

## KOMPLEKSY PEPTYDÓW Z JONAMI $\text{Cu}^{2+}$ JAKO MIMETYKI DYSMUTAZY PONADTLENKOWEJ

### PEPTIDES COMPLEXES WITH $\text{Cu}^{2+}$ IONS AS MIMETICS OF SUPEROXIDE DISMUTASE

**Aleksandra Pieniężna, Aleksandra Kotynia\***

*Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu,  
Wydział Farmaceutyczny,  
ul. Borowska 211, 50-556 Wrocław  
\*e-mail: [aleksandra.kotynia@umed.wroc.pl](mailto:aleksandra.kotynia@umed.wroc.pl)*

---

Abstract

Wykaz stosowanych skrótów

Wprowadzenie

1. Charakterystyka dysmutaz nadadtlenkowych

2. Metody oznaczania aktywności CuZnSOD

3. Charakterystyka związków koordynacyjnych peptydów z jonami  $\text{Cu}^{2+}$   
a ich aktywność CuZnSOD

3.1. Peptydy liniowe

3.2. Peptydy cykliczne

3.3. Peptydy rozgałęzione (dendryczne)

Uwagi końcowe

Podziękowanie

Piśmiennictwo cytowane

---

**Mgr inż. Aleksandra Pieniężna** – absolwentka kierunku biotechnologia na Politechnice Wrocławskiej. Od 2019 roku zatrudniona na stanowisku asystenta w Katedrze i Zakładzie Chemii Nieorganicznej Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, gdzie naukowo zajmuje się koordynacją jonów metali z analogami związków peptydowych o znaczeniu biologicznym.



<https://orcid.org/0000-0003-4637-8335>

---

**Dr Aleksandra Kotynia** – ukończyła studia magisterskie na Wydziale Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego specjalności informatyka chemiczna. Od 2009 roku zatrudniona w Katedrze i Zakładzie Chemii Nieorganicznej, Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu. W 2018 roku uzyskała stopień doktora nauk farmaceutycznych. Jej zainteresowania naukowe koncentrują się wokół chemii bionieorganicznej, a w szczególności oddziaływania jonów metali przejściowych z peptydami.



<https://orcid.org/0000-0003-0730-8975>

### ABSTRACT

Disturbances in the balance between the rates of reactive oxygen species formation and the ability of cells to neutralize them are often cause dysfunction in the human body. Therefore the research on natural antioxidant systems protecting cells against destruction is very important. One of such system acting in human organism is superoxide dismutase (SOD), which is responsible for degradation of the superoxide radical anion into molecular oxygen and hydrogen peroxide. The SOD was discovered in the 40s of the twentieth century, and since then there has been a lot of research on it. Currently, these studies mainly concern searching compounds that may mimic the enzymatic activity of this protein. Groups of these compounds include, for example, peptides, salens, metalloporphyrins or vitamin derivatives. For the proper functioning of the CuZnSOD enzyme necessary is the active center containing metal ions (Rys.2). They mainly coordinate to the nitrogens of the imidazole histidine residues. Due to the fact that peptides may have many histidyl residues in their structure, they could rather than others coordinate with metal ions and they are promising compounds in studies on CuZnSOD mimetics. Therefore we will consider peptide complexes with copper(II) and zinc(II) ions as potential mimetics of superoxide dismutase. In presented review article we have focused on the differences in the coordination manner of divalent copper ions by linear, cyclic and branched peptides. As well as the possibility of creating hetero- and homo-dinuclear complexes are discussed. Moreover we have compared the ability of these complexes to decomposition the superoxide radical with activity of native enzyme.

Keywords: superoxide dismutase, copper complexes, antioxidant properties, peptides, histidyl residue

Słowa kluczowe: dysmutaza ponadtlenkowa, związki kompleksowe miedzi, właściwości przeciwutleniające, peptydy, reszta histydylowa

---

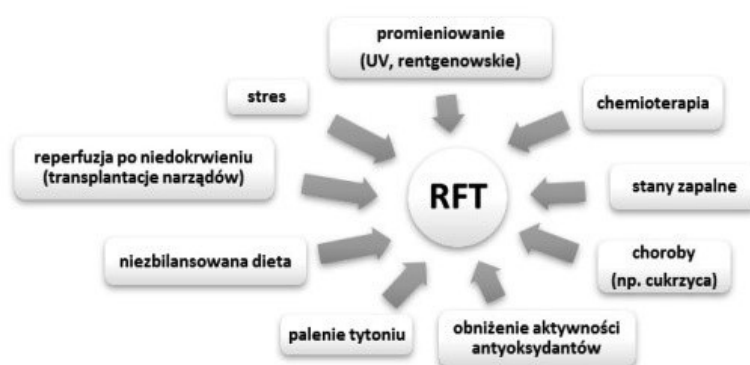
## WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

|                        |                                                                                                              |
|------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| BESOD                  | – dysmutaza nadtlenkowa z wołowych erytrocytów (ang. <i>bovine erythrocyte CuZn-superoxide dismutase</i> )   |
| CuZnSOD                | – cytoplazmatyczna izoforma dysmutazy nadtlenkowej (ang. <i>CuZn-superoxide dismutase</i> )                  |
| cyt c—Fe <sup>2+</sup> | – forma zredukowana cytochromu c                                                                             |
| cyt c—Fe <sup>3+</sup> | – forma utleniona cytochromu c                                                                               |
| Dap                    | – kwas 2,3-diaminopropionowy                                                                                 |
| ECSOD                  | – zewnątrzkomórkowa izoforma dysmutazy nadtlenkowej (ang. <i>extra celullal superoxide dismutase</i> )       |
| FeSOD                  | – żelazowa dysmutaza nadtlenkowa (ang. <i>Fe-superoxide dismutase</i> )                                      |
| GPx                    | – peroksydaza glutationowa (ang. <i>glutathione peroxidase</i> )                                             |
| IC <sub>50</sub>       | – stężenie, które powoduje zahamowanie reakcji wolnorodnikowej w 50% (ang. <i>inhibitory concentration</i> ) |
| k                      | – stała szybkości reakcji chemicznej                                                                         |
| L                      | – ligand                                                                                                     |
| MnSOD                  | – manganowa dysmutaza nadtlenkowa (ang. <i>Mn-superoxide dismutase</i> )                                     |
| NBT                    | – błękit nitrotetrazolowy (ang. <i>nitro blue tetrazolium</i> )                                              |
| NiSOD                  | – niklowa dysmutaza nadtlenkowa (ang. <i>Ni-superoxide dismutase</i> )                                       |
| PrP <sup>C</sup>       | – komórkowe białko prionowe (ang. <i>cellular prion protein</i> )                                            |
| RFT                    | – reaktywne formy tlenu                                                                                      |
| Sar                    | – sarkozyna – N-metyloglicyna                                                                                |
| SOD                    | – dysmutaza nadtlenkowa (ang. <i>superoxide dismutase</i> )                                                  |

Do nazw aminokwasów naturalnych zastosowano nomenklaturę jednoliterowych skrótów zgodną z IUPC. Wyjątek stanowią nazwy ligandów rozgałęzionych, gdzie zastosowano nomenklaturę trójliterowych skrótów.

## WPROWADZENIE

Reaktywne formy tlenu (RFT) są jedną z przyczyn niszczenia podstawowych struktur w organizmie człowieka, takich jak białka, lipidy, węglowodany czy kwasy nukleinowe. Ich powstawanie związane jest z fizjologicznymi procesami metabolizmu tlenu zachodzącymi w komórkach. Stają się one szkodliwe w momencie, kiedy zostanie zaburzona równowaga pomiędzy szybkością powstawania a zdolnością komórki do ich neutralizacji. Dzieje się tak pod wpływem wielu czynników (Rys. 1) [1, 2].

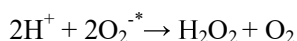


Rysunek 1. Przyczyny występowania podwyższonego poziomu reaktywnych form tlenu (RFT)  
Figure 1. The causes of the elevated levels of reactive oxygen species (ROS)

Podwyższony poziom RFT w organizmie może prowadzić do rozwoju chorób (*m.in.* astmy, chorób nowotworowych lub neurodegeneracyjnych), uszkodzenia narządów wewnętrznych, dysfunkcji naczyń krwionośnych, a także utrzymujących się przewlekłe zapaleń. Celem zapobiegania powstawaniu tych nieprawidłowości, organizmy wykształciły mechanizmy obronne w postaci przeciwutleniaczy. Do najważniejszych układów enzymatycznych regulujących poziom wolnych rodników należy dysmutaza nadtlenkowa, katalaza, peroksydaza i reduktaza glutationowa [3]. Badana od wielu lat dysmutaza nadtlenkowa uważana jest za jeden z najlepszych przeciwutleniaczy. W związku z tym tak dużo uwagi poświęca się poszukiwaniom substancji, które mogłyby naśladować działanie SOD. Do grup związków chemicznych, wśród których szuka się jej mimetyków należą *m.in.* peptydy, saleny, metaloporfiryny, pochodne fulerenów, tlenku azotu czy witamin [1]. Niniejszy artykuł stanowi przegląd aktualnej wiedzy na temat oddziaływania jonów miedzi(II) i/lub jonów cynku(II) z peptydami, których kompleksy wykazują aktywność dysmutazy nadtlenkowej.

## 1. CHARAKTERYSTYKA DYSMUTAZ PONADTLENKOWYCH

Historia dysmutazy ponadtlenkowej sięga roku 1938, kiedy to Mann i Keilin [4] po raz pierwszy wyizolowali z erytrocytów wołowych “niebieskie białko” zawierające 0,34% jonów miedzi(II) i nazwali je hemokupreina. Nie przypisywali mu jednak żadnych katalitycznych właściwości. Kilka lat później scharakteryzowano bardzo podobne metaloproteiny w ludzkich erytrocytach. Nazwano je erytrokupreina [5,6]. Ważnym momentem dla rozwoju prac nad tym białkiem stało się poznanie mechanizmu jego działania. Zaproponowano wtedy katalizę dysmutacji/dysproporcjonowania anionorodników ponadtlenkowych:



Nadano nową nazwę temu białku - dziś wszystkim znaną - dysmutaza ponadtlenkowa (SOD) [7–9]. Poznanie jej struktury zajęło kolejne kilkanaście lat. W 1987 roku udało się przybliżyć budowę SOD z erytrocytów wołowych [10], a w 1992 ludzkiej izoformy [11]. Obecność dysmutaz ponadtlenkowych wykryto u większości organizmów. Ich klasyfikacji możemy dokonać zarówno ze względu na występowanie u różnych gatunków lub biorąc pod uwagę jony metali przejściowych znajdujące się w centrum aktywnym enzymu. W dotychczas poznanych dysmutazach ponadtlenkowych wyróżniono obecność jonów metali takich jak miedź, cynk, żelazo, mangan, a także nikiel. W Tabeli 1 przedstawiono zróżnicowanie w występowaniu dysmutaz u poszczególnych organizmów. NiSOD znajdziemy jedynie u bakterii. Forma enzymu zawierająca w swojej strukturze kation żelaza(III) znajduje się zarówno w bakteriach, grzybach, protistach, a nawet w roślinach. Dysmutazę zawierającą jon manganu(III) możemy znaleźć u podobnych organizmów jak FeSOD. Dodatkowo występuje ona również w mitochondriach ssaków. CuZnSOD jest obecna zarówno u zwierząt, roślin, bakterii i grzybów.

W ludzkim organizmie możemy wyróżnić trzy izoformy dysmutazy ponadtlenkowej:

- enzym cytoplazmatyczny, który zawiera jony  $\text{Cu}^{2+}$  i  $\text{Zn}^{2+}$  (CuZnSOD),
- enzym mitochondrialny posiadający jon  $\text{Mn}^{3+}$  (MnSOD),
- enzym zewnątrzkomórkowy z jonami  $\text{Cu}^{2+}$  i  $\text{Zn}^{2+}$  (ECSOD) [12].

Tabela 1. Metale przejściowe w centrum aktywnym dysmutaz ponadtlenkowych oraz ich występowanie u różnych organizmów

Table 1. Transition metals in active center of superoxide dismutases and their occurrence in various organisms

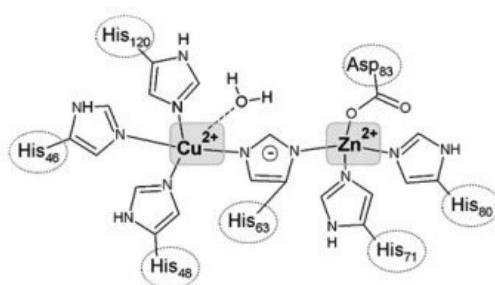
| metal przejściowy | występowanie (królestwo)             | przykład organizmu                                                             | lit.        |
|-------------------|--------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| <b>Cu i Zn</b>    | zwierzęta, rośliny, bakterie, grzyby | człowiek (cytoplazma), arbuz (liście), <i>S. Enterica</i> , drożdże            | [9, 13–15]  |
| <b>Fe</b>         | rośliny, bakterie, grzyby, protisty  | <i>Arabidopsisthaliana</i> , <i>E.coli</i> , drożdże, <i>Euglena gracilis</i>  | [16–19]     |
| <b>Mn</b>         | zwierzęta, rośliny, bakterie, grzyby | ssaki (mitochondria), <i>Zeamays</i> , <i>E.coli</i> , <i>Candida albicans</i> | [18, 20–22] |
| <b>Ni</b>         | bakterie                             | <i>Streptomyces</i> spp., cyjanobakterie                                       | [21, 23]    |

Manganowa dysmutaza ponadtlenkowa została po raz pierwszy odkryta w roku 1970 u *E.coli* [20]. Jej ludzka forma kodowana jest przez gen SOD2 zlokalizowany na chromosomie 6. MnSOD posiada cztery identyczne podjednostki, z których każda ma masę około 23 kDa [12]. W jej centrum aktywnym występuje Mn<sup>3+</sup>, a głównym celem działania jest również dysmutacja O<sub>2</sub><sup>-\*</sup> [24]. Wykazano, że manganowa dysmutaza ponadtlenkowa odgrywa ważną rolę w różnicowaniu komórkowym i powstawaniu nowotworów [25] oraz w ochronie nabłonka płuc wywoływanym hiperoksją, czyli zbyt wysokim stężeniem tlenu w tkankach [26]. MnSOD nie wykazuje homologii w sekwencji aminokwasowej z CuZnSOD, a także z ECSOD [12].

ECSOD jest najpóźniej odkrytą i scharakteryzowaną dysmutazą ponadtlenkową. Kodowana przez gen SOD3 znajdujący się na chromosomie 4 [12]. Zewnątrzkomórkowa dysmutaza ponadtlenkowa składa się z dwóch dimerów połączonych mostkiem disulfidowym. Posiada masę 135 kDa. W centrum aktywnym każdego monomeru, podobnie jak w przypadku CuZnSOD, znajduje się jon miedzi(II) i jon cynku(II). ECSOD występuje zarówno w płynach zewnątrzkomórkowych, osoczu krwi, jak i tkankach [27,28]. Podobnie jak cytoplazmatyczna SOD, posiada aktywność peroksydazową. Ponadto katalizuje reakcję dysmutacji anionorodnika ponadtlenkowego (O<sub>2</sub><sup>-\*</sup>) zapobiegając powstawaniu nadtlenoazotynu (ONOO<sup>-</sup>) i oksydacyjnemu uszkodzeniu komórek [29].

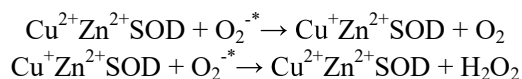
CuZnSOD jest kodowana przez gen SOD1 znajdujący się na chromosomie 21 [30]. Białko to, złożone z dwóch identycznych podjednostek, posiada łączną masę około 32 kDa [10]. Występuje głównie w cytoplazmie, ale można je znaleźć także w jądrze komórkowym [12]. Każdy z monomerów CuZnSOD posiada 151 reszt aminokwasowych. W centrum aktywnym znajduje się jeden jon miedzi(II) i jeden jon cynku(II), a końce aminowe są acetylowane. Struktura dwóch podjednostek jest utrzymywana dzięki wiązaniom hydrofobowym oraz mostkowi disulfidowemu,

który znajduje się pomiędzy cysteinami w pozycjach 57 i 146 [10, 31]. Dimeryzacja sprzyja większej stabilności enzymu, ponieważ zmniejsza się pole powierzchni dostępne dla rozpuszczalnika. Ponadto, CuZnSOD to białko termostabilne, które nie traci swojej aktywności enzymatycznej nawet po półgodzinnej inkubacji w 80°C. Zakres pH, w którym funkcjonuje stabilnie jest szeroki i obejmuje nawet bardzo zasadowy odczyn. Cytoplazmatyczna dysmutaza ponadtlenkowa posiada również odporność na działanie mocznika o stężeniu 8 M. Świadczy to o jej dużej odporności na czynniki, które zazwyczaj prowadzą do denaturacji białka [31, 32].



Rysunek 2. Budowa centrum aktywnego CuZnSOD [33]  
Figure 2. The structure of CuZnSOD active center [33]

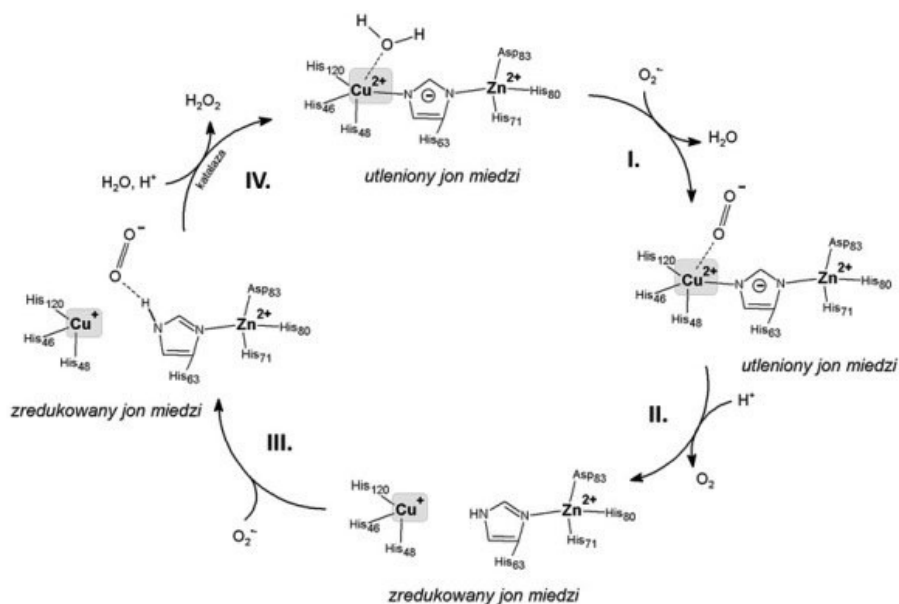
Na Rysunku 2 przedstawiona została budowa centrum aktywnego CuZnSOD. Jon miedzi(II) związany jest z czterema resztami histydynowymi w pozycjach 46, 48, 63 i 120. Pierścień imidazolowy reszty His63 pełni funkcję “mostka”, ponieważ związany jest także z jonem cynku(II), dla którego pozostałymi ligandami są His71 i His80, a także reszta kwasu asparaginowego w pozycji 83. Uważa się, że  $Zn^{2+}$  odgrywa rolę strukturalną i stabilizuje podjednostki. Z kolei  $Cu^{2+}$  bierze aktywny udział w dysmutacji anionorodnika ponadtlenkowego ulegając naprzemiennie redukcji i utlenianiu zgodnie z reakcją [10, 31, 33]:



Hart i in. w 1999 roku zaproponowali mechanizm działania dysmutazy ponadtlenkowej [34]. W pierwszym etapie anionorodnik ponadtlenkowy wypiera cząsteczkę wody ze strefy koordynacyjnej enzymu i oddaje swój elektron wiążąc się bezpośrednio z  $Cu^{2+}$  znajdującym się w miejscu aktywnym. Wskutek tego następuje redukcja jonu miedzi  $Cu^{2+} \rightarrow Cu^+$ , a powstała cząsteczka tlenu dyfunduje z kanału miejsca aktywnego. Następnie dochodzi to rozerwania wiązania pomiędzy resztą imidazolową His63 pełniącą funkcję “mostka” a jonem  $Cu^+$ . W kolejnym



etapie druga cząsteczka  $\text{O}_2^{\cdot -}$  przyłącza się do centrum aktywnego i przyjmuje elektron z  $\text{Cu}^+$  jednocześnie go utleniając. W wyniku tego powstaje cząsteczka nadtlenu wodoru, która dyfunduje z miejsca aktywnego i jest dalej rozkładana przez katalazę. Mostek imidazolowy zostaje odtworzony i enzym wraca do podstawowej struktury. Mechanizm reakcji został przedstawiony na Rys 3.



Rysunek 3. Mechanizm reakcji CuZnSOD [34]

Figure 3. The mechanism of action CuZnSOD [34]

Miejsce aktywne dysmutazy nadadtlenkowej jest naładowane dodatnio i stanowi około 11% całkowitej odsłoniętej powierzchni enzymu. Pozostała część reszt aminokwasowych posiada ładunki ujemne [31]. Taki gradient ładunku wytwarzany jest przez reszty aminokwasowe znajdujące się w pozycjach 121-143 i zwiększa stężenie substratu wokół centrum katalitycznego. Mechanizm ten nazywany jest naprowadzaniem elektrostatycznym [3,33]. Dzięki tej właściwości CuZnSOD przeprowadza reakcje niesamowicie sprawnie, a stała szybkości wynosi  $2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  [33], co czyni ją jednym z najlepszych i kluczowych enzymów antyoksydacyjnych w ludzkim organizmie.

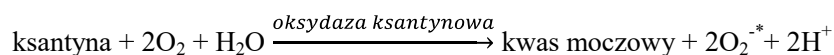
Tabela 2. Właściwości charakteryzujące miejsce aktywne CuZnSOD  
 Table 2. Characteristic properties of CuZnSOD active center

| nazwa                                                | CuZnSOD      | lit. |
|------------------------------------------------------|--------------|------|
| pH                                                   | 7.0          |      |
| IC <sub>50</sub> 10 <sup>-8</sup> [M]                | 1.3          | [35] |
| E <sup>0</sup> [mV]                                  | 320 (pH=7.4) | [36] |
| k 10 <sup>9</sup> [M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ] | 2.3          | [37] |
| A <sub>II</sub>                                      | 105          | [38] |
| g <sub>II</sub>                                      | 2.31         | [38] |

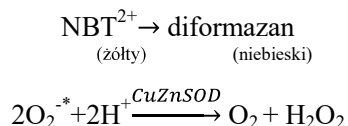
E<sup>0</sup> – potencjał standardowy  
 k – stała szybkości reakcji chemicznej  
 A<sub>II</sub> – parametr rozszczepienia nadsubtelnego  
 g<sub>II</sub> – współczynnik rozszczepienia spektroskopowego

## 2. METODY OZNACZANIA AKTYWNOŚCI CuZnSOD

Do oznaczania aktywności CuZnSOD można stosować szereg metod chemicznych, jednak ze względu na niestabilność substratu reakcji większość dostępnych testów jest pośrednia. Zależą one od zdolności enzymu do hamowania innych reakcji z udziałem anionorodnika ponadtlenkowego [3]. Najbardziej znaną i jednocześnie najczęściej wykorzystywaną jest metoda redukcji NBT [39–45]. Po raz pierwszy do oznaczania aktywności dysmutazy ponadtlenkowej użył jej Beauchamp i Fridovich w roku 1971 [46]. Metoda ta polega na redukcji błękitu nitrotetrazolowego (NBT) przez anionorodnik ponadtlenkowy, który zostaje wytworzony podczas utleniania ksantyny oksydazą ksantynową według reakcji [47]:



W pierwszym etapie redukcji NBT<sup>2+</sup> ulega przemianie do monoformazan przy udziale O<sub>2</sub><sup>\*·</sup>, a następnie w analogicznej reakcji powstaje niebieski diformazan. Dodanie do środowiska reakcji CuZnSOD powoduje zmniejszenie stężenia anionorodnika ponadtlenkowego, co bezpośrednio wpływa na hamowanie redukcji NBT:



Na tej podstawie można określić aktywność dysmutazy ponadtlenkowej. Dokonuje się tego najczęściej przy pomocy parametru IC<sub>50</sub> oznaczającego stężenie, przy którym redukcja błękitu nitrotetrazolowego zostaje zahamowana w 50% [3,

46, 48]. Można go wyznaczyć z zależności względnej szybkości redukcji NBT, którą opisuje się wzorem:

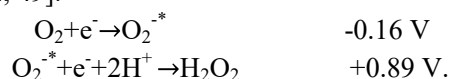
$$\% \text{inhibicji} = \frac{\left(\frac{\Delta A}{t}\right) - \left(\frac{\Delta A}{t}\right)_{\text{układ}}}{\left(\frac{\Delta A}{t}\right)} \times 100,$$

gdzie:  $\left(\frac{\Delta A}{t}\right)$  jest zmianą absorbancji na minutę bez obecności układu enzymatycznego, a  $\left(\frac{\Delta A}{t}\right)_{\text{układ}}$  to zmiana absorbancji na minutę w obecności czynnika inhibującego [42].

Bardzo ważną kwestią jest także dobór odpowiedniego buforu, którego główne zadanie polega na utrzymaniu stałego pH środowiska reakcji. Jednocześnie, składniki buforu nie powinny być konkurencyjne w stosunku do wiązania jonów  $\text{Cu}^{2+}$ . Najczęściej do takich oznaczeń wykorzystuje się bufor: TRIS [43], HEPES [49], bufor fosforanowy [42].

Innym sposobem badania aktywności CuZnSOD jest metoda cytochromowa [35, 39, 49, 50]. Została ona opracowana przez McCorda i Fridovicha [9]. Wykorzystano tutaj cytochrom c jako końcowy akceptor elektronów. Forma utleniona (cyt c— $\text{Fe}^{3+}$ ) zostaje zredukowana (cyt c— $\text{Fe}^{2+}$ ) przez anionorodnik ponadtlenny generowany podobnie jak w przypadku metody redukcji NBT przez układ ksantyna/oksydaza ksantynowa. Cyt c — $\text{Fe}^{2+}$  silniej niż forma utleniona absorbuje światło o długości fali 550 nm, dzięki czemu możliwe staje się badanie aktywności dysmutazy ponadtlennej. Do całkowitej redukcji utlenionej formy cytochrom c wymaga tylko jednego elektronu, co odróżnia tę metodę od metody NBT [3, 48]. Mniej powszechne, aczkolwiek również stosowane są metody: adrenalinowa [51, 52], pirogallolowa [53, 54], hydroksyloaminowa [55], czy też hydroksydopaminowa [56]. Można się także spotkać z chemiluminescencyjnymi sposobami oznaczeń aktywności CuZnSOD, w których wykorzystuje się np. luminol oraz lucygeninę jako detektory anionorodnika ponadtlennego [57–59].

Innym sposobem sprawdzenia czy badany układ może posiadać właściwości enzymatyczne dysmutazy ponadtlennej jest wyznaczenie potencjału standardowego ( $E^0$ ). Najczęściej do tego celu wykorzystuje się voltamperometrię cykliczną. Układ neutralizujący anionorodnik ponadtlenny powinien charakteryzować się wartościami potencjału z zakresu od -0,16 do +0,89 V, co wynika z reakcji [36, 42, 49]:



W zależności od zastosowanej metody i warunków pomiarowych, jak na przykład pH, uzyskane wartości  $\text{IC}_{50}$  mogą się różnić (Tabela 2). W związku z tym

przy wyznaczaniu aktywności enzymatycznej powinno się zawsze wykonać pomiary kontrolne także dla natywnego enzymu. Do tego celu najczęściej wykorzystuje się dysmutazę ponadtlenkową z erytrocytów wołowych (BESOD).

Tabela 3. Porównanie parametrów  $IC_{50}$  i  $k$  (stałej szybkości) dla CuZnSOD w zależności od metody  
Table 3. The comparison of  $IC_{50}$  and  $k$  (reaction rate constant) parameters for CuZnSOD according of method

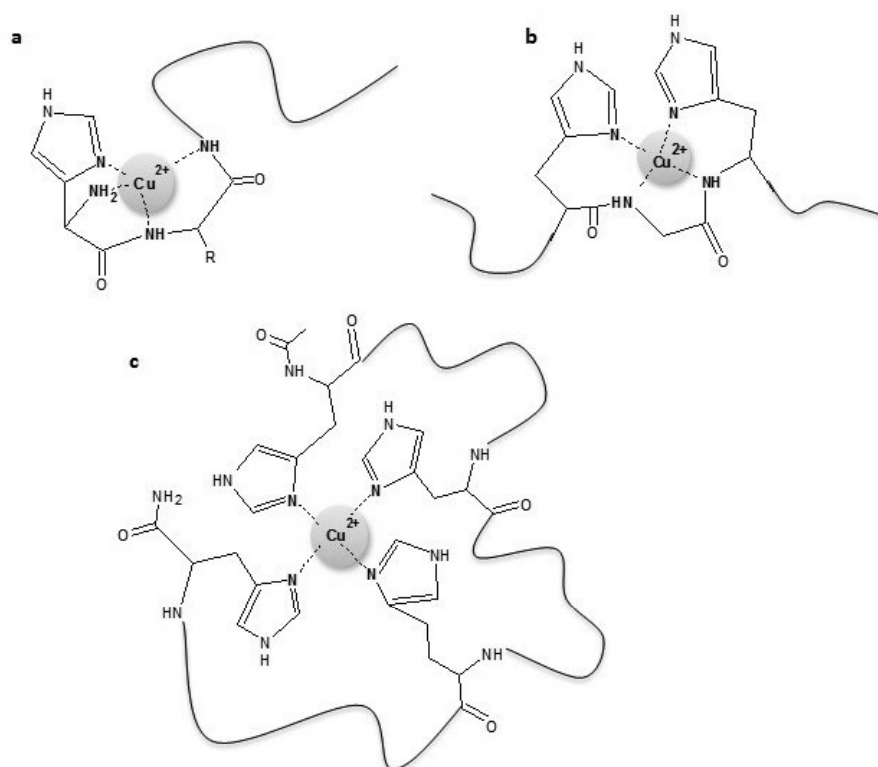
| metoda              | pH/bufor              | $IC_{50}$<br>$10^{-8}$ [mol/dm <sup>3</sup> ] | $k$<br>$10^9$ [M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ] | lit. |
|---------------------|-----------------------|-----------------------------------------------|--------------------------------------------------|------|
| cytochromowa        | 7.0/bufor fosforanowy | 1.3                                           | 3.85                                             | [35] |
| cytochromowa        | 7.6/HEPES             | 0.14                                          | 2.8                                              | [49] |
| cytochromowa        | 7.8/HEPES             | 0.20                                          | 3.5                                              | [50] |
| NBT                 | 6.8/bufor fosforanowy | 0.30                                          | 1.71                                             | [42] |
| NBT                 | 6.8/bufor fosforanowy | 0.1-0.6                                       | 4.6                                              | [48] |
| NBT                 | 6.8/bufor fosforanowy | 0.45                                          | -                                                | [41] |
| NBT                 | 7.4/bufor fosforanowy | 0.44                                          | -                                                | [42] |
| NBT                 | 7.4/TRIS              | 0.18                                          | -                                                | [45] |
| radioliza impulsowa | 7.0/bufor fosforanowy | 6-50                                          | 3.8                                              | [48] |

### 3. CHARAKTERYSTYKA ZWIĄZKÓW KOORDYNACYJNYCH PEPTYDÓW Z JONAMI $Cu^{2+}$ A ICH AKTYWNOŚĆ CuZnSOD

#### 3.1. PEPTYDY LINIOWE

Dotychczasowe badania wykazały, że peptydy liniowe z resztą histydynową mogą naśladować działanie metaloenzymów [60-76]. Tri- i tetrapeptydy zawierające w strukturze jedną lub dwie reszty histydynowe wykazują tendencję do tworzenia bidentnych kompleksów z jonami  $Cu^{2+}$  i  $Zn^{2+}$  w fizjologicznym zakresie pH [60-63]. Tripeptyd o sekwencji HVH odpowiada aminokwasom w pozycji 44-46 natywnego enzymu odwzorowując miejsce wiązania jonu  $Cu^{2+}$ . Porównując  $IC_{50}$  układów L/ $Cu^{2+}$  peptydu Ac-HVH wraz z jego odpowiednikiem z nieblokowanymi grupami terminalnymi można wysunąć wniosek, że wyłączenie grupy aminowej *N*-końca peptydu w procesie koordynacyjnym może poprawić zdolność dysmutacji anionorodnika (Tabela 4) [63]. Podobną zależność zaobserwowano dla tetrapeptydów HGHG i jego analogu z acylowanym *N*-końcem [64]. Tri- i tetrapeptydy w pH 7,4 tworzą formy kompleksowe z zaangażowaniem następujących atomów donorowych w wiązanie jonu metalu { $NH_2$ ,  $N_{Im}$ ,  $2N^-$ } (Rys. 4a) natomiast ich analogi z blokową grupą aminową { $2N_{Im}$ ,  $2N^-$ } (Rys. 4b) [64-66]. Wiązanie jonów  $Cu^{2+}$  przez atomy azotu z wiązań peptydowych jest niepożądane w kompleksach, które naśladowają centrum CuZnSOD, ze względu na sztywniejszą strukturę i trudność w dotarciu rodnika do jonu miedzi(II). Pomimo, iż kompleks jest stabilniejszy to nie będzie dobrze odwzorowywał centrum aktywnego, a w konsekwencji wartość  $IC_{50}$  przyjmuje wyższe wartości dla kompleksów z donorami amidowymi w koordynacji. Zależność taką można zaob-

serwować dla fragmentu *N*-końca CuZnSOD wyizolowanego z *Haemophilus ducreyi* o sekwencji HGDHMHNHDTK. Wartość  $\text{IC}_{50}$  dla  $\text{CuL-}\{\text{NH}_2, 2\text{N}_{\text{Im}}, \text{N}^-\}$  jest większa niż dla  $\text{CuHL-}\{\text{NH}_2, 3\text{N}_{\text{Im}}\}$  (Tabela 4) [67]. Zaangażowanie w koordynację jonów  $\text{Cu}^{2+}$  atomów  $\text{N}^-$  ( $\text{O}=\text{C-NH-}$ ) związane jest ze wzrostem pH układu, więc środowisko prowadzenia eksperymentu ma ogromne znaczenie dla uzyskanych wyników [40,42,67]. Różnice obserwowano nawet dla wartości  $\text{IC}_{50}$  otrzymanych dla natywnego enzymu dla różnych wartości pH (Tabela 3) [40, 42].



Rysunek 4. Schematyczne struktury sposobu koordynacji jonów  $\text{Cu}^{2+}$ : a)  $\{4\text{N}_{\text{Im}}\}$ , b)  $\{2\text{N}_{\text{Im}}, 2\text{N}^-\}$ , c)  $\{\text{NH}_2, \text{N}_{\text{Im}}, 2\text{N}^-\}$  przez peptydy liniowe

Figure 4. Schematic structures coordination mode of  $\text{Cu}^{2+}$  ions: a)  $\{4\text{N}_{\text{Im}}\}$ , b)  $\{2\text{N}_{\text{Im}}, 2\text{N}^-\}$ , c)  $\{\text{NH}_2, \text{N}_{\text{Im}}, 2\text{N}^-\}$  by linear peptides

Wraz ze wzrostem liczby reszt histydynowych od 1 do 4 w sekwencji peptydu zaobserwowano jednoczesny wzrost termodynamicznej stabilności tworzących się kompleksów z jonami  $\text{Cu}^{2+}$ . Jednocześnie poszerza się zakres dominacji form, w których jon metalu jest skoordynowany przez donory z pierścieni imidazolowych [42, 68]. Największą stabilnością termodynamiczną odznaczają się makrochelatowe kompleksy ligandów z motywem  $-(\text{HXH})_n-$ . Im dalej od siebie położone reszty histydynowe w łańcuchu peptydowym tym ta stabilność maleje [42]. Wraz ze

wzrostem pH, w wiązaniu jonów  $\text{Cu}^{2+}$  biorą udział atomy z wiązania peptydowego, co w przypadku ligandów mających naśladować metaliczne centrum CuZnSOD jest niepożądane. Zakres pH, w którym obserwuje się dysocjację protonu z grupy amidowej wiązania peptydowego jest różny w zależności od liczby reszt aminokwasowych w peptydzie, liczby oraz pozycji reszt histydynowych [42]. Zaobserwowano również, że kompleksy o sposobie koordynacji  $\{2\text{N}_{\text{Im}}\}$  utworzone przez tripeptydy Ac-HXH-NH<sub>2</sub> wraz ze wzrostem pH ulegają jednoczesnej dysocjacji dwóch protonów z grupy amidowej wiązania peptydowego tworząc formę  $\{2\text{N}_{\text{Im}}, 2\text{N}^-\}$  (Rys. 4b) [42].

Powstawanie makrochelatowych kompleksów z zaangażowaniem tylko imidazolowych atomów donorowych w szerokim zakresie pH i zablokowanie możliwości wymuszonej deprotonacji amidowego atomu azotu było możliwe przez umieszczenie w sekwencji metylowej pochodnej glicyny, czyli sarkozyny (Sar). Ligandy o sekwencji: Ac-H-Sar-H-NH<sub>2</sub>, Ac-H-Sar-H-Sar-H-NH<sub>2</sub>, Ac-H-Sar-H-Sar-H-Sar-H-NH<sub>2</sub> tworzą formy kompleksowe  $\{2\text{N}_{\text{Im}}\}$ ,  $\{3\text{N}_{\text{Im}}\}$ ,  $\{4\text{N}_{\text{Im}}\}$  z jonami  $\text{Cu}^{2+}$  w fizjologicznym zakresie pH. Najlepsze wartości IC<sub>50</sub> otrzymano dla oktapeptydu (Tabela 4) [68].

Tabela 4. Porównanie właściwości kompleksów peptydów liniowych  
Table 4. The comparison of properties of linear peptides

| ligand                                             | dominująca forma     | atomy donorowe                                                                                        | pH  | IC <sub>50</sub> 10 <sup>-8</sup> [mol/dm <sup>3</sup> ] | lit.     |
|----------------------------------------------------|----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|----------------------------------------------------------|----------|
| <b>HVH</b>                                         | CuH <sub>1</sub> L   | {NH <sub>2</sub> , N <sub>Im</sub> , 2N <sup>-</sup> }                                                | 7,4 | 20                                                       | [62]     |
| <b>HGHG</b>                                        | CuH <sub>2</sub> L   | {NH <sub>2</sub> , N <sub>Im</sub> , 2N <sup>-</sup> }                                                | 7,4 | 67                                                       | [64, 66] |
| <b>Ac-HGHG</b>                                     | CuH <sub>2</sub> L   | {2N <sub>Im</sub> , 2N <sup>-</sup> }                                                                 | 7,4 | 8,3                                                      | [64, 65] |
| <b>Ac-HVH-NH<sub>2</sub></b>                       | CuH <sub>2</sub> L   | {2N <sub>Im</sub> , 2N <sup>-</sup> }                                                                 | 7,4 | 16                                                       | [62]     |
| <b>Ac-H-Sar-H-Sar-H-NH<sub>2</sub></b>             | CuL                  | {3N <sub>Im</sub> }                                                                                   | 7,4 | 15                                                       | [68]     |
| <b>Ac-H-Sar-H-Sar-H-Sar-H-NH<sub>2</sub></b>       | CuH <sub>1</sub> L   | {3N <sub>Im</sub> , N <sup>-</sup> }                                                                  | 7,4 | 15                                                       | [68]     |
| <b>Ac-H-Sar-H-Sar-H-Sar-H-Sar-H-NH<sub>2</sub></b> | CuL                  | {4N <sub>Im</sub> }                                                                                   | 7,4 | 4,6                                                      | [68]     |
| <b>HGDHMHNDTK</b>                                  | CuHL                 | {NH <sub>2</sub> , 3N <sub>Im</sub> }                                                                 | 7,0 | 19                                                       | [67]     |
|                                                    | CuHL                 | {NH <sub>2</sub> , 3N <sub>Im</sub> }                                                                 | 8,2 | 31                                                       |          |
|                                                    | CuL                  | {NH <sub>2</sub> , 2N <sub>Im</sub> , N <sup>-</sup> }                                                | 8,2 | 31                                                       |          |
| <b>zp-Prp63-80</b>                                 | CuL                  | {4N <sub>Im</sub> }                                                                                   | 7,4 | 61,5                                                     | [43]     |
| <b>zp-Prp63-80</b>                                 | CuZnL                | Cu-{4N <sub>Im</sub> }<br>Zn-{2N <sub>Im</sub> , 2H <sub>2</sub> O}                                   | 7,4 | 60,1                                                     | [43]     |
| <b>zp-Prp63-87</b>                                 | CuL                  | {4N <sub>Im</sub> }                                                                                   | 7,4 | 60,4                                                     | [43]     |
| <b>zp-Prp63-87</b>                                 | CuZnH <sub>2</sub> L | Cu-{3N <sub>Im</sub> , N <sup>-</sup> }<br>Zn-{3N <sub>Im</sub> , H <sub>2</sub> O, OH <sup>-</sup> } | 7,4 | 59,2                                                     | [43]     |
| <b>Hex<sub>2</sub></b>                             | CuHL                 | {2N <sub>Im</sub> , N <sup>-</sup> }                                                                  | 7,4 | 18,8                                                     | [73]     |
| <b>Hex<sub>4</sub></b>                             | CuH <sub>4</sub> L   | {4N <sub>Im</sub> }                                                                                   | 7,4 | 17,7                                                     | [73]     |
| <b>Oct<sub>2</sub></b>                             | CuH <sub>2</sub> L   | {2N <sub>Im</sub> , 2N <sup>-</sup> }                                                                 | 7,4 | 21,7                                                     | [73]     |
| <b>Oct<sub>4</sub></b>                             | CuL                  | {4N <sub>Im</sub> }                                                                                   | 7,4 | 17,5                                                     | [73]     |

Białka prionowe to glikoproteiny zakotwiczone w błonie komórkowej, których największą ekspresję stwierdzono w układzie nerwowym [69, 70]. Funkcję prawidłowych białek prionowych ( $\text{PrP}^{\text{C}}$ ) nie zostały jeszcze w pełni poznane, ale przypisuje się im właściwości przeciwutleniające podobne do działania  $\text{CuZnSOD}$  [31, 71]. Wykazano, że polihistydynowe fragmenty białek prionowych zwierząt (rybich, kurzych, ptasich) i ludzkich efektywnie wiążą jony metali [43, 72, 73]. Fragmenty rybich  $\text{PrP}$  są bogate w reszty histydynowe (Tabela 5). Wykazano, że ligandy te mogą tworzyć homo- i heteronuklearne kompleksy z jonami  $\text{Cu}^{2+}$  i  $\text{Zn}^{2+}$ . Choć wartości  $\text{IC}_{50}$  dla fragmentów rybich  $\text{PrP}$  są bardzo zbliżone do siebie to można zaobserwować, że udział jonów  $\text{Zn}^{2+}$  korzystnie wpływa na właściwości przeciwutleniające tych kompleksów (Tabela 4) [43]. W sekwencji aminokwasowej białek prionowych ludzkich oraz kurzych można wyróżnić powtarzające się motywy z resztą histydynową (Tabela 5). Badania tych fragmentów: Hex, Hex<sub>2</sub>, Hex<sub>4</sub> i Oct, Oct<sub>2</sub>, Oct<sub>4</sub> potwierdziły, że w układach z równomolowym stosunkiem liganda do metalu wzrost liczby reszt histydynowych w sekwencji powoduje wzrost aktywności enzymatycznej (Tabela 4), a najsukuteczniejsze okazały się kompleksy o sferze koordynacyjnej  $\{4\text{N}_{\text{lm}}\}$  (Rys. 4c) [73]. Ligandy Hex<sub>4</sub> i Oct<sub>4</sub> koordynują do czterech jonów  $\text{Cu}^{2+}$ , ale nie wpływa to na polepszenie właściwości przeciwutleniających tych układów [73].

Tabela 5. Sekwencje aminokwasowe fragmentów białek prionowych  
Table 5. Amino acid sequences of prion protein fragments

| nazwa skrócona | sekwencja                                     | lit. |
|----------------|-----------------------------------------------|------|
| zp-PrP-63-80   | Ac-PVHTGHMGGHIGHTGHTGH-NH <sub>2</sub>        | [43] |
| zp-PrP-63-87   | Ac-PVHTGHMGGHIGHTGHTGHTGSSGHG-NH <sub>2</sub> | [43] |
| Hex            | Ac-HNPGYP-NH <sub>2</sub>                     | [73] |
| Oct            | Ac-PHGGGWGQ-NH <sub>2</sub>                   | [73] |

Mechanizm neutralizacji jonu  $\text{O}_2^{*\cdot}$  przez  $\text{CuZnSOD}$  prowadzi do uwalniania nadtlenu wodoru ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) jednej z form RFT [1,2]. W naturalnych warunkach  $\text{H}_2\text{O}_2$  jest rozkładany do cząsteczkowego tlenu i wody przez inne antyoksydacyjne czynniki jak na przykład peroksydazę glutationową (GPx) [3]. Yin i współautorzy zaproponowali układ, który jednocześnie naśladuje działanie zarówno  $\text{CuZnSOD}$  jak i GPx. Kompleksy linowego 65-aminokwasowego fragmentu białka i jego selenowej pochodnej (Tabela 6) wykazują działanie obu tych enzymów. Ich aktywność  $\text{CuZnSOD}$  jest podobna, ale najsukuteczniej działanie  $\text{CuZnSOD}$  naśladował kompleks  $\text{CuZn-65P}$  z resztą seryny w 58 pozycji oligopeptydu (Tabela 6) [74]. W sekwencji tych ligandów można wyróżnić siedem reszt histydynowych, które najprawdopodobniej są miejscem kotwiczenia jonów metali. Fragmenty białek zostały otrzymane przez amplifikację DNA metodą PCR. Pochodna selenowa została uzyskana przez zamianę Cys58 na Ser. Następnie wprowadzono

grupę –SeH (NaSeH), przez uprzednie aktywowanie grupy hydroksylowej seryny fluorkiem fenylometylosulfonylu (PMSF), otrzymując ligand Se-65P [74].

Tabela 6. Porównanie aktywności CuZnSOD kompleksów Cu<sup>2+</sup>/Zn<sup>2+</sup> 65-aminokwasowych peptydów liniowych oraz sekwencja aminokwasowa ligandów

Table 6. The comparison of CuZnSOD activity of linear 65-amino acid peptides complexes and amino acid ligand sequences

| <b>kompleks</b>                | <b>aktywność CuZnSOD<br/>[U/mg]</b>                                                                                                                             | <b>lit.</b> |
|--------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| <b>Se-CuZn-65P<sup>a</sup></b> | 1254                                                                                                                                                            | [75]        |
| <b>Se-CuZn-65P</b>             | 1181                                                                                                                                                            | [74]        |
| <b>CuZn-65P</b>                | 1297                                                                                                                                                            | [74]        |
| <b>SOD3</b>                    | 2970                                                                                                                                                            | [74]        |
| <b>ligand</b>                  | <b>sekwencja aminokwasowa</b>                                                                                                                                   |             |
| <b>65P<sup>a</sup></b>         | HQHQFGDLSQ <sup>10</sup> GAESTGPHYN <sup>20</sup> PLAVPHPQHP <sup>30</sup> GDWGNFAVRD <sup>40</sup> GS<br>LWPFLRHN <sup>50</sup> VYGRPRACVV <sup>60</sup> HAGED | [75]        |
| <b>65P</b>                     | HQHQFGDLSQ <sup>10</sup> GAESTGPHYN <sup>20</sup> PLAVPHPQHP <sup>30</sup> GDWGNFAVRD <sup>40</sup> GS<br>LWPFLRHN <sup>50</sup> VYGRPRASVV <sup>60</sup> HAGED | [74]        |

### 3.2. PEPTYDY CYKLICZNE

Cyklopeptydy homodetyczne charakteryzują się obecnością ciągłego pierścienia peptydowego, który powstaje przez wiązanie pomiędzy *N*- i *C*-końcówką grupą (tzw. „cyklizacja głowy do ogona”) [76, 77]. Tym samym grupy końcowe peptydu nie mogą brać udziału w procesie koordynacyjnym dwuwartościowych jonów metali. Wraz ze wzrostem liczby reszt aminokwasowych w sekwencji peptydu wzrasta jego elastyczność. Najmniejszy, 6-członowy pierścień peptydowy 2,5-piperazynodionu posiadają cyklodipeptydy. Właściwości koordynacyjne takich cząsteczek zależą tylko od łańcuchów bocznych reszt aminokwasowych, a te z kolei mogą być różnie zorientowane w przestrzeni w zależności od izomerii optycznej *l* lub *d*. Dodatkowo na właściwości koordynacyjne mogą mieć wpływ wewnątrzcząsteczkowe oddziaływania typu  $\pi$ - $\pi$  diketopiperazyny z pierścieniami aromatycznymi takich aminokwasów jak: histydyna, tyrozyna, fenyloalanina, tryptofan [78, 79]. Zaobserwowano także, że grupa imidazolowa w dicyklopeptydach ma charakter mniej zasadowy niż cząsteczka imidazolu [78]. Ligand c(HH) tworzy bidentne kompleksy z jonami Cu<sup>2+</sup>, a w wiązanie jonów metalu zaangażowane są cztery atomy azotu z pierścienia imidazolowego. Najprawdopodobniej kompleks taki przyjmuje konformację płaskiego kwadratu z odkształceniem w kierunku tetraedru. Otrzymany związek okazał się być stabilny w wodnym roztworze i nie wykazywał cytotoksyczności w stężeniach mikromolowych. Zdolność bis{c(HH)}Cu<sup>2+</sup> do dysmutacji O<sub>2</sub><sup>\*</sup> wynosiła około 10% aktywności w stosunku molowym do naturalnego enzymu. [35, 80]. Kolejnym przykładem kompleksów z jonami miedzi(II), jakie badano w kierunku neutralizacji



anionorodnika ponadtlenkowego, są dicyklopeptydy zbudowane z aminokwasów kwasowych: c(DD) oraz c(EE) z modyfikowanymi łańcuchami bocznym przez podstawianie do grup karboksylowych dwóch cząsteczek histaminy. W równomolowym stosunku jonów metalu do liganda w roztworze dominują mononuklearne formy kompleksowe  $[\text{CuL}]^{2+}$  i  $[\text{CuH}_1\text{L}]$ , w których atomami wiążącymi  $\text{Cu}^{2+}$  są odpowiednio:  $\{2x\text{N}_{\text{Im}}, 2x\text{CO}\}$  oraz  $\{2x\text{N}_{\text{Im}}, \text{CO}, \text{N}^-(\text{histamina})\}$ . Ligandy takie tworzą również kompleksy bidentne  $\text{CuL}_2$ , których stężenie w roztworze jest największe, gdy stosunek liganda do metalu wynosi 2:1. Jony  $\text{Cu}^{2+}$  prawdopodobnie są związane przez cztery imidazolowe atomy azotu. Badanie aktywności  $\text{CuZnSOD}$  dla tych związków pokazało, że przy największym stężeniu bidentnego kompleksu układ najlepiej hamuje reakcje wolnorodnikową, wykazując tylko o sześć razy mniejszą aktywność niż natywny enzym. Niemniej jednak, w badaniach tych użyto 1000-krotnego nadmiaru liganda w stosunku do jonów metalu [81]. Tym samym potwierdzono, że sfera koordynacyjna  $\text{Cu}^{2+}(\text{d}^9)$  powinna być na tyle elastyczna, aby możliwa była redukcja jonu metalu do  $\text{Cu}^+(\text{d}^{10})$ , podczas której następuje również zmiana geometrii kompleksu. W związku z tym pożądanymi donorami są atomy z pierścienia imidazolowego reszt histydynowych tak jak w centrum metalicznym  $\text{CuZnSOD}$ . Udział amidowych atomów azotu w koordynacji jonów  $\text{Cu}^{2+}$  powoduje, że struktura kompleksu jest bardziej „sztywna” i mniej dostępna dla  $\text{O}_2^{*-}$  co utrudnia proces redukcji i zmniejsza możliwości przeciwutleniające takich kompleksów [82]. Bidentnym ligandem dla jonów miedzi(II) jest również heksacyklopeptyd: c(GHG)<sub>2</sub>, którego forma  $\text{CuL}_2$  angażuje w koordynację tylko atomy azotu z pierścieni imidazolowych. Natomiast wraz ze wzrostem pH w koordynacji jonów  $\text{Cu}^{2+}$  biorą udział atomy azotu z wiązań peptydowych. Dla c(GHG)<sub>2</sub> następuje to już w pH powyżej 7, gdzie dominuje tylko mononuklearna forma kompleksowa  $\text{CuL}$  o atomach donorowych  $\{2x\text{N}_{\text{Im}}, 2x\text{N}^-\}$  [83].

Peptydy cykliczne do sześciu reszt aminokwasowych w sekwencji, z których przynajmniej jedna posiada pierścień imidazolowy (His lub histamina) preferują tworzenie się bis-kompleksów z jonami miedzi(II). Kompleksy te charakteryzują się następującym sposobem koordynacji:  $\{4x\text{N}_{\text{Im}}\}$  z donorami w płaszczyźnie ekwatorialnej. Wraz ze wzrostem wielkości pierścienia peptydowego nie zaobserwowano tworzenia się kompleksów typu  $\text{CuL}_2$ . Oktacyklopeptyd o sekwencji c(GH)<sub>4</sub> tworzy z jonami  $\text{Cu}^{2+}$  tylko monodentne formy kompleksowe nawet w układzie z podwójnym nadmiarem liganda. Ze względu na obecność czterech reszt His w sekwencji, dominującym kompleksem jest  $\{4x\text{N}_{\text{Im}}\}$  forma jednak badania te były ograniczone do pH 6 ze względu na wytrącanie się osadu, który uniemożliwił dalszą analizę i badanie aktywności enzymatycznej [83].

Wprowadzenie do sekwencji peptydu reszty proliny powoduje, że kaskada wiązania jonów  $\text{Cu}^{2+}$  wzdłuż łańcucha peptydowego zostaje zatrzymana.

Uczestniczenie w wiązaniu peptydowym grupy aminowej prolina uniemożliwia koordynację jonów miedzi(II) ponieważ atom azotu uczestniczy w trzech wiązaniach kowalencyjnych [84–86]. Dlatego aminokwas ten blokuje możliwość wiązania jonów  $\text{Cu}^{2+}$  przez kolejne amidowe atomy azotu i jednocześnie usztywnia łańcuch peptydowy. Dodatkowo umieszczenie dwóch reszt prolina w sekwencji homotetycznego cyklopeptydu spowoduje wyodrębnienie dwóch niezależnych miejsc potencjalnie wiążących jony metalu. Cyklopeptyd c(GDWHPGHKHP) tworzy formę kompleksową  $\text{CuHL-}\{3\text{xN}_{\text{Im}}, \text{COO}^-\}$  dominującą w roztworze do pH 7,5 [87]. Porównanie stałych trwałości ( $\log\beta$ ) dla tego liganda i jego liniowego odpowiednika pokazała, że cykliczny analog tworzy stabilniejszy kompleks, ale odznacza się znacznie mniejszym formalnym potencjałem redukcyjnym ( $E^0$ ) [88]. Ligandy o rozbudowanym pierścieniu peptydowym, zawierające w sekwencji od ośmiu do dwunastu reszt aminokwasowych, wykazują tendencję do tworzenia bi- i tri-nuklearnych kompleksów, które mogą formować się nawet w układach z równomolową ilością jonów  $\text{Cu}^{2+}$  względem liganda [88-91].

Ligandy c(HKHPH)<sub>2</sub> i c(HKHGPG)<sub>2</sub> powyżej pH 7 tworzą kompleksy o stechiometrii  $\text{Cu}_2\text{LH}_x$  osiągając około 30% w próbce. Wraz ze wzrostem stężenia jonów metalu wzrasta także stężenie dinuklearnych form, które w układzie z podwójnym nadmiarem  $\text{Cu}^{2+}$  dominują w roztworze powyżej pH 6. Zaobserwowano, że powstawanie dinuklearnych form kompleksowych związane jest z jednoczesnym zaangażowaniem amidowych atomów azotu w koordynację [91, 92]. Ponadto wykazano, że analog o większym pierścieniu peptydowym efektywniej wiąże jony miedzi(II) w szerokim zakresie pH (5,5–11,0) [91]. Badania aktywności enzymatycznej dla miedziowych kompleksów c(HKHGPG)<sub>2</sub> wykazały, że skuteczniejszym w neutralizacji anionorodnika ponadtlenkowego jest układ  $\text{L}:\text{Cu}^{2+}=1:2$ , w którym jest około 90% formy  $\text{Cu}_2\text{H}_2\text{L-}\{2\text{N}_{\text{Im}}, 2\text{N}^-\}$  [45]. Choć bezpośredni potencjał tej reakcji zależy od właściwości redukująco-utleniających jonu  $\text{Cu}^{2+}$ , to istotnym elementem strukturalnym, który przyczynia się do prawidłowego cyklicznego mechanizmu dysmutacji, jest jon  $\text{Zn}^{2+}$ . Zaskakujący jest fakt, że mimo, iż nie udało się zaobserwować tworzenia imidazolowego mostka pomiędzy jonami metali w kompleksach heteronuklearnych równomolowego układu:  $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}/\text{c}(\text{HKHGPG})_2$  to jednak model ten wykazywał najlepszą zdolność do mimikowania CuZnSOD spośród wszystkich badanych układów dla tego cyklopeptydu [45].

Kompleksy o donorach  $\{4\text{xN}_{\text{Im}}\}$  posiadają pożądaną strukturą w kierunku poszukiwania mimetyków CuZnSOD. Odznaczają się one także najlepszymi właściwościami przeciwutleniającymi spośród przebadanych dotychczas cyklopeptydów (Tabela 6). Jednak najczęściej dominują w roztworze o pH kwaśnym, a badania aktywności CuZnSOD powinno być przeprowadzane w zakresie pH fizjologicznym pomiędzy 7,0 a 7,5, czyli w środowisku działania

enzymu. W związku z tym istnieją ograniczenia potencjalnego zastosowania tych związków jako mimetyków natywnego enzymu. W Tabeli 6 przedstawiono porównanie wartości  $\text{IC}_{50}$  dla wybranych kompleksów cyklopeptydów, z którego wynika, że najefektywniejszymi mimetykami  $\text{CuZnSOD}$  są formy  $\text{CuL}_2\text{-}\{4\text{N}_{\text{im}}\}$ . Również ligandem o dużym potencjale dysmutacji jest cykliczny 12-aminokwasowy peptyd  $\text{c}(\text{HKHGPG})_2$  w równomolowym heteronuklearnym układzie z jonami  $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$  (Tabela 6).

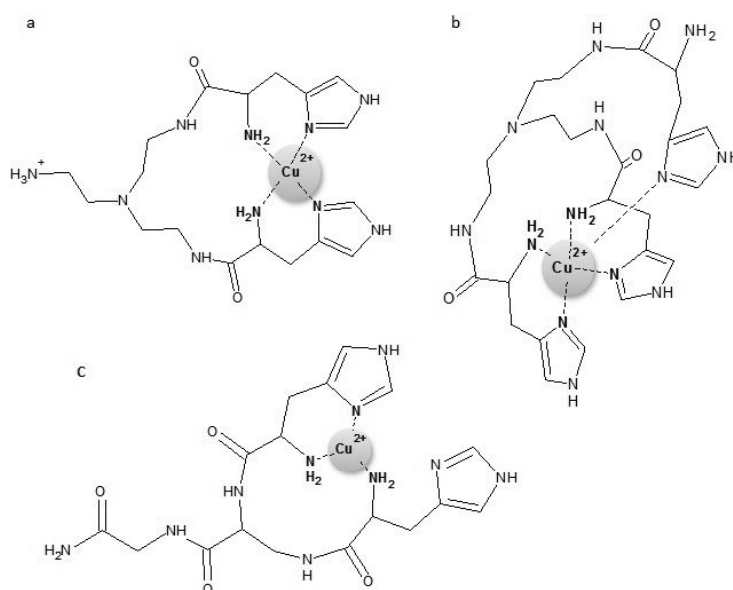
Tabela 6. Porównanie właściwości kompleksów cyklopeptydów  
Table 6. The comparison of properties of cyclopeptides complexes

| ligand                       | dominująca forma                | atomy donorowe                                                                                                                           | pH  | $\text{IC}_{50}$<br>$10^{-8} [\text{mol}/\text{dm}^3]$ | $E^0$<br>[mV] | lit.    |
|------------------------------|---------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|--------------------------------------------------------|---------------|---------|
| <b>c(HH)</b>                 | $\text{CuL}_2$                  | $\{4\text{N}_{\text{im}}\}$                                                                                                              | 7,0 | 50                                                     | -             | [35,93] |
| <b>c(DD)Hm<sub>2</sub></b>   | $\text{CuL}_2$                  | $\{4\text{N}_{\text{im}}\}$                                                                                                              | 7,4 | 25                                                     | 215           | [81]    |
| <b>c(EE)Hm<sub>2</sub></b>   | $\text{CuL}_2$                  | $\{4\text{N}_{\text{im}}\}$                                                                                                              | 7,4 | 25                                                     | 333           | [81]    |
| <b>c(GHG)<sub>2</sub></b>    | $\text{CuH}_2\text{L}$          | $\{2\text{N}_{\text{im}}, 2\text{N}^-\}$                                                                                                 | 8,0 | 160                                                    | 219           | [83]    |
| <b>c(GH)<sub>4</sub></b>     | $\text{CuL}$                    | $\{4\text{N}_{\text{im}}\}$                                                                                                              | 6,0 | 80                                                     | 269           | [83]    |
|                              | $\text{CuH}_2\text{L}$          | $\{2\text{N}_{\text{im}}, 2\text{N}^-\}$                                                                                                 | 8,0 | 140                                                    | 195           |         |
| <b>c(GDWHPGHKHP)</b>         | $\text{CuHL}$                   | $\{3\text{N}_{\text{im}}, \text{COO}^-\}$                                                                                                | -   | -                                                      | 24            | [88]    |
|                              | $\text{Cu}_2\text{H}_2\text{L}$ | $\{2\text{N}_{\text{im}}, 2\text{N}^-\}$                                                                                                 | 7,4 | 57,4                                                   | -             |         |
| <b>c(HKHGPG)<sub>2</sub></b> | $\text{Cu}_2\text{H}_2\text{L}$ | $\{2\text{N}_{\text{im}}, 2\text{N}^-\}$                                                                                                 | 7,4 | 57,4                                                   | -             | [45]    |
|                              | $\text{CuZnH}_2\text{L}$        | $\text{Cu}^{2+}\text{-}\{2\text{N}_{\text{im}}, 2\text{N}^-\}$<br>$\text{Zn}^{2+}\text{-}\{2\text{N}_{\text{im}}, 2\text{H}_2\text{O}\}$ | 7,4 | 36,0                                                   | -             |         |

### 3.3. PEPTYDY ROZGAŁĘZIONE (DENDRYCZNE)

Jedną z serii dendrycznych ligandów badanych pod kątem dysmutacji anionorodnika ponadtlenkowego była grupa związków, którego rdzeniem była tris(2-aminoetylo)amina zwana w dalej „tren” z podstawionymi jedną, dwiema i trzema resztami histydynowymi jako „ramionami”. Wykazano, że  $\text{tren1His}$  tworzy stabilną formę kompleksową z pięcioma atomami azotu wokół jonu  $\text{Cu}^{2+}$   $\{\text{N}_{\text{im}}, \text{N}^-, \text{N}_{\text{terts}}, 2\text{NH}_2^{\text{tren}}\}$  przyjmując geometrię piramidy kwadratowej. Kompleks ten dominuje w roztworze powyżej pH 7,0 i nie wykazuje żadnej aktywności katalitycznej. Natomiast jego analogi  $\text{tren2His}$  i  $\text{tren3His}$ , wykazujące tendencję do tworzenia di- i trinuklearnych kompleksów, odznaczają się dość dobrą aktywnością  $\text{CuZnSOD}$ , porównywalną z układami peptydów liniowych i cyklicznych [94, 95]. W układzie  $\text{tren2His}$  z jonami  $\text{Cu}^{2+}$ , o stosunku molowym równym 1:1 w pH 7,4, istnieje równowaga pomiędzy trzema formami kompleksowymi  $\text{CuHL}/\text{CuL}/\text{CuH}_1\text{L}$ . Dla pierwszej i ostatniej zaproponowano odpowiednio następujące modele koordynacyjne:  $\{2\text{N}_{\text{im}}, 2 \alpha\text{NH}_2\}$  (Rys. 5a) i  $\{\alpha\text{NH}_2, \text{N}^-, \text{N}_{\text{terts}}, \text{NH}_2^{\text{tren}}\}$  [95]. Natomiast w układzie  $\text{Cu}:\text{tren2His}=2:1$  dominującą formą kompleksową jest  $\text{Cu}_2\text{H}_1\text{L}$  z donorami wiążącymi  $\{2\text{N}_{\text{im}}, 2 \alpha\text{NH}_2\}$  i  $\{\text{N}^-, \text{N}_{\text{terts}}, \text{NH}_2^{\text{tren}}\}$  lub  $\{\text{N}^-, \text{N}_{\text{terts}}, \text{N}^-\}$ . W tym przypadku obecność drugiego jonu metalu nie wpłynęła na zdolność

neutralizacji  $O_2^{*}$ , wykazując taką samą wartość  $IC_{50}$  jak dla układu o równomolowym stosunku metalu do liganda (Tabela 7) [95]. Dla tren3His wyniki powinny być jeszcze bardziej obiecujące, tymczasem ligand ten tworzy stabilny kompleks ( $\log\beta=13,19$ ) o sferze koordynacyjnej  $\{2NH_2, 2N_{Im}, N_{Im(axial)}\}$  (Rys. 5b) [94], ale  $IC_{50}$  jest mniejsze niż dla  $Cu^{2+}$ :tren2His=1:1 (Tabela 7) [94, 95]. Efektem takiego działania może być fakt, że kompleks ten angażuje pięć donorowych atomów azotu w wiązanie jonów  $Cu^{2+}$ , więc także w tym przypadku dostęp do jonu metalu jest ograniczony, co przekłada się na słabsze oddziaływanie z rodnikiem.



Rysunek 5. Schematyczne struktury kompleksów peptydów rozgałęzionych: a) CuHL – tren2his, b) CuHL – tren3his, c) CuL – 2HG

Figure 5. Schematic structure of branched peptides complexes: : a) CuHL – tren2his, b) CuHL – tren3his, c) CuL – 2HG

Jako rdzeń do budowy rozgałęzionych ligandów wykorzystano także kwas 2,3-diaminopropionowy (Dap). Ligandy modyfikowano wykorzystując jako dendrymery reszty glicyny i histydyny w różnej konfiguracji, ich sekwencje można przedstawić następująco: H-Gly-Dap(H-Gly)-Gly-NH<sub>2</sub> – 3G, H-Gly-Dap(H-Gly)-His-NH<sub>2</sub> – 2GH, H-His-Dap(H-His)-Gly-NH<sub>2</sub> – 2HG, H-His-Dap(H-His)-His-NH<sub>2</sub> – 3H. Ligandy te w fizjologicznym zakresie pH tworzą kompleksy typu 3N- $\{N_{Im}, 2NH_2\}$  dla 2HG (Rys. 5c) oraz typu 4N dla pozostałych analogów z uwzględnieniem następujących atomów donorowych:  $\{N_{Im}, 2NH_2\}$  – 3G oraz  $\{N_{Im}, N^-, NH_2\}$  dla 2GH i 3H [49, 96]. Wykazano, że wartość standardowego

potencjału procesu katalitycznego  $\text{Cu}^{2+} \leftrightarrow \text{Cu}^+(\text{E}^0)$  zależy od ilości reszt histydynowych w strukturze liganda przy czym 3H analog odznacza się najmniejszą wartością ( $3\text{H} < 2\text{HG} < 2\text{GH}$ ) [49]. Zależność ta nie jest tożsama z aktywnością  $\text{CuZnSOD}$  i szybkością dysmutacji ( $k$ ), dla których moglibyśmy zapisać szereg:  $2\text{HG} > 2\text{GH} > 3\text{H}$  [49].

Tabela 7. Porównanie właściwości kompleksów peptydów rozgałęzionych  
Table 7. The comparison of properties of branched peptide complexes

| układ                                       | dominująca forma                 | atomy donorowe                                                                                                                   | pH  | $\text{IC}_{50}$<br>$10^{-8}$ [mol/dm <sup>3</sup> ] | $k$<br>[M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ] | lit.     |
|---------------------------------------------|----------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|------------------------------------------------------|-------------------------------------------|----------|
| $\text{Cu}^{2+}/\text{nta}3\text{His}=1/1$  | CuL                              | {2NH <sub>2</sub> , 2N <sub>im</sub> , NH <sub>2(axial)</sub> }                                                                  | 7,4 | 13                                                   | $2,3 \cdot 10^7$                          | [94, 95] |
|                                             | CuH <sub>1</sub> L               | {N <sub>im</sub> , N <sup>+</sup> , N <sub>ter</sub> , O}                                                                        |     |                                                      |                                           |          |
| $\text{Cu}^{2+}/\text{tren}2\text{His}=1/1$ | CuHL                             | {2N <sub>im</sub> , 2NH <sub>2<sup>tr</sup></sub> }                                                                              | 7,4 | 20                                                   | $3 \cdot 10^7$                            | [95]     |
|                                             | CuH <sub>1</sub> L               | {2NH <sub>2<sup>tr</sup></sub> , 2N <sup>+</sup> }                                                                               |     |                                                      |                                           |          |
| $\text{Cu}^{2+}/\text{tren}2\text{His}=2/1$ | Cu <sub>2</sub> H <sub>1</sub> L | {2N <sub>im</sub> , 2 αNH <sub>2</sub> }                                                                                         | 7,4 | 13                                                   | $4,6 \cdot 10^7$                          | [95]     |
|                                             |                                  | {N <sup>+</sup> , N <sub>ter</sub> , NH <sub>2<sup>tr</sup></sub> }<br>lub {N <sup>+</sup> , N <sub>ter</sub> , N <sup>+</sup> } |     |                                                      |                                           |          |
| $\text{Cu}^{2+}/\text{tren}3\text{His}=1/1$ | CuL                              | {2NH <sub>2</sub> , 2N <sub>im</sub> , NH <sub>2(axial)</sub> }                                                                  | 7,4 | 17                                                   | $1,8 \cdot 10^7$                          | [94, 95] |
| $\text{Cu}^{2+}/3\text{G}=1/1$              | CuH <sub>2</sub> L               | {2NH <sub>2</sub> , 2N <sup>+</sup> }                                                                                            | 7,6 | 24                                                   | $1,6 \cdot 10^7$                          | [49, 97] |
| $\text{Cu}^{2+}/2\text{GH}=1/1$             | CuH <sub>1</sub> L               | {NH <sub>2</sub> , N <sub>im</sub> , 2N <sup>+</sup> }                                                                           | 7,6 | 44                                                   | $8,9 \cdot 10^6$                          | [49, 97] |
| $\text{Cu}^{2+}/2\text{HG}=1/1$             | CuL                              | {2NH <sub>2</sub> , N <sub>im</sub> }                                                                                            | 7,6 | 11                                                   | $3,5 \cdot 10^7$                          | [49, 97] |
| $\text{Cu}^{2+}/3\text{H}=1/1$              | CuH <sub>1</sub> L               | {NH <sub>2</sub> , N <sub>im</sub> , 2N <sup>+</sup> }                                                                           | 7,6 | 103                                                  | $3,8 \cdot 10^6$                          | [49, 96] |

## UWAGI KOŃCOWE

W strukturze centrum aktywnego  $\text{CuZnSOD}$  można wyróżnić dwa jony metali, które skoordynowane są przede wszystkim przez atomy azotu z pierścienia imidazolowego, w tym jeden z nich stanowi mostek pomiędzy jonami metali. Taka budowa pozwala na sprawne i szybkie ( $k_{cat}/k_M \sim 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) neutralizowanie  $\text{O}_2^{\cdot-}$  oraz hamowanie niepożądanych efektów reakcji wolnorodnikowych. Zastosowanie substancji naśladujących działanie  $\text{CuZnSOD}$  w ogniskach stresu oksydacyjnego mogłoby ograniczyć jego negatywne skutki. Poszukując związków, które spełniałyby taką rolę, należy wziąć pod uwagę kilka czynników. Bezpośrednio za dysmutację odpowiadają jony miedzi(II), a więc ich obecność jest kluczowa. Ponadto istotny jest sposób związania tego jonu metalu przez ligand, kompleks powinien być stabilny w warunkach zbliżonych do naturalnych, jednocześnie centrum metaliczne powinno być na tyle elastyczne, aby możliwa była zmiana geometrii kompleksu oraz aby rodniki miały swobodny dostęp bezpośrednio do metalu. Ilość reszt histydynowych w sekwencji peptydu nie zawsze musi korespondować ze skutecznością neutralizacji RFT. Znacznie istotniejszym aspektem jest geometria sfery koordynacyjnej. Kompleks taki powinien wykazywać brak toksyczności wobec prawidłowych komórek oraz mieć

niską masę, czyli być odpowiednio mały, a co za tym idzie „mobilny”. Dotychczasowe badania wykazały, że peptydy jako ligandy względem jonów miedzi(II) są dobrymi kandydatami do spełnienia tych warunków, ale w dalszym ciągu ich kompleksy z jonami miedzi nie dorównują swoim przeciwutleniającym działaniem natywnemu enzymowi. Ponadto badania *in vitro* to dopiero preludium do potencjalnego zastosowania tych substancji w ogniskach stresu oksydacyjnego.

### PODZIĘKOWANIE

Autorki serdecznie dziękują Pani Profesor Justynie Brasuń za poświęcony czas oraz wsparcie zarówno merytoryczne jak i mentalne w trakcie realizacji tej pracy.

### PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] M. Woźniak, M. Czyż, *Postepy Hig. Med. Dosw.*, 2008, **62**, 613.
- [2] K. Rahman, *Clin. Interv. Aging*, 2007, **2**, 219.
- [3] G. Bartosz, *Druga twarz tlenu. Wolne rodniki w przyrodzie.*, PWN, Warszawa, 2004.
- [4] T. Mann, D. Keilin, *Proc. R. Soc. Lond. B*, 1938, **126**, 303.
- [5] H. Markowitz, G.E. Cartwright, M. Wintrobe, *J. Biol. Chem.* 1959, **234**, 40.
- [6] J.R. Kimmel, *J. Biol. Chem.*, 1959, **234**, 460.
- [7] F.I. McCord, *J. Biol. Chem.*, 1970, **245**, 1374.
- [8] F.I. McCord, *J. Biol. Chem.*, 1969, **244**, 6056.
- [9] F.I. McCord, *J. Biol. Chem.*, 1969, **244**, 6049.
- [10] J.V. Bannister, W.H. Bannister, G. Rotilio, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 1987, **22**, 111.
- [11] H.E. Parge, R.A. Hallewell, J.A. Tainer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1992, **89**, 6109.
- [12] I.N. Zelko, T.J. Mariani, R.J. Folz, *Free Radic. Biol. Med.*, 2002, **33**, 337.
- [13] P. Bueno, J. Varela, G. Gimenez-Gallego, L.A. Del Rio, *Plant Physiol.*, 1995, **108**, 1151.
- [14] S. Ammendola, P. Pasquali, F. Pacello, G. Rotilio, M. Castor, S.J. Libby, N. Figueroa-Bossi, L. Bossi, F.C. Fang, A. Battistoni, *J. Biol. Chem.*, 2008, **283**, 13688.
- [15] L.A. Sturtz, K. Diekert, L.T. Jensen, R. Lill, V.C. Culotta, *J. Biol. Chem.*, 2001, **276**, 38084.
- [16] D.J. Kliebenstein, R.A. Monde, R.L. Last, *Plant Physiol.*, 1998, **118**, 637.
- [17] F. Frederick, J. Yost, *J. Biol. Chem.*, 1973, **248**, 4905.
- [18] S. Kanematsu, K. Asada, *Arch. Biochem. Biophys.*, 1979, **195**, 535.
- [19] O.A. Asojo, E.J. Schott, G.R. Vasta, A.M. Silva, *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.*, 2006, **62**, 1072.
- [20] B.B. Keele, J.M. McCord, I. Fridovich, *J. Biol. Chem.*, 1970, **245**, 6176.
- [21] F.I. Weisiger, *J. Biol. Chem.*, 1973, **248**, 4893.
- [22] E. Fréalle, C. Noël, E. Viscogliosi, D. Camus, E. Dei-Cas, L. Delhaes, *Immunol. Med. Microbiol.*, 2005, **45**, 411.
- [23] H.D. Youn, E.J. Kim, J.H. Roe, Y.C. Hah, S.O. Kang, *Biochem. J.*, 1996, **318**, 889.
- [24] I. Fridovich, *J. Biol. Chem.*, 1997, **272**, 18515.
- [25] D.K. St. Clair, T.D. Oberley, K.E. Muse, W.H. St. Clair, *Free Radic. Biol. Med.*, 1994, **16**, 275.
- [26] J.R. Wispe, B.B. Warner, J.C. Clark, C.R. Dey, J. Neuman, S.W. Glasser, J.D. Crapo, L.Y. Chang, J.A. Whitsett, *J. Biol. Chem.*, 1992, **267**, 23937.
- [27] S.L. Marklund, E. Holme, L. Hellner, *Clin. Chim. Acta.*, 1982, **126**, 41.
- [28] S.L. Marklund, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1982, **79**, 7634.
- [29] M. Skrzycki, H. Czczot, *Postep. Hig. Med. Dosw.*, 2004, **58**, 301.

- [30] D. Levanon, J. Lieman-Hurwitz, N. Dafni, M. Wigderson, L. Sherman, Y. Bernstein, Z. Laver-Rudich, E. Danciger, O. Stein, Y. Groner, *EMBO J.*, 1985, **4**, 77.
- [31] J.A. Tainer, E.D. Getzoff, K.M. Beem, J.S. Richardson, D.C. Richardson, *J. Mol. Biol.*, 1982, **160**, 181.
- [32] F.I. Forman, *J. Biol. Chem.*, 1973, **248**, 2645.
- [33] I.A. Abreu, D.E. Cabelli, *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics*, 2010, **1804**, 263.
- [34] P.J. Hart, M.M. Balbirnie, N.L. Ogihara, A.M. Nersissian, M.S. Weiss, J.S. Valentine, D. Eisenberg, *Biochemistry*, 1999, **38**, 2167.
- [35] L.L. Costanzo, G. De Guidi, S. Giuffrida, E. Rizzarelli, G. Vecchio, *J. Inorg. Biochem.*, 1993, **50**, 273.
- [36] H.A. Azab, C. Luchinat, L. Band, M.S. Viezzoli, M. Borsari, M. Sola, *Inorg. Chem.*, 1992, **31**, 4649.
- [37] D. Klug, J. Rabani, I. Fridovich, *J. Biol. Chem.*, 1972, **247**, 4839.
- [38] R.N. Patel, K.B. Pandeya, *J. Inorg. Biochem.*, 1998, **72**, 109.
- [39] D.R. Brown, C. Clive, S.J. Haswell, *J. Neurochem.*, 2001, **76**, 69.
- [40] Á. Dancs, K. Selmeczi, D. Árus, D. Szunyogh, T. Gajda, *Int. J. Pept. Res. Ther.*, 2018, **24**, 571.
- [41] A. Jancso, Z. Paksi, N. Jakab, B. Gyurcsik, A. Rockenbauer, T. Gajda, *Dalt. Trans.*, 2005, **19**, 3187.
- [42] G. Csire, S. Timári, J. Asztalos, J.M. Király, M. Kiss, K. Várnagy, *J. Inorg. Biochem.*, 2017, **177**, 198.
- [43] D. Vaslensin, Ł. Szyrwił, F. Camponeschi, M. Rowińska-Zyrek, E. Molteni, E. Jankowska, A. Szymanska, E. Gaggelli, G. Valensin, H. Kozłowski, *Inorg. Chem.*, 2009, **48**, 7330.
- [44] D.R. Brown, B.S. Wong, F. Hafiz, C. Clive, S.J. Haswell, I.M. Jones, *Biochem. J.*, 1999, **344**, 1.
- [45] A. Kotynia, T. Janek, Ż. Czyżnikowska, S. Bielińska, W. Kamysz, J. Brasuń, *Int. J. Pept. Res. Ther.*, 2017, **23**, 431.
- [46] F.I. Beauchamp, *Anal. Biochem.*, 1971, **44**, 276.
- [47] D.A. Kostić, D.S. Dimitrijević, G.S. Stojanović, I.R. Palić, A.S. Dordević, J.D. Ickovski, *J. Chem.*, 2015, 2015.
- [48] C.G. Goldstein, Ch. Michel, W. Bors, M. Saran, G. Czapski, *Free Radic. Biol. Med.*, 1988, **4**, 295.
- [49] L. Szyrwił, M. Shimura, B. Setner, Z. Szewczuk, K. Malec, W. Malinka, J. Brasun, J.S. Pap, *Int. J. Pept. Res. Ther.*, 2019, **25**, 711.
- [50] L.W. Kaska, C. Carrano, J. Michalowski, J. Jackson, *Bioinorg. Chem.*, 1978, **8**, 225.
- [51] M. Sun, S. Zigman, *Anal. Biochem.*, 1978, **90**, 81.
- [52] H.P. Misra, I. Fridovich, *J. Biol. Chem.*, 1972, **247**, 3170.
- [53] S. Marklund, G. Marklund, *Eur. J. Biochem.*, 1974, **47**, 469.
- [54] R. Gao, Z. Yuan, Z. Zhao, X. Gao, *Bioelectrochemistry Bioenerg.*, 1998, **45**, 41.
- [55] Y. Kono, *Arch. Biochem. Biophys.*, 1978, **186**, 189.
- [56] N. Crosti, T. Servidei, J. Bajer, A. Serra, *Clin. Chem. Lab. Med.*, 1987, **25**, 265.
- [57] R.E. Bensinger, C.M. Johnson, *Anal. Biochem.*, 1981, **116**, 142.
- [58] S. Girotti, F. Fini, E. Ferri, R. Budini, S. Piazza, D. Cantagalli, *Talanta.*, 2000, **51**, 685.
- [59] T.V. Zhidkova, E.V. Proskurnina, E.A. Parfenov, Y.A. Vladimirov, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2011, **401**, 381.
- [60] R. Pogni, M.C. Baratto, E. Busi, R. Basosi, *J. Inorg. Biochem.*, 1999, **73**, 157.
- [61] A. Myari, G. Malandrinos, J. Plakatouras, N. Hadjiliadis, I. Sovago, *Bioinorg. Chem. Appl.*, 2003, **1**, 99.
- [62] B. Bóka, A. Myari, I. Sóvágó, N. Hadjiliadis, *J. Inorg. Biochem.*, 2004, **98**, 113.
- [63] S. Rajković, C. Kállay, R. Serényi, G. Malandrinos, N. Hadjiliadis, D. Sanna, I. Sóvágó, *Dalt. Trans.*, 2008, **37**, 5059.

- [64] M. Ciuffi, C. Cellai, S. Franchi-Micheli, P. Failli, L. Zilletti, M. Ginanneschi, M. Chelli, A.M. Papini, F. Paoletti, *Pharmacol. Res.*, 1998, **38**, 279.
- [65] M. Casolaro, M. Chelli, M. Ginanneschi, F. Laschi, L. Messori, M. Muniz-Miranda, A.M. Papini, T. Kowalik-Jankowska, H. Kozłowski, *J. Inorg. Biochem.*, 2002, **89**, 181.
- [66] M. Casolaro, M. Chelli, M. Ginanneschi, F. Laschi, M. Muniz-Miranda, A.M. Papini, G. Sbrana, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, 1999, **55**, 1675.
- [67] Z. Paksí, A. Jancsó, F. Pacello, N. Nagy, A. Battistoni, T. Gajda, *J. Inorg. Biochem.*, 2008, **102**, 1700.
- [68] C. Kállay, K. Várnagy, G. Malandrinos, N. Hadjiliadis, D. Sanna, I. Sóvágó, *Inorganica Chim. Acta.*, 2009, **362**, 935.
- [69] D.R. Brown, H. Kozłowski, *Dalton Trans.*, 2004, 1907.
- [70] H.A. Kretschmar, S.B. Pruisner, L.E. Stowring, S.J. DeArmond, *Am. J. Pathol.*, 1986, **122**, 1.
- [71] D.R. Brown, A. Besinger, *Biochem. J.*, 1998, **334**, 423.
- [72] D. La Mendola, R.P. Bonomo, S. Caminati, G. Di Natale, S.S. Emmi, Ö. Hansson, G. Maccarrone, G. Pappalardo, A. Pietropaolo, E. Rizzarelli, *J. Inorg. Biochem.*, 2009, **103**, 195.
- [73] P. Stańczak, H. Kozowski, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2007, **352**, 198.
- [74] J. Yin, J. Zhuang, S. Lv, Y. Mu, *J. Mol. Recognit.*, 2018, **31**, 1.
- [75] F. Yan, G. Yan, S. Lv, N. Shen, Y. Mu, T. Chen, P. Gong, Y. Xu, L. Lv, J. Liu, J. Shen, G. Luo, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2011, **43**, 1802.
- [76] C.J. White, A.K. Yudin, *Nat. Chem.*, 2011, **3**, 509.
- [77] D.J. Craik, Y. Young Shim, U. Göransson, G.P. Moss, N. Tan, P.D. Jadhav, J. Shen, M.J.T. Reaney, *Biopolymers.*, 2016, **106**, 917.
- [78] G. Arena, R.P. Bonomo, L. Casella, M. Gullotti, G. Impellizzeri, G. Maccarrone, E. Rizzarelli, *J. Chem. Soc., Dalt. Trans.*, 1991, 3203.
- [79] G. Arena, G. Impellizzeri, G. Maccarrone, G. Pappalardo, D. Sciotto, E. Rizzarelli, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, 1992, **2**, 371.
- [80] S. Kubota, J.T. Yang, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1984, **81**, 3283.
- [81] R.P. Bonomo, E. Conte, G. Impellizzeri, G. Pappalardo, R. Purrello, E. Rizzarelli, *J. Chem. Soc., Dalt. Trans.*, 1996, 3093.
- [82] R.P. Bonomo, R. Marchelli, G. Tabbi, *J. Inorg. Biochem.*, 1995, **60**, 205.
- [83] R.P. Bonomo, G. Impellizzeri, G. Pappalardo, R. Purrello, E. Rizzarelli, G. Tabbi, *J. Chem. Soc. - Dalt. Trans.*, 1998, 3851.
- [84] G. Formicka-Kozłowska, H. Kozłowska, I.Z. Siemion, K. Sobczyk, E. Nawrocka, *J. Inorg. Biochem.*, 1981, **15**, 201.
- [85] L.D. Pettit, I. Steel, G. Formicka-Kozłowska, T. Tatarowski, M. Bataille, *J. Chem. Soc. Dalt. Trans.*, 1985, 535.
- [86] M. Bataille, G. Formicka-Kozłowska, H. Kozłowski, L.D. Pettit, I. Steel, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1984, 231.
- [87] A. Fragoso, P. Lamosa, R. Delgado, O. Iranzo, *Chem. - A Eur. J.*, 2013, **19**, 2076.
- [88] A. Fragoso, T. Carvalho, P. Rousselot-Pailley, M.M. Correia Dos Santos, R. Delgado, O. Iranzo, *Chem. - A Eur. J.*, 2015, **21**, 13100.
- [89] J.F. Galey, B.D.-L. Reverend, A. Lebkiri, L.D. Pettit, S.I. Pyburn, H. Kozłowski, *J. Chem. Soc. Dalt. Trans.*, 1991, 2281–2287
- [90] A. Fragoso, R. Delgado, O. Iranzo, *Dalt. Trans.*, 2013, **42**, 6182.
- [91] A. Kotynia, Z. Czyżnikowska, S. Bielińska, L. Szyrwiel, W. Kamysz, W. Malinka, J. Brasuń, *New J. Chem.*, 2014, **38**, 5198.
- [92] A. Kotynia, S. Bielińska, W. Kamysz, J. Brasuń, *Dalt. Trans.*, 2012, **41**, 12114.
- [93] G. Arena, R.P. Bonomo, G. Impellizzeri, R.M. Izatt, J.D. Lamb, E. Rizzarelli, *Am. Chem. Soc.*, 1987, **26**, 795.



- [94] Á. Dancs, N. V. May, K. Selmecezi, Z. Darula, A. Szorosik, F. Matyuska, T. Páli, T. Gajda, *New J. Chem.*, 2017, **41**, 808.
- [95] Á. Dancs, K. Selmecezi, N. V. May, T. Gajda, *New J. Chem.*, 2018, **42**, 7746.
- [96] Ł. Szyrwił, J.S. Pap, Ł. Szczukowski, Z. Kerner, J. Brasuń, B. Setner, Z. Szewczuk, W. Malinka, *RSC Adv.*, 2015, **5**, 56922.
- [97] Ł. Szyrwił, Ł. Szczukowski, J.S. Pap, B. Setner, Z. Szewczuk, W. Malinka, *Inorg. Chem.*, 2014, **53**, 7951.

Praca wpłynęła do Redakcji 13 lipca 2020 r.