*, 2004; 34: 9-12.
- [19] L. Celewicz, *Reakcje fotochemiczne pochodnych zasad pirymidynowych*, Wydawnictwo UAM, Poznań, 1999.
- [20] M. Valko, M. Izakovic, M. Mazur, C. J. Rhodes, J. Telsler, Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence, *Molecular and Cellular Biochemistry* 2004; 266: 37-56.
- [21] C. Chatgililoglu, P. O'Neill, Free radicals associated with DNA damage, *Experimental Gerontology* 2001; 36: 1459-1471.
- [22] B.C. Gilbert, D.M. King, C.B. Thomas, The oxidation of some polysaccharides by the hydroxyl radical: An e.s.r. investigation. *Carbohydrate Research* 1984; 125: 217-235.
- [23] A. Sionkowska, H. Kaczmarek, M. Wiśniewski, J. Skopińska, S. Lazare, V. Tokarev, The influence of UV irradiation on the surface of chitosan films. *Surface Science* 2006; 600: 3775-3779.
- [24] D.V. Sakharov, E.D.R. Elstak, et al. Prolonged lipid oxidation after photodynamic treatment. Study with oxidation-sensitive probe C11-BODIPY581/591. *FEBS Lett.*, 2005; 579: 1255-1260.
- [25] J. Kulbacka, J. Saczko, A. Chwiłkowska, Stres oksydacyjny w procesach uszkodzenia komórek. *Pol. Merk. Lek.*, 2009; XXVII: 157, 44.
- [26] R. Schueller, P. Romanowski; *Multifunctional Cosmetics*. Marcel Dekker Inc. New York Basel 2001.
- [27] A. Augustyniak, E. Skrzydlewska, Zdolności antyoksydacyjne w starzejącym się organizmie. *Postepy Hig. Med. Dosw.* 2004; 58: 194-201.
- [28] S. Paszyc, *Podstawy fotochemii*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1992.
- [29] B. Halliwell. A super way to kill cancer cells. *Nat. Med.*, 2000; 6: 1105-1106.
- [30] A. Balcerczyk G. Bartosz. Thiols are main determinants of total antioxidant capacity of cellular homogenates. *Free Radic. Res.*, 2003; 37: 537-541.

Projekt pn. „Wzmocnienie potencjału dydaktycznego UMK w Toruniu w dziedzinach matematyczno-przyrodniczych”  
realizowany w ramach Poddziałania 4.1.1 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki

- [31] H. Barton, M. Fołta, Z. Zachwieja. Zastosowanie metod FRAP, ABTS i DPPH w badaniu aktywności antyoksydacyjnej produktów spożywczych, *Nowiny Lekarskie* 2005; 74: 4: 510–513.
- [32] J.F. Rabek, *Polymer Photodegradation: Mechanisms and experimental methods*. Chapman & Hall, London, 1995.
- [33] B. Marciniak, (red), *Metody badania mechanizmów reakcji fotochemicznych*, Wydawnictwo Naukowe UAM, Poznań, 1999.
- [34] A. Sionkowska, Laser flash photolysis and pulse radiolysis study of collagen in acetic acid solution. *J. Photochem. Photobiol. Part B: Biology* 2006; 84: 38-45.
- [35] J. Kroh, *Wolne rodniki w chemii radiacyjnej*. PWN Warszawa 1967.
- [36] G. Kciuk, *Wpływ grup funkcyjnych aminokwasów na mechanizmy reakcji rodnikowych w peptydach zawierających tyrozyne*. Rozprawa doktorska, ICHTJ Warszawa 2011.
- [37] E. Gałęcka, M. Mrowicka, K. Malinowska et al. Wybrane substancje nieenzymatyczne uczestniczące w procesie obrony przed nadmiernym wytwarzaniem wolnych rodników. *Pol. Merk. Lek.*, 2008; 25: 147: 269-272.
- [38] M.J. Davies, R. J.W. Truscott, Photo-oxidation of proteins and its role in cataractogenesis, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 2001; 63: 114–125.
- [39] B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press inc, New York 2012.

Projekt pn. „Wzmocnienie potencjału dydaktycznego UMK w Toruniu w dziedzinach matematyczno-przyrodniczych”  
realizowany w ramach Poddziałania 4.1.1 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki

## SPIS TREŚCI

### CZĘŚĆ I. WOLNE RODNIKI W CHEMII

1. Pojęcie i rodzaje rodników .....	2
2. Nomenklatura rodników.....	6
3. Powstawanie rodników.....	8
4. Trwałość i charakter rodników.....	13
5. Przykłady reakcji z udziałem wolnych rodników.....	15
6. Nadtlenek wodoru i rodniki hydroksylowe.....	18
7. Reakcje Fentona.....	19
8. Halogenowanie węglowodorów.....	20
9. Reakcje w atmosferze.....	21
10. Reakcje polimeryzacji.....	25
11. Reakcje degradacji polimerów.....	30
12. Reakcje jonorodników.....	32
13. Metody badania rodników.....	34
Literatura.....	38

### CZĘŚĆ II. WOLNE RODNIKI W BIOLOGII I MEDYCYNIE

14. Źródła wolnych rodników w organizmach żywych i stres oksydacyjny.....	40
15. Reakcje rodnikowe w aminokwasach.....	45
16. Reakcje rodnikowe w białkach.....	52
17. Reakcje rodnikowe w kwasach nukleinowych.....	57
18. Reakcje rodnikowe w polisacharydach.....	61
19. Reakcje rodnikowe w lipidach.....	64
20. Fotostarzenie i produkty promieniochronne.....	66
21. Wolne rodniki jako przyczyny chorób.....	69
22. Metody badań reakcji rodnikowych w makrocząsteczkach pochodzenia biologicznego.....	71
23. Fotoliza błyskowa.....	72
24. Radioliza impulsowa .....	78
25. Zmiatacze wolnych rodników w organizmach żywych. Antyutleniacze.....	81
Literatura.....	85
Spis treści .....	88