

Wolne rodniki w dymie tytoniowym – metody analizy i znaczenie biomedyczne

Free radicals in tobacco smoke – analytical approach and biomedical significance

Leon Kośmider^{1, 2 (b, c)}, Jakub Knysak^{2 (b, c)}, Michał Gawron^{2 (b, c)}, Jan Czogała^{2 (a)},
Maciej Łukasz Goniewicz^{3 (a, b)}



mgr Leon Kośmider

¹ Zakład Szkodliwości Chemicznych i Toksykologii Genetycznej, Instytut Medycyny Pracy i Zdrowia Środowiskowego w Sosnowcu

Kierownik Zakładu: prof. dr hab. n. med. A. Sobczak, dyrektor instytutu: dr n. med. P. Brewczyński

² Zakład Chemii Ogólnej i Nieorganicznej, Wydział Farmaceutyczny w Sosnowcu
Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Kierownik Zakładu: prof. dr hab. n. med. A. Sobczak

Dziekan Wydziału: dr hab. n. farm. S. Boryczka

³ Department of Health Behaviour

Division of Cancer Prevention and Population Sciences

Roswell Park Cancer Institute, Buffalo, USA

prof. dr A. Hyland, PhD, dyrektor instytutu: prof. D. Trump, MD, FACP

(a) koncepcja

(b) zebranie materiału do badań

(c) opracowanie tekstu i piśmiennictwa

STRESZCZENIE

Wolne rodniki – atomy lub grupy atomów, zawierające jeden lub więcej niesparowanych elektronów, są jednym z wielu czynników odpowiedzialnych za toksyczne właściwości dymu tytoniowego. Rodniki powstają w wyniku procesów spalania oraz procesów pirolizy, zachodzących w stożku żarzenia w trakcie wypalania papierosa. Niektóre rodniki występujące w dymie tytoniowym mają względnie długi okres półtrwania (ponad 5 min.). W niniejszej pracy omówiono nowoczesne metody analityczne służące do identyfikacji i ilościowej analizy wolnych rodników w próbkach dymu tytoniowego, ze szczególnym uwzględnieniem elektronowego rezonansu paramagnetycznego, w połączeniu z metodą pułapkowania spinowego. W pracy dokonano przeglądu istniejących poglądów na temat roli wolnych rodników w etiologii określonych chorób układu krążenia i układu oddechowego u palaczy, a także potencjalnych mechanizmów biochemicznych odpowiedzialnych za różne stany patologiczne (zaburzenia procesów peroksydacji lipidów, modyfikacje struktury i aktywności acylotransferazy lecytyna:cholesterol i poziomu lipoproteiny wysokiej gęstości, nadwrażliwość na substancję P i inaktywację obojętnej endopeptydazy).

Słowa kluczowe: wolne rodniki, dym tytoniowy, EPR, pułapkowanie spinowe

SUMMARY

Free radicals, i.e. atoms or groups of atoms containing one or more unpaired electrons, are significant constituents of tobacco smoke that contribute to its toxic properties. Radicals are generated during complex pyrolysis and combustion reactions in burning a cigarette cone. It has been shown that some free radicals found in tobacco smoke have relatively long half-time life (over 5 mins). We have reviewed modern analytical methods used for identification and quantitative analysis of free radicals in tobacco smoke, particularly the electron paramagnetic resonance combined with a spin-trapping approach. We also discussed the role of free radicals in etiology of respiratory and cardiovascular conditions among smokers. Finally, we reviewed biochemical mechanisms of various pathological conditions, including disturbances in lipid peroxidation, activity modification of lecithin-cholesterol acyltransferase and level high density lipoprotein, hyperactivity to substance P, and inactivation of neutral endopeptidase, that are thought to be contributed by free radicals from tobacco smoke.

Key words: free radicals, cigarette smoke, EPR, spin-trapping

WSTĘP

Według Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) czynne palenie tytoniu jest jednym z głównych czynników powodujących śmierć wśród ludzi na świecie poprzez choroby spowodowane przez toksyczne składniki dymu tytoniowego. Każdego roku palenie tytoniu zabija ponad 5 milionów ludzi, a liczba ta z roku na rok się zwiększa. Większość zgonów rejestruje się w krajach słabo i średnio rozwiniętych. WHO, szacuje także, że bierne palenie zabija każdego roku 600.000 osób, gdyż około jednej trzeciej populacji dorosłych na świecie jest narażonych na dym tytoniowy „z drugiej ręki” (ang. *second-hand smoke*). Jeśli ekspansja wyrobów tytoniowych na rynki azjatyckie i afrykańskie będzie się utrzymywać na stałym poziomie to w 2030 roku z powodu palenia zginie 8 milionów ludzi, a do końca wieku liczba ofiar może sięgnąć miliarda. WHO przewiduje również, że w roku 2020 choroby sercowo-naczyniowe spowodowane paleniem będą główną przyczyną zgonów w skali globalnej [1].

Do głównych toksycznych składników dymu tytoniowego zalicza się m.in. tlenek węgla, wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne, nitrozoaminy, związki karbonylowe, oraz aminy aromatyczne. Dym tytoniowy stanowiący mieszaninę blisko 6 tysięcy związków chemicznych klasyfikowany jest jako bezpośredni czynnik toksyczny o udowodnionych właściwościach kancerogennych. Wśród tysięcy toksycznych związków zidentyfikowanych dotychczas w dymie papierosowym znajdują się także wolne rodniki [2, 3].

Według nomenklatury związków nieorganicznych Polskiego Towarzystwa Chemicznego i Międzynarodowej Unii Chemii Czystej i Stosowanej pod pojęciem wolnych rodników rozumie się „atom lub grupę atomów mających jeden lub więcej niesparowanych elektronów” [4]. Rodniki mogą nie posiadać ładunku ($\text{CH}_3\cdot$, $\text{NO}\cdot$, $\text{NO}_2\cdot$), mogą wykazywać ładunek ujemny ($\text{O}_2^{\cdot-}$) lub dodatni ($\text{UO}_2^{\cdot+}$) [5]. Cechą szczególną wolnych rodników jest ogromna reaktywność, wynikająca z obecności na ostatniej powłoce elektronowej niesparowanego elektronu. Z względnie dużej reaktywności wynika fakt, że rodniki są z reguły strukturami nietrwałymi. Przykładowo czas półtrwania rodnika hydroksylowego ($\text{OH}\cdot$) wynosi zaledwie 10^{-9} sekundy [6].

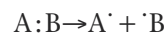
Uważa się, że toksyczne działanie wolnych rodników związane jest głównie z ich destrukcyjnym wpływem na struktury błon komórkowych. Bezpośrednią przyczyną tego działania jest inicjowana przez wolne rodniki reakcja peroksydacji lipidów. Ponadto wolne rodniki mogą wpływać niekorzyst-

nie na inne cząsteczki biogenne w tym na kluczowe enzymy np. acylotransferazy lecytyna:cholesterol (LCAT). Należy zaznaczyć, iż ochronną funkcję w stosunku do rodników pełnią w organizmie niektóre enzymy (dysmutazy ponadtlenkowe, katalaza czy enzymy zależne od glutationu) i przeciwutleniacze (antyoksydanty), do których należą m.in. witamina E, kwas askorbinowy, dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy i zredukowany glutation [7].

WOLNE RODNIKI W DYMIE PAPIEROSOWYM

Wolne rodniki, stanowią jedna z grup substancji toksycznych występujących w dymie papierosowym, powstają w wyniku procesów spalania, czyli energicznego utleniania, oraz procesów pirolizy, czyli termicznego rozkładu. Oba wyżej wymienione procesy zachodzą w trakcie wypalania papierosa, w obszarze zwanym stożkiem żarzenia. W obrębie stożka żarzenia wyróżnić można strefę spalania, w której zachodzi egzoenergetyczne utlenianie, oraz obszar pirolizy, gdzie dominują procesy endoenergetycznego rozkładu substancji. Proces wypalania papierosa składa się z powtarzających się po sobie cykli: zaciągnięcia i przerwy między zaciągnięciami. Intensyfikację obu wspomnianych powyżej procesów obserwuje się w trakcie trwania zaciągnięcia.

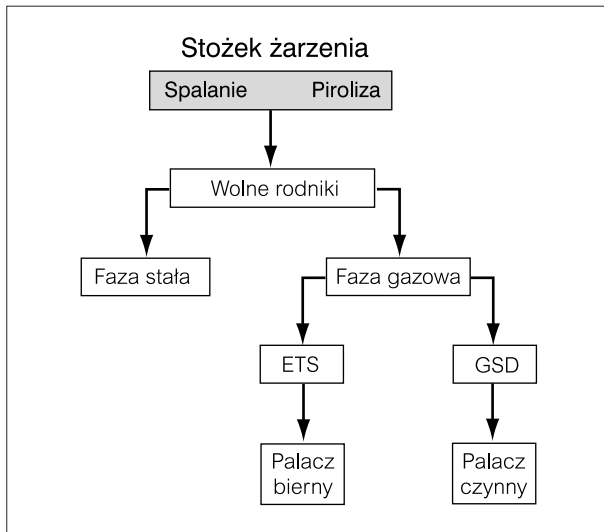
Zarówno proces spalania, jak i pirolizy, mogą mieć charakter wolnorodnikowy. Ze względu na korzystne warunki energetyczne (w trakcie trwania zaciągnięcia temperatura może dochodzić do $900\text{--}1000^\circ\text{C}$) możliwy jest homolityczny rozpad cząsteczki związku na rodniki:



Jednak decydującą rolę w powstawaniu wolnych rodników odgrywają tlenki azotu: NO i NO_2 które ze względu na obecność w ich cząsteczkach niesparowanego elektronu są rodnikami i określane są często jako reaktywne formy azotu.

Wykazano, że wolne rodniki znajdują się zarówno w fazie cząstkowej dymu (często określanej jako substancje smoliste), jak i w fazie gazowej. Głównymi rodnikami we frakcji smolistej są rodniki semichinonowe ($\text{QH}\cdot$) będące w równowadze z formami chinonowymi (Q) i hydrochinonowymi (QH_2). Rodniki zawarte w dymie papierosowym uzyskują kontakt z wewnętrznymi strukturami organizmu w momencie wnikięcia do przewodu oddechowego w trakcie zaciągnięcia się palacza. Do płuc dostaje się wówczas tzw. główny strumień dymu (GSD), który stanowi główne zagrożenie dla palacza czyn-

nego. Rodniki obecne w dymie wydychanym z płuc palacza, oraz w dymie emitowanym przez tłący się papieros w przerwach między zaciągnięciami, w dymie dyfundującym przez bibułkę papierosa – czyli w środowiskowym dymie papierosowym (ang. *environmental tobacco smoke* – ETS) stanowią zagrożenie dla palaczy biernych. Schemat dystrybucji wolnych rodników generowanych w papierosie i przechodzących do dymu papierosowego przedstawiono na Ryc. 1.



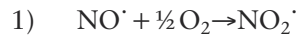
Ryc. 1. Schemat dystrybucji wolnych rodników powstających w czasie wypalania papierosa

Fig.1. Generation and distribution of free radicals generated during cigarette smoke

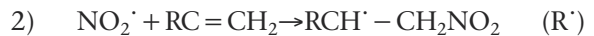
Czas, w którym można zidentyfikować wolne rodniki w próbce dymu papierosowego od momentu jego wygenerowania wynosi ponad 5 min., co mogłoby wydawać się sprzeczne z ich wysoce reaktywną naturą, a co za tym idzie bardzo krótkim okresem półtrwania. Jednocześnie zawartość rodników w wygenerowanym dymie papierosowym wykazuje charakterystyczną zmienność. Ich stężenie wzrasta z czasem i osiąga maksimum po 70–80 sekundach, a następnie ulega obniżeniu. Ponieważ analogiczne zmiany stężenia zaobserwowano w przypadku ditlenku azotu NO₂, Pryor i wsp. [8] zaproponowali model, który tłumaczy mechanizm powstawania wolnych rodników w dymie papierosowym.

Według zaproponowanej hipotezy wolne rodniki znajdujące się w dymie papierosowym nie powstają wprost w stożku żarzenia w momencie spalania tytoniu, lecz tworzą się stale w reakcjach zachodzących w fazie gazowej, i jednocześnie w tych samych warunkach ulegają eliminacji lub innym reakcjom

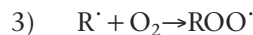
powodującym ich zanik, czyli tzw. terminacji. Model Pryora i wsp. [8] przewiduje występowanie względnie stabilnego stanu równowagi dynamicznej wolnych rodników w dymie. Reakcją inicjującą powstawanie wolnych rodników jest powolne utlenianie tlenku azotu NO do ditlenku NO₂ (reakcja 1). Tlenek azotu występuje normalnie w dymie papierosowym w ilości ok. 300 mg w przeliczeniu na jeden papieros [9].



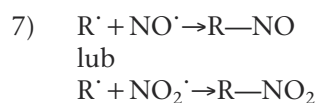
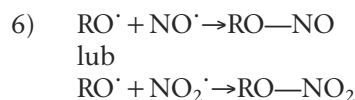
Tlenek azotu jest gazem niereaktywnym, w przeciwieństwie do jego ditlenku, który może wchodzić w reakcję np. z nienasyconymi węglowodorami, co prowadzi właśnie do powstania wolnych rodników (reakcja 2).



Powstające w powyższej reakcji rodniki alkilowe reagują gwałtownie z tlenem, dając rodniki nadtlenkowe (reakcja 3), a te następnie wchodzi w reakcje z tlenkiem azotu, co prowadzi do otrzymania rodników alkoksylowych (reakcja 4).



W końcowym etapie, terminacja powstałych w powyższych reakcjach rodników prowadzi do utworzenia ich adduktów z tlenkami azotu (reakcje 5, 6 i 7).



METODY ANALIZY WOLNYCH RODNIKÓW

Do analizy wolnych rodników, zarówno ich jakościowego i ilościowego oznaczania, bardzo rzadko stosuje się standardowe metody analityczne jak np. spektroskopię w podczerwieni, spektroskopię UV-Vis, czy spektroskopię fluorescencyjną [9]. Przeszkodą jest mała specyficzność wymienionych metod względem wolnych rodników, wynikająca m.in. ze składu dymu papierosowego, który zawiera blisko 6 tysięcy związków chemicznych [10]. Seletywne oznaczanie wolnych rodników stanowi również problem ze względu na ich minimalną zawar-

tość w dymie papierosowym. Stąd do ich analizy niezbędna jest metoda, która charakteryzuje się wysoką specyficznością względem tych molekuł. Takie wymagania spełnia elektronowy paramagnetyczny rezonans (EPR).

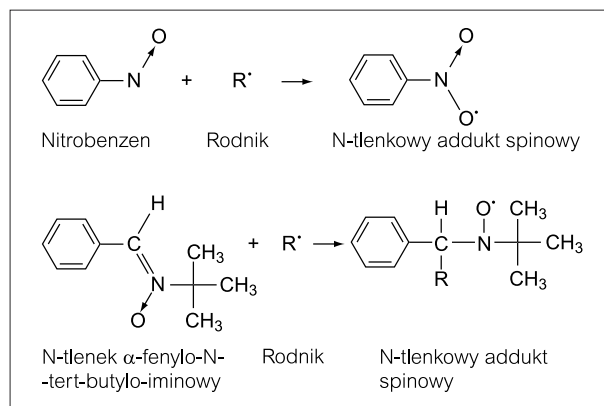
EPR (inna nazwa: elektronowy rezonans spinowy – ESR), początkowo wykorzystywany był w fizyce do badań strukturalnych kompleksów metali przejściowych i lantanowców. Nowe perspektywy wykorzystania EPR w chemii pojawiły się po odkryciu możliwości jego zastosowania do badań cząsteczek o właściwościach paramagnetycznych. Paramagnetyzm cząsteczek lub jonów wynika z obecności jednego lub kilku niesparowanych elektronów. Elektrony ulegają orientacji przestrzennej pod wpływem przyłożonej indukcji magnetycznej, która może spowodować rozszczepienie poziomów energetycznych i tym samym wystąpienia zjawiska rezonansu. Analizy dokonuje się za pomocą skomplikowanych aparatów, a analizie poddaje się otrzymane za ich pomocą widma [11].

Do głównych zalet metody EPR, oprócz wspomnianej wyżej selektywności względem cząsteczek paramagnetycznych (rodników, birodników itp.), należy także mały wpływ innych substancji znajdujących się w próbce, stąd nie jest konieczny pracochłonny proces wyodrębniania rodników, a co za tym idzie unika się w ten sposób ewentualnych strat analitu. Analizując widma EPR można wykorzystać również zjawisko nadsubtelnego oddziaływania niesparowanego elektronu ze spinami sąsiednich jąder do przewidywania struktury konstytucyjnej i przestrzennej danej cząsteczki. Słabą stroną metody EPR jest niezadowalająca czułość: w optymalnych warunkach można uzyskać czułość do 10^{-9} mola/l objętości próbki. Jednak zawartość rodników w próbkach gazowych często jest poniżej podanego progu [11]. Metoda traci również na czułości w przypadku analizy wieloatomowych cząsteczek, kiedy to następują przesunięcia w widmie na skutek oddziaływań momentu obrotowego, spinu elektronowego i orbitalnych momentów magnetycznych. Próba podwyższenia czułości przyrządów pomiarowych jest spektrometr LMR – laserowego magnetycznego rezonansu. W tego typu przyrządach czułość jest o 4–5 rzędów lepsza niż w tradycyjnych spektrometrach EPR.

Innym problemem związanym z metodą EPR jest to, że przyrząd pomiarowy umiejscowiony jest zazwyczaj stacjonarnie. Choć postęp w konstruowaniu coraz mniejszych aparatów pomiarowych jest znaczny, często próbki pobierane są w różnych miejscach (m.in. pomieszczenia w których dopuszczalne jest palenie papierosów) i konieczny jest

transport próbki z miejsca pobrania do aparatu. Próbki najczęściej zawierają mieszaninę dużej ilości rodników o podobnej strukturze i stąd istnieje konieczność ich selektywnego rozdzielania. Rozwiązanie tych problemów stanowi opisana poniżej metoda nazwana pułapkowaniem spinowym (ang. *spin-trapping*).

Zasada metody spin-trapping opiera się na związaniu nietrwałego rodnika ze związkiem określanym jako pułapka spinowa, tak aby powstał trwały rodnik tzw. addukt spinowy. Typowymi pułapkami spinowymi są organiczne związki nitrozowe i N-tlenki iminowe (związki nitronowe). W wyniku addycji rodnika powstają odpowiednie N-tlenki, co zilustrowane zostało na Ryc. 2 [11].



Ryc. 2. Powstawanie adduktów spinowych

Fig. 2. Generation of spin adducts

Różnice między pułapkami typu N-tlenków iminowych i związków nitrozowych są następujące: addukty do związków nitrozowych, ze względu na obecność tylko jednego podstawnika przy grupie funkcyjnej, dają dokładniejsze i łatwiejsze do interpretacji sygnały widma – nie ma efektów związanych z oddziaływaniem nadsubtelnym. Kolejną zaletą pułapek nitrozowych jest ich większa reaktywność w porównaniu z N-tlenkami iminowymi, a co za tym idzie łatwiej wyłapują rodniki z mieszaniny reakcyjnej. Do wad pułapek nitrozowych należy ich fotochemiczna i termiczna labilność oraz brak reakcji z rodnikami z niesparowanym elektronem na atomie tlenu. Stąd do analizy wolnych rodników częściej używane są pułapki typu N-tlenków iminowych.

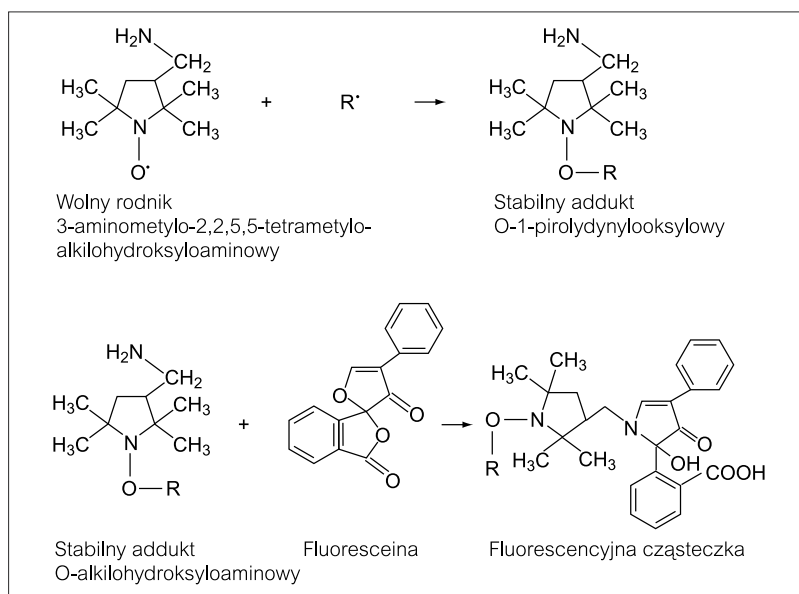
Analiza widm EPR mieszaniny rodników również stanowi wyzwanie analityczne. Zbliżone parametry widmowe uniemożliwiają identyfikację składników złożonej mieszaniny rodników. Stąd wynika konieczność ich wstępnego rozdzielenia, a następnie poddania analizie jakościowej i ilościowej poszczegól-

gólnych rodników. Taką procedurę umożliwiają sprzężone ze sobą aparaty analityczne: chromatografy, spektroskopy EPR, a także spektroskopy mas. W analizie rodników zastosowano przykładowe układy: spektrometria mas (MS), wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC), chromatografia cieczowa ze spektrometrią mas (LC/MS), chromatografia gazowa ze spektrometrią mas (GC/MS) oraz chromatografia cieczowa sprzężona z elektronowym rezonansem magnetycznym oraz spektrometrią mas (LC/EPR/MS). Każda z tych metod posiada zarówno zalety jak i wady. Przykładowo, ze względu na wysoką temperaturę rozdzielania w chromatografii gazowej addukty spinowe ulegają rozkładowi. Z drugiej strony sama spektrometria mas nie daje rozdzielania rodników. Stąd najlepsze efekty osiągnięto wykorzystując techniki łączone np. układ LC/EPR/MS (oraz jego doskonalszą modyfikację – z zastosowaniem MS z jonizacją strumieniem elektronów) [12]. Wadą tej metody okazała się obniżona czułość, którą można w pewnym stopniu skompensować poprzez zapewnienie odpowiednio długiej ekspozycji próbki na pułapkę spinową, co zapewnia odpowiednio wysokie stężenia na starcie analizy.

Jak wspomniano we wstępie, podczas generowania GSD powstają zarówno krótkotrwałe, jak i stabilne rodniki. W celu pozyskania obu typów rodników do analizy wykorzystuje się omówioną powyżej metodę pułapkowania spinowego. Pułapką spinową wykorzystywaną w analizie dymu papierosowego jest najczęściej N-tlenek α -fenylo-N-tetrabutyliminowy (PBN) rozpuszczony w benzenie lub zaadsorbowany na żelu silikonowym [12] albo na szklanych adsorbentach [9]. Wydajność tego typu pułapkowania wynosi do 47%. Ilość rodników wykrytych tą metodą w przeliczeniu na jedno zaciągnięcie dymu (35 ml) wynosi średnio $1 \cdot 10^{18}$ [12].

Przykładem zastosowania opisanej techniki EPR w połączeniu z pułapkowaniem spinowym jest metoda opisana przez Pryor i wsp. [8]. Badacze zastosowali opisaną powyżej pułpkę spinową PBN i porównali różne techniki pułapkowania: PBN w roztworze, szklany filtr pokryty PBN oraz PBN zaadsorbowany na żelu. Wykorzystując wspomniane techniki w dymie papierosowym wykryto głównie rodniki alkoksylowe, a także rodniki z centralnym atomem węgla oraz addukty homolityczne rodników alkoksylowych do pierścieni aromatycznych. Zawartość wolnych rodników w dymie papierosowym została oszacowana na 10^{16} spinów/papieros.

Odmiennie podejście do problemu oznaczania wolnych rodników w próbkach dymu tytoniowego przedstawili Johnson i wsp. [13]. Wykorzystali oni technikę spektroskopii fluorescencyjnej. Wolne rodniki zawarte w próbce reagowały z pochodną piroldynylooksylową, w wyniku czego powstawał trwały addukt, który poddawano reakcji z fluoresceiną i w tej postaci oznaczano fluorymetrycznie (Ryc. 3).



Ryc. 3. Zasada metody oznaczania wolnych rodników zastosowana przez G. Johnson, S. Caron, N.V. Blough [13]

Fig. 3. The principle of free radicals determination method used by G. Johnson, S. Caron, N.V. Blough [13]

ZNACZENIE BIOMEDYCZNE WOLNYCH RODNIKÓW ZAWARTYCH W DYMIE TYTONIOWYM

Wpływ wolnych rodników znajdujących się w dymie tytoniowym na struktury biologiczne i cząsteczki endogenne jest wielokierunkowy, a obserwowane efekty biologiczne są znacznie zróżnicowane. Wiele efektów objawiających się po ekspozycji organizmu na dym tytoniowy przypisuje się właśnie reaktywnym formom rodnikowym.

Główne działania toksyczne wolnych rodników związane jest z ich mutagennymi właściwościami. Wolne rodniki jako struktury bardzo reaktywne mogą wchodzić w reakcje z biogennymi cząsteczkami, w tym m.in. z kwasami nukleinowymi, powodując w ten sposób zmiany w ich strukturze. Mogą wpływać w ten sposób na cechy fenotypowe i prowadzić do zaburzeń w funkcjonowaniu komórki, a także do procesów nowotworzenia.

Można założyć, że w przypadku, w którym wolne rodniki nie ulegną bezpośrednio reakcji z cząsteczką DNA, mogą stanowić aktywator innych cząsteczek, które w wyniku reakcji z wolnym rodnikiem będą nabywały właściwości mutagennych. Przykładowo anionorodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\cdot -}$) reaguje tworząc nadtlenek wodoru, który w kolejnych etapach ulega przemianom do m.in. rodników hydroksylowych OH^{\cdot} . Rodniki OH^{\cdot} stanowią wówczas bezpośrednią przyczynę zmian w strukturze DNA [14].

Alternatywnym mechanizmem, za pośrednictwem którego wolne rodniki mogą wpływać na aparat genetyczny komórki, jest modyfikacja aktywności enzymów odpowiedzialnych za naprawę cząsteczki DNA. Upośledzony aparat naprawczy nie jest w stanie odpowiednio szybko i dokładnie usuwać powstałych mutacji, które są powielane w kolejnych podziałach komórkowych, i które stają się odpowiedzialne za zmiany aktywności białek kodowanych przez dany gen, w obrębie którego zaszła mutacja.

Wykazano, że peroksydaza glutationowa, reduktaza glutationowa, dysmutaza ponadtlenkowa i katalaza stanowią bardzo ważną barierę biologiczną przeciw destrukcyjnemu wpływowi oksydantów, w tym przede wszystkim wolnych rodników [7]. Stwierdzono, że dym tytoniowy w sposób zależny od czasu ekspozycji i dawki, wpływa na aktywność dysmutazy u szczurów. Aktywność peroksydazy glutationowej była dodatnio skorelowana wyłącznie ze stężeniem dymu papierosowego, natomiast nie stwierdzono korelacji z czasem ekspozycji [15].

Innym przykładem wpływu wolnych rodników na procesy biochemiczne zachodzące w organizmie są zmiany w procesach peroksydacji lipidów, prowadzące do powstawania zmian histopatologicznych w krtani, oskrzelach i płucach. Przeprowadzone badania na chomikach eksponowanych na dym tytoniowy [16], potwierdziły jego wpływ na wczesne zmiany nowotworowe w układzie oddechowym. Kojarząc te zmiany z modyfikacją poziomu malonyldialdehydu (wskaźnik aktywności procesów peroksydacji) oraz poziomu form nadtlenkowych lipidów w osoczu, wyprowadzono wniosek o wpływie wolnych rodników na obserwowane patologiczne zmiany [16]. Huang i wsp. postawili hipotezę, że głównym powodem zapadania na raka płuc przez palaczy są reaktywne formy tlenu, które występują w korelacji z wolnymi rodnikami [17].

Na podstawie badań świnek morskich poddanych ostrej ekspozycji na dym tytoniowy, wolnym rodnikom przypisano także udział w inhibicji enzymu obojętnej endopeptydazy oraz nadwrażliwość mięśni okężnych oskrzeli na mediator jakim jest substancja P [18].

Poszukując przyczyn zwiększonego ryzyka występowania choroby wieńcowej u palaczy, zaproponowano teorię, na podstawie której tłumaczy się wpływ oksydantów zawartych w dymie tytoniowym, w tym także wolnych rodników, na powyższą jednostkę chorobową. Według tej teorii oksydanty powodują inhibicję kluczowego enzymu w gospodarce cholesterolowej organizmu, a mianowicie LCAT. Następuje ponadto zmiana właściwości cząsteczek transportujących lipidy m.in. HDL – wzrost ładunku ujemnego oraz wymiana lipoprotein AI z AII [19].

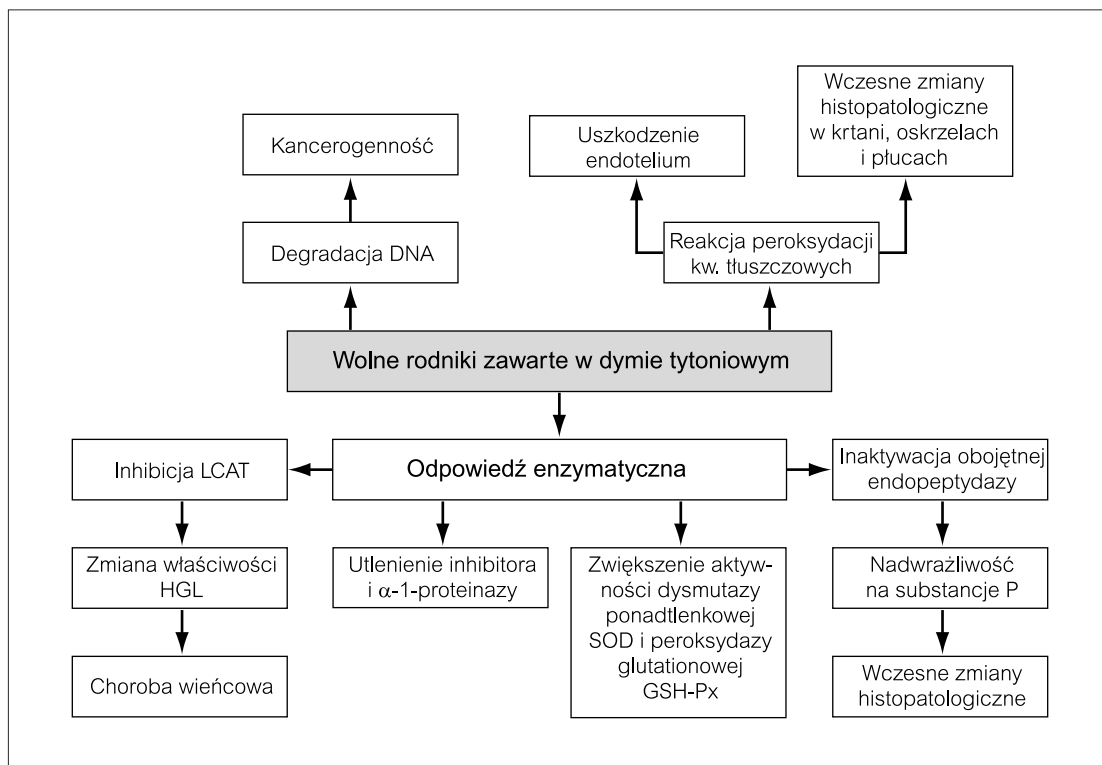
Kolejnym dowodem potwierdzającym toksyczny wpływ wolnych rodników na funkcjonowanie żywego organizmu, jest zmniejszenie skutków ich niekorzystnego działania pod wpływem antyoksydantów, tj. związków eliminujących bądź obniżających poziom wolnych rodników. Do naturalnych wolnych oksydantów zaliczane są m.in. witaminy E i C, oraz b-karoten. Prowadząc doświadczenia na królikach eksponowanych na dym tytoniowy [20], udowodniono, że w przypadku obecności w diecie wysokiej dawki kwasu askorbowego (wit. C), nie stwierdzono uszkodzeń endotelium naczyń krwionośnych, które to zmiany obserwowane były w grupie kontrolnej, poddanej również ekspozycji na dym, ale pozbawionej źródła witaminy C. Udowodniono także redukujący wpływ hemoglobiny i pochodnych zawierających układ hemu, na poziom oksydantów w dymie tytoniowym. Impregnacja konwencjonalnych filtrów papierosowych hemo-

globiną, powodowała obniżenie stężenia m.in. tlenków azotu [21]. Dodatek innego antyoksydantu – pycnogenolu do filtrów papierosowych wg. Zhang i wsp. obniżył o 70% zawartość wolnych rodników w GSD oraz spowodował spadek o 48% mutagenności tego dymu oraz zmniejszył zmiany patologiczne w płucach myszy i szczurów narażonych na GSD [22]. Prace Culcasi i wsp., a także Lu i wsp., wskazywały na możliwość zmniejszania toksyczności wolnych rodników w dymie tytoniowym poprzez ich adsorpcję na zmodyfikowanym filtrze

papierosowym. Jednak sugerowane rozwiązania nie znalazły odzwierciedlenia w praktyce [16, 23].

Należy też zwrócić uwagę, że wolne rodniki wytwarzane w organizmie mogą pełnić również pozytywną rolę podczas walki z chorobotwórczymi mikroorganizmami czy aktywacji niektórych enzymów.

Opisane powyżej wielokierunkowe oddziaływanie wolnych rodników zawartych w dymie tytoniowym na organizm ludzki zilustrowano na schemacie przedstawionym na Ryc. 4.



Ryc. 4. Znaczenie biomedyczne wolnych rodników zawartych w dymie tytoniowym

Fig. 4. Pathophysiological activity of free radicals from tobacco smoke

WNIOSKI

W wypalonym papierosie tworzy się znaczna liczba substancji szkodliwych, w tym reaktywnych wolnych rodników, dodatkowo obecność w dymie tlenków azotu dramatycznie wydłuża czas życia wolnych rodników. Sprzyja to wprowadzaniu ich do ustroju palaczy i ułatwia niebezpieczne interakcje z organizmem. Nietrwałość wolnych rodników znacznie utrudnia ich analizę. Stała się ona możliwa dzięki opracowaniu metod pułapowania spinowego i wykorzystaniu selektywnej dla tych związków metody elektronowego rezonansu magnetycznego

lub ulepszonej metody laserowego rezonansu magnetycznego łączonego z innymi metodami instrumentalnymi jak spektroskopia mas.

Wpływ wolnych rodników znajdujących się w dymie tytoniowym na struktury biologiczne i cząsteczki endogenne jest wielokierunkowy, a obserwowane efekty biologiczne są znacznie zróżnicowane. Istnieją poważne przesłanki, że wiele obserwowanych negatywnych skutków zdrowotnych, występujących po ekspozycji organizmu na dym tytoniowy, związanych jest z reaktywnymi formami rodnikowymi. Do najważniejszych oddziaływań wolnych rodników na organizmy żywe należy ich destruk-

cyjny wpływ na strukturę błon komórkowych. Przypisuje się im właściwości mutagenne wynikające z reakcji z kwasami nukleinowymi, lub modyfikacji aktywności enzymów odpowiedzialnych za naprawę cząsteczki DNA.

Wolne rodniki powodują zmiany w procesach peroksydacji lipidów, co prowadzi do zmian histopatologicznych w krtani, oskrzelach i płucach. Poprzez inhibicję LCAT mogą powodować chorobę wieńcową. Inaktywują obojętną endopeptydazę co prowadzi do wczesnych zmian histopatologicznych.

PIŚMIENNICTWO

1. WHO REPORT on the global TOBACCO epidemic. MPOWER. Brazil: World Health Organization, 2008: 1-342.
2. Scott W.K., Zhang F., Stajich J.M. i wsp.: Family-based case-control study of cigarette smoking and Parkinson disease. *Neurology* 2005; 64: 442-447.
3. Sabbagh M.N., Tyas S.L., Emery S.C. i wsp.: Smoking affects the phenotype of Alzheimer disease. *Neurology* 2005; 64: 1301-1303.
4. Connelly N.G., Royal Society of Chemistry (Great Britain), International Union of Pure and Applied Chemistry. Nomenclature of inorganic chemistry. IUPAC recommendations 2005. Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry Publishing/IUPAC, 2005: 1-377.
5. Nieorganicznej P.T.C.K.N.C. Nomenklatura chemii nieorganicznej. Zalecenia 1990. Wrocław: Wydawnictwo Uniwersytetu Wrocławskiego, 1998: 1-377.
6. Feirman D.E., Winston G.W., Cederbaum A.I.: Ethanol Oxidation by Hydroxyl Radicals: Role of Iron Chelates, Superoxide, and Hydrogen Peroxide. *Alcohol Clin Exp Res* 1985; 9: 95-102.
7. Harper's illustrated biochemistry. New York: Lange Medical Books/McGraw-Hill, 2003; 746.
8. Pryor W.A., Tamura M., Church D.F.: Electron-Spin-Resonance Spin-Trapping Study of the Radicals Produced in Nox Olefin Reactions - a Mechanism for the Production of the Apparently Long-Lived Radicals in Gas-Phase Cigarette-Smoke. *J Am Chem Soc* 1984; 106: 5073-5079.
9. Flicker T.M., Green S.A.: Detection and separation of gas-phase carbon-centered radicals from cigarette smoke and diesel exhaust. *Anal Chem* 1998; 70: 2008-2012.
10. Perfetti T.A., Rodgman A.: The Complexity of Tobacco and Tobacco Smoke. *Beiträge zur Tabakforschung International* 2011; 24: 215-232.
11. Weil J.A., Bolton J.R.: Electron paramagnetic resonance: elementary theory and practical applications. 2nd ed. / John A. Weil, James R. Bolton. ed. Hoboken, N.J.: Wiley Chichester, John Wiley, 2007: 1-687.
12. Church D.F.: Spin Trapping Organic Radicals. *Anal Chem* 1994; 66: 418A-427A.
13. Johnson C.G., Caron S., Blough N.V.: Combined Liquid Chromatography/Mass Spectrometry of the Radical Adducts of a Fluorescamine-Derivatized Nitroxide. *Anal Chem* 1996; 68: 867-872.
14. Bohne C., Faulhaber K., Giese B. i wsp.: Studies on the Mechanism of the Photo-Induced DNA Damage in the Presence of Acridinium Salts Involvement of Singlet Oxygen and an Unusual Source for Hydroxyl Radicals. *J Am Chem Soc* 2004; 127: 76-85.
15. Florek E., Ignatowicz E., Piekoszewski W. i wsp.: Tobacco smoke effects the activity of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and total antioxidant status in pregnant and non-pregnant animals. *Przegl Lek* 2004; 61: 1104-1108.
16. Culcasi M., Muller A., Mercier A. i wsp.: Early specific free radical-related cytotoxicity of gas phase cigarette smoke and its paradoxical temporary inhibition by tar: An electron paramagnetic resonance study with the spin trap DEPMPO. *Chem Biol Interact* 2006; 164: 215-231.
17. Huang M.F., Lin W.L., Ma Y.C.: A study of reactive oxygen species in mainstream of cigarette. *Indoor Air* 2005; 15: 135-140.
18. Dusser DJ., Djokic T.D., Borson D.B. i wsp.: Cigarette smoke induces bronchoconstrictor hyperresponsiveness to substance P and inactivates airway neutral endopeptidase in the guinea pig. Possible role of free radicals. *J Clin Invest.* 1989; 84: 900-906.
19. McCall M.R., van den Berg J.J., Kuypers F.A. i wsp.: Modification of LCAT activity and HDL structure. New links between cigarette smoke and coronary heart disease risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1994; 14: 248-253.
20. Mays B.W., Freischlag J.A., Eginton M.T. i wsp.: Ascorbic Acid Prevents Cigarette Smoke Injury to Endothelium-Dependent Arterial Relaxation. *J Surg Res* 1999; 84: 35-39.
21. Deliconstantinos G., Villiotou V., Stavrides J C.: Scavenging effects of hemoglobin and related heme containing compounds on nitric oxide, reactive oxidants and carcinogenic volatile nitrosocompounds of cigarette smoke. A new method for protection against the dangerous cigarette constituents. *Anticancer Res* 1994; 14: 2717-2726.
22. Zhang D., Tao Y., Gao J. i wsp.: Pycnogenol® in cigarette filters scavenges free radicals and reduces mutagenicity and toxicity of tobacco smoke in vivo. *Toxicol Ind Health* 2002; 18: 215-224.
23. Lu X., Hua Z., Du G. i wsp.: Scavenging of free radicals in gas-phase mainstream cigarette smoke by immobilized catalase at filter level. *Free Radic Res* 2008; 42: 244-252.

Adres do korespondencji:

Leon Kośmider
Instytut Medycyny Pracy i Zdrowia Środowiskowego
ul. Kościelna 13
41-200 Sosnowiec
tel. 32 634 11 91