

Wykaz skrótów do rozdziału 8

ES' - rodnik tyłowy ergotioneiny

ESH - ergotioneina

ESSE - disulfid ergotioneiny

GSH - glutation zredukowany

Hb - hemoglobina

HPLC - wysokoci nieniowa chromatografia cieczowa

Mb - mioglobina

NMR - j drowy rezonans magnetyczny

RFT - reaktywne formy tlenu

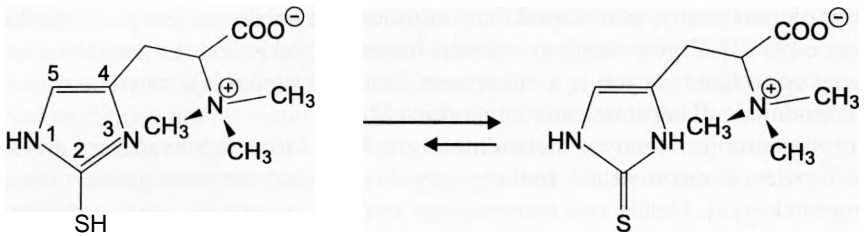
8. ERGOTIONEINA

Występowanie i właściwości biologiczne

Ewa Luchter-Wasylewska

8.1. Wprowadzenie

L-Ergotioneina (ryc. 1), czyli kwas 2-N,N,N-trimetylo-amino-3-(4-imidazolino-2-tion)-propionowy (C₉H₁₅O₂N₃S), jest naturalnie występującą, szeroko rozpowszechnioną w przyrodzie pochodną L-histydyny [1, 2]. Powstaje w organizmach niższych eukariotów: grzybów, takich jak buławinka czerwona, czyli sporysz (*Claviceps purpurea*), pleśni, takich jak czerwona pleśń chlebowa, czyli rdza zbożowa (*Neurospora crassa*) oraz pewnych mykobakterii. Biosynteza ergotioneiny prawdopodobnie prowadzi z histydyny, metioniny oraz cysteiny, przez 2-tiolohistydynę i hercynin (N,N,N-trimetylo-histydyna). Ergotioneina jest gromadzona w tkankach grzybów i stanowi główny składnik puli związków tiolowych, osi gąsieniczenie milimolowe [1-3],



Ryc. 1. Tautomeryczne formy ergotioneiny: iminotiolowa (tiolowa) i tioamidowa (tionowa) [2, 29, 31]

Ergotioneina nie jest wytwarzana przez rośliny wyższe i zwierzęta. Jest ona pobierana z gleby przez korzenie roślin, a następnie z pokarmem roślinnym jest wprowadzana do organizmów zwierząt, takich jak ssaki, ptaki, kraby i ryby [1-4]. Ergotioneina asymilowana przez zwierzęta nie jest degradowana, lecz jest przechowywana przez długi okres w ich tkankach; jej obecność została potwierdzona z zastosowaniem nowoczesnych metod fizykochemicznych, takich jak HPLC i NMR. Półokres życia ergotioneiny szczura wynosi 1 miesiąc [2].

Ergotioneina została po raz pierwszy wyizolowana i wykrystalizowana przez Tanreta w roku 1909 z ziaren sporyszu, a w roku 1911 została zidentyfikowana przez Barger'a i Ewinsa jako betaina 2-tiolohistydyny. W roku 1951 Heath, Lawson i Rimington dokonali syntezy ergotioneiny z 2-tiolohistydyny, aminokwasu nie znalezionego w tkankach ssaków [1, 2]. Początkowo ergotioneinie nadawano różne nazwy. Hunter i Eagles krystaliczną substancję wyizolowaną z krwi wini nazwali „sympektotinem”, natomiast Benedict „tiazyn” [1, 2], Ergotioneina dawniej nazywana była też „tionein”, ale obecnie tak nazw mają białka wiące metale, np. miedź lub cynk [1,2, 5].

W organizmach zwierząt ergotioneina jest gromadzona w wiotrobie, soczewce oka, erytrocytach, płynie nasiennym, płucach, ledzionie, mięśniach sercowym i szkieletowym, nerkach i szpiku kostnym w systemie milimolowym, zaś w centralnym systemie nerwowym w systemie mikromolowym [1—4, 6-15].

Poziom ergotioneiny różni się znacznie pomiędzy tkankami danego organizmu. Dla danej tkanki zależy od rodzaju organizmu i od jej poziomu w diecie [2, 6-9]. Człotkankowej ergotioneiny może być związana z białkami [2, 9, 11, 16], Zawarto ergotioneiny we krwi utrzymuje się na stałym poziomie, charakterystycznym dla danych gatunków zwierząt i okolicy, w której te zwierzęta żyją [6, 8]. W ludzkiej krwi jest jej nie więcej niż 2 mg/100 ml, ale w wieśkiej 26 mg/100 ml [1]. Poziom ergotioneiny w erytrocytach jest dużo wyższy niż w surowicy, co oznacza, że erytrocyty utrzymują wewnątrzkomórkowy poziom ergotioneiny przeciw gradientowi stężenia [12, 16], Stężenie ergotioneiny w młodych erytrocytach jest wysokie i obniża się powoli z wiekiem erythrocyta [2, 12, 17], Ergotioneina wprowadzana jest do erytrocytów jedynie podczas erythropoezy [2], Poziom ergotioneiny w erytrocytach może ulec zmianie w stanach patologicznych: w cukrzycy jest on podwyższony, zaś w chorobach tarczycy jest obniżony [18], W wiotrobie stężenie ergotioneiny jest 10 razy wyższe niż we krwi, co świadczy o tym, że komórki wiotroby są zdolne do jej zagłuszczenia. Mechanizm tego procesu nie jest znany; prawdopodobnie ergotioneina pobierana jest przez białko transportujące [9, 12], Ergotioneina przechodzi barierę łożyskową; jest też znajdowana w mleku zwierząt wchłaniających ją z pokarmem. Również białko jaja zawiera ergotioneinę, prawdopodobnie dla dostarczenia jej płodowi [2, 17].

Ergotioneina jest cennym metabolitem grzybów, który wprowadzony do komórek roślin i zwierząt może pełnić funkcję antyoksydacyjną, antymutagenną oraz chemo- i radioprotekcyjną. Działa ona ochraniająco zarówno na grzyby, czyli organizmy syntetyzujące ją, jak również na rośliny i zwierzęta, pobierające ją z pożywieniem [1,2, 11, 12, 16, 17, 19-28],

8.2. Właściwości chemiczne ergotioneiny

L-Ergotioneina (kwas 2-N,N,N-trimetylo-amino-3-(4-imidazolino-2-tion)-propionowy), czyli betaina 2-tiolohistydyny (ryc. 1), jest reaktywnym, biologicznie czynnym związkiem chemicznym. W fizjologicznym pH, alifatyczny łańcuch ergotioneiny zawiera dodatkowo naładowany czwartorzędowy atom azotu grupy betainowej oraz ujemnie naładowany anion karboksylanowy ($pK_a=1,34$). Do atomu węgla C2 heterocyklicznego pierścienia imidazolu przyłączona jest grupa tiolowa, która w wyniku tautomerii tioamidowo-iminotiolowej fragmentu pierścienia 2-tiokarbonyłowego imidazolidyny,

pozostaje w tautomerycznej równowadze z form tionow (tioamidow), z przewagą tej ostatniej [2, 24, 29-31].

Pierścień imidazolowy ergotioneiny, podobnie jak innych 2-tiolimidazoli, absorbuje światło ultrafioletowe ($\epsilon_{258 \text{ nm}} = 14500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [29], $\epsilon_{258 \text{ nm}} = 15600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [30], $\epsilon_{257 \text{ nm}} = 14000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [31]). Ergotioneina posiada zdolność wygaszania fluorescencji indolu, 20-100 razy silniejszą niż inne imidazolo-2-tiony, takie jak etylenotiomocznik i tioetylamina [28],

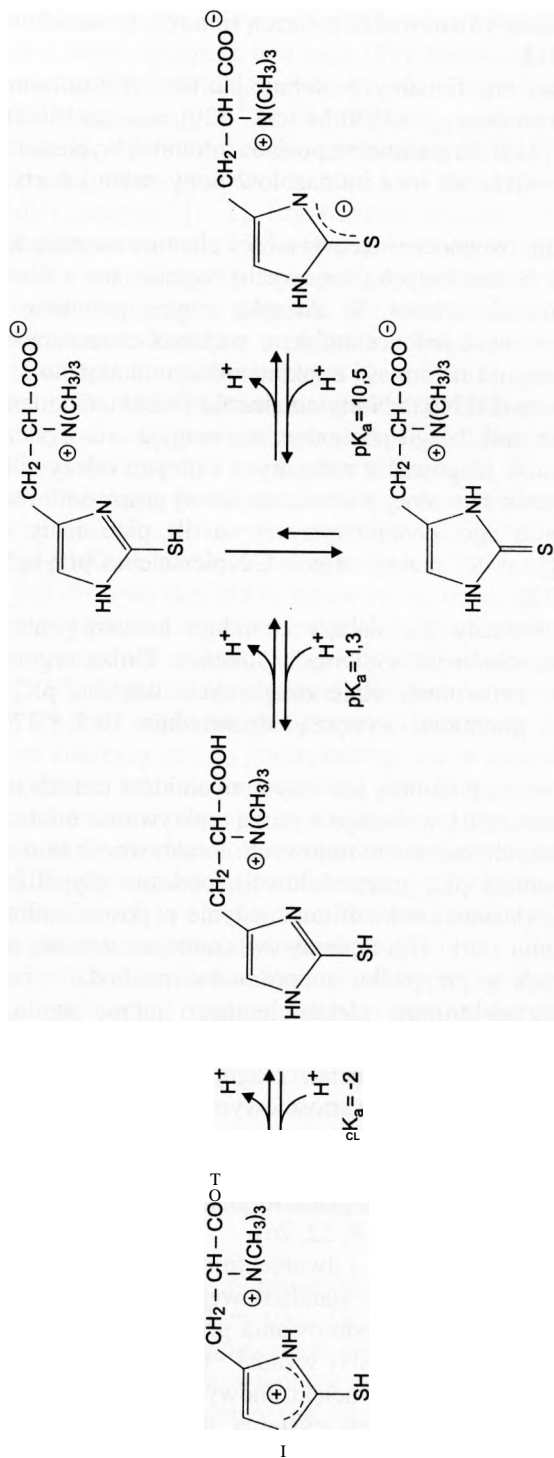
Ergotioneina wykazuje równocześnie własności chemiczne związków iminotiolowych (tiolowych), jak i tioamidowych (tionowych), wynikające z równowagi pomiędzy formami tiolowymi i tiokarbonyłowymi. W związku z tym, podobnie jak alifatyczne związki tiolowe, reaguje ona z jodoacetamidem, p-chlorobenzoesanem (pCMB) i bromobimananem; nie reaguje natomiast z takimi odczynnikami tiolowymi, jak kwas 5,5'-ditio-bis-nitro-benzoowy (DTNB) i N-etylomaleimid (NEM). Odmienne jak związki tionowe, takie jak tiomocznik i jego pochodne, nie reaguje ona z odczynnikami Grignarda. Ergotioneina nie może reagować z ninhydriną i innymi odczynnikami grup aminowych, ponieważ nie posiada wolnej pierwszorzędowej grupy aminowej. Nie reaguje też z odczynnikami Pauly'ego, charakterystycznym dla pierścienia imidazolowego, gdy do uczestniczącego w tej reakcji atomu C2 pierścienia przyłączony jest atom siarki [2, 9, 11, 17, 29, 32],

Grupa tiolowa ergotioneiny ma słabszy charakter kwasowy niż grupa tiolowa związków alifatycznych, takich jak cysteina i glutation. Tioanion ergotioneiny (ryc. 2) tworzy się dopiero w roztworach silnie zasadowych; wartości pK_a grupy tiolowej ergotioneiny, cysteiny i glutationu wynoszą odpowiednio 10,5; 8,37 i 9,2 [2, 30, 31, 33,34].

Atom siarki ergotioneiny, podobnie jak innych tioamidów (takich jak 2-tioketoimidazol, tiomocznik i tioacetamid), wykazuje wysoką reaktywność nukleofilową, w tym samym stopniu jak atom siarki alifatycznych związków tiolowych. Reaktywność ta ujawnia się nawet w postaci obojętnej (poniżej pK_a grupy tiolowej), podczas gdy alifatyczne związki tiolowe wykazują słabe własności nukleofilowe jedynie w postaci anionowej (powyżej pK_a). Nukleofilność atomu siarki ergotioneiny związana jest z polaryzowalnością atomu siarki i, podobnie jak w przypadku aminotionów, pochodzi z mezomerycznego uwalniania wolnej pary elektronów elektroujemnego atomu azotu, siedzącego z siarką [31],

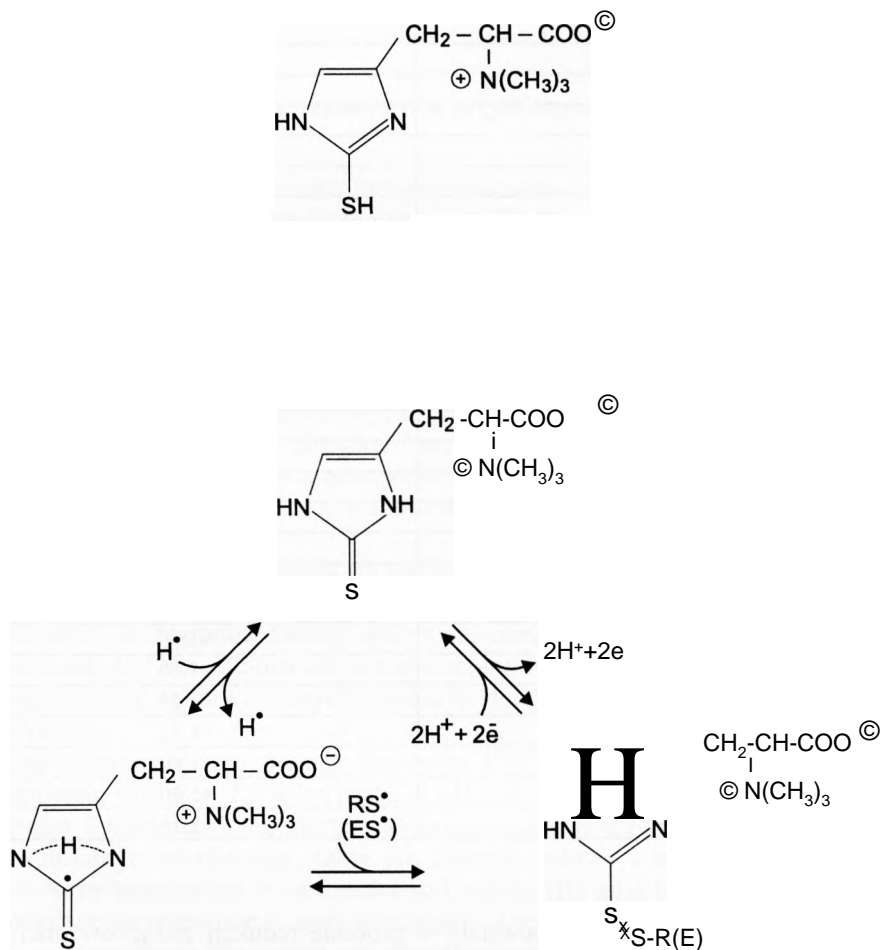
Jako reaktywny nukleofil, ergotioneina reaguje ze związkami elektrofilnymi, a w szczególności z mutagenami oraz z dwuwartościowymi kationami metali przejściowych (jonów miedzi, rtęci, cynku, kadmu, kobaltu i niklu). Trwałe kompleksy wiążą 2 mole ergotioneiny z 1 molem jonu metalu. Zdolność chelatowania jonów, takich jak miedź i elazo, pozwala ergotioneinie przeciwdziałać uszkodzeniom oksydacyjnym w różnych tkankach [2, 12, 14, 16, 17, 19, 22, 26].

Ergotioneina bierze udział w jedno- i dwuelektronowych reakcjach utlenienia oraz w reakcjach redukcji (ryc. 3). Wartość standardowego potencjału redoks E^0 (w pH 7,0) dla dwuelektronowej reakcji odwodorowania grupy tiolowej/tionowej ergotioneiny z utworzeniem disulfidu (ESSE/ESH) wynosi $-0,06 \text{ V}$ [2, 11, 28, 35]. Jest ona wyższa (tab. 1) niż wartość E^0 dla dwuelektronowych reakcji odwodorowania alifatycznych związków tiolowych, takich jak cysteina, glutation i liponian [33, 34]. Jest natomiast niższa niż wartość E^0 dla wielu innych reakcji odwodorowania. Wartość potencjału E^0 dla jednoelektronowych reakcji odwodorowania ergotioneiny (ESH/ES')



Ryc. 2. Jonizacja ergotioneiny: azot N3 imidazolu ($\text{pK}_a = -2,0$), grupa karboksylowa ($\text{pK}_a = 1,3$) oraz grupa tiolowa ($\text{pK}_a = 10,5$) [30, 31]

oraz ES7ESSE) nie zostały do tej pory wyznaczone i wydaje się, że analogicznie jak w przypadku związków takich jak glutation i askorbinian (tab. 1), są one wysze ni dla reakcji dwuelektronowej.



Ryc. 3. Reakcje utleniania i redukcji, w których uczestniczy ergotioneina [11]

Właśnie ci antyoksydacyjne (redukcyjne) ergotioneiny (ESH) wynikają z faktu, że ona dwuelektronowo redukowana (ryc. 3) związki utleniające (związki o wyszym potencjale $E^{0'}$), z równoczesnym utworzeniem symetrycznych (homo-) lub mieszanych disulfidów ergotioneiny (ESSE, ESSR). Ergotioneina (ESH) może też jednoelektronowo redukować inne związki (takie jak nadtlenoazotyn oraz rodnik OH[•] i askorbylowy) z utworzeniem rodnika dylowego (ES[•]). Rodnik ten może ponownie zostać zredukowany do ESH, albo w reakcji z drugim rodnikiem tylowym (ES[•], RS[•]) może utworzyć disulfidy (ESSE, ESSR), a także może reagować z innymi wolnymi rodnikami. Przykładem jednoelektronowej redukcji rodnika tylowego ergotioneiny może być jego reakcja z askorbinianem [11, 12, 36],

Warto ci standardowego potencjału redoks (E^0) reakcji jedno- i dwuelektronowych [32, 33]

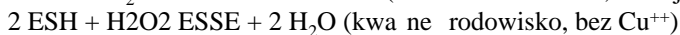
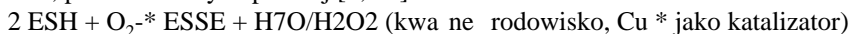
Układ	E^0 [V]
GSSG/GSSG- (glutation)	-1,50
Fe^3Fe^{2+}	-0,77
Fe^{3+} -cytrynian/ Fe^{2+} -cytrynian	-0,33
O_2/O_2^-	-0,33
NAD(P) ⁺ /NAD(P)H	-0,32
Dihydroliponian/liponian	-0,32
GSSG/GSH (glutation)	-0,24
CSSC/CSH (cysteina)	-0,22
$f a d / f a d h_2$	-0,06
ESSE/ESH (ergotioneina)	-0,06*
Dehydroaskorbinian/askorbinian	-0,06
Mioglobina- Fe^{3+} / Mioglobina- Fe^{2+}	+0,05
Hemoglobina- Fe^{3+} /Hemoglobina- Fe^{2+}	+0,15
Ask' (rodnik askorbylowyj/askorbinian	+0,28
O_2/H_2O_2	+0,30
H_2O_2/OH^{\cdot}	+0,32
L^{\cdot}, H^+ (rodnik wielonienas. kw. tłuszcz.)/LH	+0,60
O_2/H_2O	+0,82
h_2o_2/o_2^-	+0,87
GS7GS (glutation)	+0,92
CS7CS" (cysteina)	+0,92
O_2/HO_2^{\cdot}	+ 1,00
ROO7ROOH	+ 1,00
NO7NO ⁺	+ 1,21
H_2O_2/H_2O	+ 1,32
ONOOH/NO ⁺	+ 1,40
RO7ROH	+ 1,60
OH7H ₂ O	+2,31

* [2, 11,28]

Disulfid ergotioneiny (ESSE), powstały w procesie redukcji związków utleniających, może zostać dwuelektronowo zredukowany przez związki redukujące (związkami o niższym potencjale E^0), na przykład przez cysteinę lub glutation [29]. Utworzony w tej reakcji utleniony glutation (GSSG) może zostać ponownie zredukowany działaniem reduktazy glutationowej, z użyciem NADPH jako koenzymu [11, 22]. Disulfid ergotioneiny może zostać jednoelektronowo zredukowany podczas radiolizy pulsacyjnej w obecności askorbinianu [36].

We krwi, w obecności nadmiaru GSH, ergotioneina występuje jedynie w postaci zredukowanej, podobnie jak w wodnym roztworze o fizjologicznym pH. Natomiast w roztworze kwaśnym występuje w postaci mieszaniny tiolu i disulfidu [12]. W porównaniu z alifatycznymi tiolami, ergotioneina nie jest łatwo samoutleniająca, gdy samorzutnie nie może tworzyć disulfidów. Aby usunąć atom siarki ergotioneiny, niezbędny jest powstanie stresu oksydacyjnego [2, 12, 17, 29],

Disulfid ergotioneiny, nietrwały w roztworach wodnych i alkalicznych, może być utworzony w chemicznych reakcjach utlenienia ergotioneiny tlenem i nadtlenkiem wodoru, przedstawionych poniżej [2, 29]:



8.3. Metody ilościowego oznaczania ergotioneiny

Dotychczas opracowano kilka metod ilościowego oznaczania ergotioneiny w roztworach wodnych i w płynach fizjologicznych [32, 37¹¹],

Metoda Huntera [32, 37] oparta jest na reakcji ergotioneiny z odczynnikiem diazo (kwas sulfanilowy z azotanem (III) sodu) w roztworze zasadowym. Absorbancja purpurowego produktu reakcji jest mierzona przy długości fali 495-530 nm (maksimum przy 510 nm). Tioloimidazole i tiolourokany, podobnie jak ergotioneina, tworzą purpurowy produkt reakcji. Z oznaczeniem ergotioneiny interferują ponadto fenole, tyrozyna, histydyna i kwas moczowy, tworzące barwne produkty z odczynnikiem diazo. Cysteina i zredukowany glutation hamują natomiast pojawianie się barwy purpurowej w reakcji ergotioneiny z odczynnikiem diazo. Metoda Huntera została zastosowana do oznaczania ergotioneiny w kulturze grzybów, we krwi i w nasieniu [3, 6, 7, 8, 10, 15, 18, 37, 42],

Metoda Jocelyna [38] polega na ogrzewaniu ergotioneiny z 50% K.OH w 100°C z utworzeniem tiolourokanyanu i trimetyloaminy [3, 39], która w reakcji z kwasem pikrynowym w benzenie tworzy pikrynian, oznaczany spektrofotometrycznie przy długości fali 410 nm. Metoda nie jest pracochłonna i może być stosowana do oznaczania ergotioneiny we krwi i innych tkankach. Hercynina obecna w próbce daje wyniki podwyższone.

Spektrofotometryczna metoda Carlssona [39] opiera się na reakcji ergotioneiny z nadmiarem disulfidu 2,2'-dipirydylu w pH 1,0, ze stechiometrycznym uwalnianiem barwnego 2-tiolo-pirydonu, którego absorbancja jest mierzona przy długości fali 343 nm. Substancje interferujące, takie jak związki tiolowe i askorbinian, utleniane są w roztworze zasadowym w obecności soli miedzi (II) jako katalizatora; ergotioneina jest odporna na utlenianie w tych warunkach. Aby przeprowadzić oznaczenie ergotioneiny w hemolizacie krwi, musi on uprzednio zostać odbiałczony poprzez ogrzewanie w roztworze alkalicznym. Disulfid 4,4'-dipirydylu jest natomiast stosowany do spektrofotometrycznego miareczkowania ergotioneiny [39]. Mitsuyama [12] zmodyfikował metodę Carlssona [39] oznaczenia ergotioneiny we krwi, upraszczając i skracając procedurę. Umożliwia ona ilościowe oznaczenie ergotioneiny w zakresie stężenia od 2,5 do 80-10⁶ M.

Metoda Faheya [40] polega na reakcji związków tiolowych z monobromo-trimetylo-ammonio-bimananem w obojętnym pH, z utworzeniem fluoryzujących pochodnych, które następnie poddawane rozdzielom chromatograficznym, elektroforetycznym lub z użyciem elektrochromatografii dwuwymiarowej. Metoda ta pozwala na jako ilościowe i jakościowe oznaczenie związków tiolowych, w tym także ergotioneiny.

Kuninori i Nishiyama [41] przygotowali metodę pozwalającą na szybkie i czułe ilościowe oznaczenie pikomolowych ilości związków tiolowych, w tym także ergotioneiny.

iny. Metoda polega na rozdzieleniu badanej mieszaniny z zastosowaniem techniki HPLC i elektrochemicznej detekcji jonów srebra, pozostających po reakcji ze związkiem tiolowym. Disulfidy oznaczane są jako pochodne tiolowe, powstałe po redukcji siarczynem lub elektroredukcji.

X.

8.4. Właściwości biologiczne ergotioneiny

Ergotioneina jest związkiem mało znanym w środowisku biologów, biochemików, farmaceutów i lekarzy. Powodem takiego stanu jest trudność jej wykrywania i ilościowego oznaczania, wynikająca z jej niezwykłych właściwości chemicznych. Rola fizjologiczna ergotioneiny nie została dotychczas dokładnie poznana i nadal wymaga wyjaśnienia.

W zależności od warunków środowiska, ergotioneina może istnieć w wielu różnych postaciach: jako iminotiol (tiol), pozostający w równowadze z formami tioamidów (tionów) (ryc. 1), jako tiolan (ryc. 2), jako disulfid oraz jako wolny rodnik tiolowy (ryc. 3). Każda z tych postaci ma inne reaktywności chemiczne i wynikające z niej właściwości biologiczne [2, 11, 12, 24, 28-31, 36].

Wydaje się, że głównym zadaniem biologicznym ergotioneiny jest wychwytywanie nadtlenu wodoru, wolnych rodników oraz elektrofilnych cząstek mutagenów, jak również chelatowanie jonów Cu i Fe^{+1} [2, 22, 24, 26]. W ten sposób może ona ochraniać komórki i tkanki przed działaniem toksycznych substancji utleniających i mutagennych, jonów metali, nadtlenu wodoru i wolnych rodników [2, 17, 19, 22]. Ergotioneina jest zdolna zmniejszyć uszkodzenia spowodowane napromieniowaniem, niedotlenieniem po transplantacji organów oraz udarach serca i mózgu, jak również może ochraniać przed działaniem cytostatyków [2, 24, 17, 23, 27, 36, 43]. Przypuszcza się, że ergotioneina ponadto działa jako neurotransmitter, czynnik diabetogenny, bierze udział w transporcie kationów, działaniu hormonów tyroidowych, ekspresji i naprawie genów oraz w immunoregulacji [2, 12, 17, 19, 20, 22, 24, 26-28]. Antyoksydacyjna, antymutagenna oraz antykancerogenna obrona tkanek i płynów tkankowych może być modulowana przez uzupełnienie ergotioneiny z diety [17, 19, 26].

Ergotioneina (ESH) ma odmienne właściwości chemiczne i inne spektrum działania niż alifatyczne związki tiolowe obecne w komórce, takie jak glutation i cysteina, gdy występuje ona głównie w postaci tioamidowej (tionowej), spośród dwóch pozostających w równowadze form tautomerycznych: iminotiolowej i tioamidowej (ryc. 1) [2, 29-31]. Stres oksydacyjny nie ma wpływu na poziom ergotioneiny w erytrocytach: nie zachodzi obniżenie poziomu ergotioneiny, gdy erytrocyty traktowane są H_2O_2 i gdy obniży się poziom GSH [12]. Ergotioneina działa bardziej skutecznie niż GSH erytrocytów oraz jest mniej samoutlenialna niż glutation; jest więc zdolna suplementować GSH w tkankach. Ponadto GSH, aby detoksykować ksenobiotyki wymaga działania S-transferazy glutationylowej, czego nie wymaga ergotioneina [2, 17, 19, 22],

Ergotioneina, z powodu po prostu niższego standardowego potencjału redoks E^0 dwuelektronowej reakcji redukcji (tab. 1), może brać udział zarówno w reakcjach utleniania, jak i redukcji, będąc reduktantem lub utleniaczem, w zależności od związku, z którym reaguje. Zatem, może ona być przekaźnikiem elektronów pomiędzy zwi-

kami, które nie są zdolne do reakcji bezpo redniej. Jedno- i dwuelektronowe reakcje utleniania i redukcji pozwalają ergotioneinie integrować anty oksydacyjne szlaki witaminy C i glutationu [11]. Kooperacyjne działanie ergotioneiny i askorbinianu, podobne do wcześnie obserwowanego między witaminą E i askorbinianem, może wyjaśnić biologiczną rolę ergotioneiny [36],

Ergotioneina (ESH) jest antyoksydantem (reduktantem), zdolnym do redukcji (tab. 1) licznych związków oraz wolnych rodników (takich jak Fe^{3+} hemoglobiny i mioglobiny, nadtlenoazotyn, OH^{\cdot} i rodnik askorbylowy). Disulfid ergotioneiny (ESSE) może być redukowany (może utleniać) przez związki takie, jak jon Fe^{3+} , glutation, cysteina i dihydroliponian oraz zredukowane nukleotydy NADH i NADPH [11, 24, 27, 33, 34, 36],

fibt 3*

Chemoprotekcyjna rola ergotioneiny polega na „wyłapywaniu” utleniaczy, czyli redukowaniu ich w reakcjach jednoelektronowych [11, 12, 36]. Ergotioneina jest zdolna do reakcji z wolnymi rodnikami hydroksylu (OH^{\cdot}), azydkiem (N_3^{\cdot}), nadtlenku trichlorometylu (CCl_3O_2) i peroksytyrozyny oraz z anionami podchlorynu (OCE^-) i nadtlenoazotynu (ONOO^-) [2, 24, 11, 12, 17, 26, 27, 36]. Ergotioneina zmniejsza nadtlenoazotyn i podchloryn, zapobiega inaktywacji α -antyproteinazy; chroni tyrozyn przed nitrowaniem; ma ponadto działanie ochronne wobec aminokwasów, takich jak tryptofan, metionina, cystationina i homocystyna [11, 27, 44]. Ergotioneina, wychwytyując wolne rodniki hydroksylowe, hamuje peroksydację kwasu arachidonowego *in vitro* w wątrobie szczura, zachodzi pod działaniem związków hemu i H_2O_2 [2, 12, 22, 24]. Zmniejszaczem rodników hydroksylowych jest również histydyna, która nie jest wykrywana w organizmach żywych, z wyjątkiem niektórych ryb [20].

Ergotioneina wykazuje wysoką reaktywność nukleofilową, znacznie wyższą niż tiole alifatyczne. Reaktywność ta występuje nawet w postaci obojętnej (w pH poniżej pK_a grupy tiolowej), podczas gdy związki alifatyczne wykazują własności nukleofilne tylko, gdy są naładowane ujemnie (jako tiolan) [19, 26, 45]. Jedynie grupy tiolowe reszt cysteiny centrum aktywnego pewnych enzymów wykazują reaktywność nukleofilową w pH fizjologicznym, na skutek obniżenia ich wartości pK_a w wyniku oddziaływania reszty histydyny [31, 46]. Ergotioneina ma działanie antymutagenne, gdy jako reaktywny nukleofil jest zdolna do reakcji z cząsteczkami elektrofilnych związków mutagennych, takimi jak kumen i nitrozoaminy [2, 17, 19, 22, 24, 27, 36].

Ergotioneina, podobnie jak imidazol, chelatuje dwuwartościowe kationy metali przejściowych [2, 17, 19, 22, 24, 27, 36, 47-50]. Poprzez zdolność do kompleksowania jonów może ona przeciwdziałać uszkodzeniom utleniaczom. Jony miedzi i elazobiorów bowiem udział w uszkodzeniach tlenowych, ułatwiają tworzenie rodnika OH^{\cdot} , nadtlenków (wśród nich nadtlenku wodoru), peroksydacji lipidów oraz uczestniczą w nieenzymatycznym utlenianiu endogennych biologicznie czynnych związków, takich jak GSH [2, 17, 19, 21, 22, 24, 26]. Ergotioneina ponadto hamuje alkilację RNA *in vitro* oraz uszkodzanie deoksyrybozy w obecności jonów Fe^{2+} , zależnie od rodnika OH^{\cdot} [2, 4, 22, 24]. Kompleksując jony Cd^{2+} , chroni ona mysz przed teratogenną ciędotrzewnowo podanego kadmu, zaś chelatując jony rtęci, tworzy kompleks $\text{ESH-Hg}^{2+}\text{-Hb}$ [2, 49]. Ergotioneina wiąże jony metali, hamuje aktywność metaloproteidów [2, 27]. Podwyższony poziom ergotioneiny, zdolnej do wiązania jonu Zn^{2+} niezbędny dla biologicznej aktywności insuliny, mógłby zatem być przyczyną powstawania cukrzycy [2, 18],

Ergotioneina obniża poziom RFT w tkankach, zarówno hamując proces ich powstawania, jak i reagując z nimi oraz utrzymuje prawidłowy stosunek tiol/disulfid [2, 11, 12, 17, 24, 26, 27, 36]. Ergotioneina chroni sporysz, hepatocyty oraz erythrocyty przed cytotoksycznym wywołanym działaniem nadtlenu wodoru, jak również zwiększa przeżywalność przechowywanych *spermatozoa*, ochraniając je przed działaniem nadtlenu wodoru. Nadtlenek wodoru jest redukowany działaniem ergotioneiny i GSH, z utworzeniem disulfidów ergotioneiny i glutationu [1, 2, 12, 13, 17, 19, 22].

Ergotioneina ochrania mioglobiny przed uszkodzeniem spowodowanym niedotlenieniem oraz działaniem wolnych rodników [2, 17, 23, 25, 43, 49]. Podobnie jak inne związki tiolowe, redukuje ona ferrylnioglobinę (MbIV) do Mb(III), powstał w wyniku eksponowania deoksyMb(II) lub Mb(III) na działanie nadtlenu wodoru [23]. Redukuje też Hb(IV)O do Hb(III), powstał w reakcji Hb(II)O₂ z jonem azotynowym, chroni erythrocyty przed działaniem ferrylnioglobiny Hb(IV)O, podobnie jak imidazolotioin i kwas moczowy [2, 25]. Utworzony w tych reakcjach disulfid ergotioneiny może zostać ponownie zredukowany działaniem GSH. Sugeruje się, że para ESH-GSH jest biologicznym reduktantem mioglobiny i ochrania mioglobiny przed nagromadzeniem sił utlenionych postaci Mb po niedotlenieniu [23, 25].

Ergotioneina hamuje powstawanie tlenu singletowego, wygaszając wzbudzone cząsteczki fotouczulaczy, podobnie jak kwas moczowy, histydyna i tiolohistydyna. Ma ponadto działanie ochronne przed fotochemicznym uszkodzeniem fizjologicznie ważnych związków, podobnie jak histydyna i karnozyna. Nie jest natomiast zdolna do wychwytywania tlenu singletowego [2, 19, 20, 22-24, 28, 51]. Ergotioneina może osłaniać soczewkę oka zwierząt, spowodowanych dostateczną jej ilością, przed uszkodzeniami oksydacyjnymi oraz przed działaniem światła ultrafioletowego [19, 11, 17, 22, 20, 28, 38].

Ergotioneina ochrania bakteriofagi T4 i P22 przed inaktywacją promieniowaniem gamma, powodującym wytwarzanie nadtlenu wodoru, ponadtlenków i rodnika hydroksylowego [2, 20, 27]. Jej radioprotekcyjne działanie wynika ze zdolności do utleniania cząstek i rodników, powstałych w wyniku działania promieniowania. Ergotioneina jest bardziej skutecznym radioreceptorem na wietlenie metmioglobiny promieniami gamma niż cysteina i cysteamina [22].

Trwałe i farmakodynamika ergotioneiny sugerują wiele jej potencjalnych zastosowań. Ergotioneina, podobnie jak inne związki tiolowe, może być stosowana *in vivo* jako lek u ludzi, biorąc udział w ochronie przed uszkodzeniami oksydacyjnymi, powstającymi w wyniku procesu chorobotwórczego lub w wyniku leczenia chorób [2, 3, 17, 19, 20, 26, 27, 33, 34, 36, 44]. Może ona być używana zarówno podczas oczyszczania enzymów, jak i podczas długoterminowych hodowli komórek ludzkich pozbawionych surowicy, gdy niezbędne jest dodawanie antyoksydantów [2, 17, 23, 24]. Ergotioneina erythrocytów może mieć zastosowanie terapeutyczne w leczeniu malarii i talasemii oraz w leczeniu schorzeń erythrocytów uszkodzonych oksydacyjnie [2, 17, 20, 26]. Ergotioneina podawana w płynie infuzyjnym może ochraniać mioglobiny przed uszkodzeniami spowodowanymi ischemią i reperfuzyją, za podawana pacjentom z zespołem Downa może ponadto pomagać w zmniejszaniu efektów związanych z chorobą i towarzyszącym mu nadmiarem dysmutazy ponadtlenkowej. Hartmanowie [19] sugerują, że ergotioneina okaże się wystarczająco bezpieczna, aby została niebawem zaliczona do witamin i aby znalazła się w aptekach obok witaminy C.

Ovothiol (1-metylo-N,N-dimetylo-4-thiolohistydyna) jest inn obecny w komórkach biologicznie czynny tiolowy pochodny histydyny. Ovothiol działa skuteczniej chemoprotekcyjnie, radioprotekcyjnie, antymutagennie i antyoksydacyjnie, w porównaniu z ergotionein [36, 52-54],

8.5. Podsumowanie

Ergotionein (ryc. 1-3) jest nietoksyczny, naturalnie występujący pochodny histydyny, syntetyzowany jedynie przez grzyby i mikroorganizmy, spożywany przez zwierzęta i ludzi wraz z pokarmem roślinnym [1-3]. Zwierzęta asymilują do 90% ergotioneiny pobranej z pożywieniem i przechowują w wysokim stężeniu przez długi okres w tkankach szczególnie podatnych na stres oksydacyjny, takich jak eryocyty, płyn nasienny, w tęczówce, nerki i soczewka oka [2, 17, 21]. Choć nie jest ona syntetyzowana przez zwierzęta, nie stwierdzono objawów jej niedoboru [27],

Dawniej ludzie i zwierzęta wzbogacali swój organizm w ten cenny związek, spożywając pokarm zanieczyszczony grzybami wytwarzającymi ergotionein. Obecnie pożywienie ludzi jest mniej zanieczyszczone grzybami. Poziomy ergotioneiny w pokarmach (zboża, keczup) może być wskaźnikiem zanieczyszczenia grzybami [2, 17],

Ergotionein ma odmienne właściwości chemiczne oraz inne spektrum działania niż alifatyczne związki tiolowe, obecne w komórce, takie jak glutation, cysteina i kwas liponowy, gdy jej grupa tiolowa uczestniczy w tautomerii tioamido-iminotiolowej [2, 17, 19, 22, 31]. Atom siarki ergotioneiny, podobnie jak innych aminotiolów, wykazuje wysoką reaktywność nukleofilną, nawet gdy grupa tiolowa/tionowa jest niezdysocjowana w środowisku obojętnym i kwaśnym, podczas gdy alifatyczne związki tiolowe wykazują słaby charakter nukleofilowy jedynie w roztworze zasadowym (powyżej pK_a) po oddysocjowaniu protonu [2, 30],

Ergotionein jest ważnym egzogennym metabolitem komórek: działa antyoksydacyjnie, antymutagennie, chemo- i radioprotekcyjnie, jako wysoce reaktywny reduktor i utleniacz, nukleofil oraz chelator jonów metali [2, 17, 19-22, 26, 36]. Może ona być użyteczna w walce ze stresem oksydacyjnym. Może ochraniać komórki i tkanki przed działaniem toksycznych substancji utleniających i mutagennych oraz jonów metali, nadtlenu wodoru i wolnych rodników, powstających w wyniku chorób oraz ich leczenia [2, 11, 19, 24, 17, 20, 22, 26, 43]. Antyoksydacyjna i antymutagenna obrona tkanek i płynów tkankowych może być modulowana przez uzupełnianie ergotioneiny z diety [17]-

Ergotionein w stężeniach spotykanych *in vivo* jest ochraniającym, nietoksycznym naturalnie występującym czynnikiem, która nie jest łatwa do samoutleniania i która ma wysoki, milimolowy stężenie w tkankach ssaków.

Literatura

- [1] Mann T. (1964), *Nitrogenous bases: spermine, choline, ergothioneine, guanidines, adrenaline, serotonin and their derivatives*. W: *The biochemistry of semen and of the male reproductive tract*. Ed. Methuen & Co Ltd, London; John Wiley & Sons Inc., New York, 193-220.
- [2] Hartman P.E. (1990), *Ergothioneine as antioxidant*. Meth. Enz., 186, 310-318.
- [3] Heath H., Wildy J. (1956), *The biosynthesis of ergothioneine and histidine by Claviceps purpurea*. Biochem. J., 64, 612-620.
- [4] Heath H., Rimington C., Glover T., Mann T., Leone E. (1953), *Studies using radioactive sulfur on ergothioneine formation in the pig*. Biochem. J., 54, 606-611.
- [5] Maret W., Jacob C., Valee B.L., Fischer E.H. (1999), *Inhibitory sites in enzymes: zinc removal and reactivation by thionein*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 1936-1940.
- [6] Hunter G. (1951), *On ergothioneine in blood and diazo-reacting substances in maize*. Biochem. J., 48, 265-270.
- [7] Heath H., Rimington C., Searle C.E., Lawson A. (1952), *Some effects of administering ergothioneine to rats*. Biochem. J., 50, 530-533.
- [8] Baldrige R.C., Lewis H.B. (1953), *Diet and the ergothioneine content of blood*. J. Biol. Chem., 202, 169-176.
- [9] Melville D.B., Homer W.H., Lubschetz R. (1954), *Tissue ergothioneine*. J. Biol. Chem., 206, 221-228.
- [10] Heath H., Rimington C., Mann T. (1956), *Further studies on seminal ergothioneine of the pig*. Biochem. J., 65, 369-373.
- [11] Shires T.K., Brummel M.C., Pulido J.S., Stegink L.D. (1997), *Ergothioneine distribution in bovine and porcine ocular tissues*. Comp. Biochem. Physiol., 117C, 117-120.
- [12] Mitsuyama H., May J.M. (1999), *Uptake and antioxidant effects of ergothioneine in human erythrocytes*. Clin. Sci., 97, 407-411.
- [13] Mann T., Lutwak-Mann C. (1981), *Biochemistry of seminal plasma and male accessory fluids; application to andrological problems*. W: *Male reproductive function and semen*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 269-336.
- [14] Shivaji S., Scheit K.H., Bhargava P.M. (1990), *Low-molecular-weight components of seminal plasma*. W: *Proteins of seminal plasma*. John Wiley & Sons Inc., Wiley-Interscience Publication, 29-50.
- [15] Mann T., Short R.V., Walton A., Archer R.K., Miller W.C. (1957), *The tail-end sample of stallion semen*. J. Agric. Sci., 49, 301-312.
- [16] Hartman Z., Hartman P.E. (1992), *Copper and cobalt complexes of carnosine and anserine: production of active oxygen species and its enhancement by 2-mercaptoimidazoles*. Chem. Biol. Inter., 84, 153-168.
- [17] Hartman Z., Hartman P.E. (1987), *Interception of some direct-acting mutagens by ergothioneine*. Env. Mol. Mutagenesis, 10, 3-15.
- [18] Frendo J. (1958), *Ergotioneina krwi ludzkiej w nadczynno ci tarczycy*. Przegl d Lekarski, 14, 1-9.
- [19] Hartman P.E. (1986), *Interception of toxic agents/mutagens/carcinogenesis: some of the nature's novel strategies*. W: *Antimutagenesis and anticarcinogenesis mechanisms*. Eds. Shenkel D.M., Hartman P.E., KadaT., Hollaender A., Plenum Publishing Corporation, 169-179.
- [20] Dahl T.A., Midden W.R., Hartman P.E. (1988), *Some prevalent biomolecules as defenses against singlet oxygen damages*. Photochem. Photobiol., 47, 357-362.
- [21] Hartman P.E., Hartman Z., Citardi M.J. (1988), *Ergothioneine, histidine and two naturally occurring histidine dipeptides as radioprotectors against γ -irradiation inactivation of bacteriophages T4 and P22*. Radiat. Res., 114, 319-330.

- [22] Hartman P.E., Shankel D.M. (1990), *Antimutagens and anticarcinogens: a survey of putative interceptor molecules*. *Env. Mol. Mutagenesis*, 15, 145-182.
- [23] Arduini A., Eddy L., Hochstein P. (1990), *The reduction of ferryl myoglobin by ergothioneine: a novel function of ergothioneine*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 281, 41-43.
- [24] Akanmu D., Cecchini R., Aruoma O.I., Halliwell B. (1991), *The antioxidant action of ergothioneine*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 288, 10-16.
- [25] Arduini A., Mancinelli G., Radatti G.L., Hochdtein P., Cadenas E. (1992), *Possible mechanism of inhibition of nitrite-induced oxidation of oxyhemoglobin by ergothioneine and uric acid*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 294, 398-402.
- [26] Hartman P.E., Hartman Z. (1993), *Direct interception of mutagens and carcinogens by biomolecules*. W: *Antimutagenesis and anticarcinogenesis. Mechanism III*. Eds. Bronzetti G., Hayatsu H., DeFlora S., Walters M.D., Shankel D.M., Plenum Press, New York, 351-366.
- [27] Aruoma O.I., Whiteman M., England T.G., Halliwell B. (1997), *Antioxidant action of ergothioneine: assessment of its ability to scavenge peroxynitrite*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 231, 389-391.
- [28] Takeshima S., Inuoe T. (1996), *The strong fluorescence-quenching effect of ergothioneine*. *Chem. Pharm. Bull.*, 44, 201-203.
- [29] Heath H., Toennies G. (1958), *The preparation and properties of ergothioneine disulphide*. *Biochem. J.*, 68, 204-210.
- [30] Stanovnik B., Tisler M. (1964), *Dissociation constants and structure of ergothioneine*. *Anal. Biochem.*, 9, 68-74.
- [31] Carlsson J., Kierstan M.P.J., Brocklehurst K. (1974), *Reactions of L-ergothioneine and some other aminothiones with 2,2'- and 4,4'-dipyridyl disulphides and of L-ergothioneine with iodooctamide*. *Biochem. J.*, 139, 221-235.
- [32] Hunter G. (1928), *A new test for ergothioneine upon which is based a method for its estimation in simple solution and in blood-filtrates*. *Biochem. J.*, 22, 4—10.
- [33] Augusto O., Radi R. (1995), *Peroxyntirite reactivity: free radical generation, thiol oxidation and biological significance*. W: *Biothiols in health and disease*. Eds. Packer L., Cadenas E., Marcel Dekker Inc., New York, Basel, Hong Kong, 83-116.
- [34] Bartosz G. (1995), *Strategia ataku*. W: *Druga twarz tlenu*. PWN, Warszawa, 13-134.
- [35] Romero F., Ordóñez I., Arduini A., Cadenas E. (1992), *The reactivity of thiols and disulfides with different redox states of myoglobin. Redox and addition reactions and formation of thyl radical intermediates*. *J. Biol. Chem.*, 267, 1680-1688.
- [36] Asmus K.D., Bensasson R.V., Bernier J.L., Houssin R., Land E.J. (1996), *One-electron oxidation of ergothioneine and analogues investigated by pulse radiolysis: redox reaction involving ergothioneine and vitamin C*. *Biochem. J.*, 315, 625-629.
- [37] Hunter G. (1949), *The determination of ergothioneine in simple solution and in blood*. *Can. J. Res.*, 27, 230-239.
- [38] Jocelyn P.C. (1958), *The distribution of ergothioneine in blood as determined by a new method of estimation*. *Biochem. J.*, 70, 656-660.
- [39] Carlsson J., Kierstan M.P.J., Brocklehurst K. (1974), *A convenient spectrophotometric assay for the determination of L-ergothioneine in blood*. *Biochem. J.*, 139, 237-242.
- [40] Fahey R.C., Newton G.L., Dorian R., Kosower E.M. (1980), *Analysis of biological thiols: derivatization with monobromotrimethylammoniumbimane and characterization by electrophoresis and chromatography*. *Anal. Biochem.*, 107, 1—10.
- [41] Kuninori T., Nishiyama .I. (1991), *Measurement of biological thiols and disulfides by high-performance liquid chromatography and electrochemical detection of silver mercaptide formation*. *Anal. Biochem.*, 197, 19-24.
- [42] Melville D.B., Lubschetz R. (1953), *A method for the determination of ergothioneine in blood*. *J. Biol. Chem.*, 200, 275-285.

- [43] Cargnoni A., Bernocchi P., Ceconi C., Curello S., Ferrari R. (1995), *In vitro administration of ergothioneine failed to protect isolated ischaemic and reperfused rabbit heart*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1270, 173-178.
- [44] Whiteman M., Halliwell B. (1997), *Thiols and disulphides can aggravate peroxynitrite-dependent inactivation of a antiproteinase*. *FEBS Letters*, 414, 497-500.
- [45] Sen C.K. (2000), *Cellular thiols and redox-regulated signal transduction*. *Curr. Top. Cell. Regul.*, 36, 1-30.
- [46] Zhang Z.Y., Dixon J.E. (1993), *Active site labelling of the Yershinia protein tyrosine phosphatase: the determination of the pKa of the active site cysteine and the function of the conserved histidine 402*. *Biochemistry*, 32, 9340-9345.
- [47] Torok I., Surdy P., Rockenbauer A., Korecz L.Jr, Anthony G.J., Koolhaas A., Gajda T. (1998), *Nickel(II)-, copper(II)- and zinc(II)-complexes of some substituted imidazole ligands*. *J. Inorg. Biochem.*, 71, 7-14.
- [48] Kapinos L.E., Song B., Sigel H. (1998), *Metal ion-coordinating properties of imidazole and derivatives in aqueous solution: interrelation between complex stability and ligand basicity*. *Inorg. Chim. Acta*, 280, 50-56.
- [49] Sigel H., Saha A., Saha N., Carloni P., Kapinos L.E., Griesser R. (2000), *Evaluation of intramolecular equilibria in complexes formed between substituted imidazole ligands and nickel(II), copper(II) and zinc(II)*. *J. Inorg. Biochem.*, 78, 129-137.
- [50] Rabenstein D.L., Isab A. A. (1982), *A proton nuclear magnetic resonance study of the interaction of mercury with intact erythrocytes*. *Biochim. Biophys. Acta*, 721, 374-384.
- [51] Hartman P.E., Hartman Z., Ault K.T. (1990), *Scavenging of singlet molecular oxygen by imidazole compounds: high and stained activities of carboxy terminal histidine dipeptides and exceptional activity of imidazole-4-acetic acid*. *Photochem. Photobiol.*, 51, 59-66.
- [52] Turner E., Klevit R., Hopkins P.B., Shapiro B.M. (1986), *Ovothiol: a novel thiohistidine compound from sea urchin eggs that confers NAD(P)H-O₂ oxidoreductase activity on ovoperoxidase*. *J. Biol. Chem.*, 261, 13056-13063.
- [53] Marjanovic B., Simic M.G., Jovanovic S.V. (1995), *Heterocyclic thiols as antioxidants: why ovothiol C is a better antioxidant than ergothioneine*. *Free Radical Biol. & Med.*, 18, 679-685.
- [54] Weaver K.H., Rabenstein D.L. (1995), *Thiol/disulfide exchange reactions of ovothiol A with glutathione*. *J. Am. Chem. Soc.*, 117, 1904-1907.