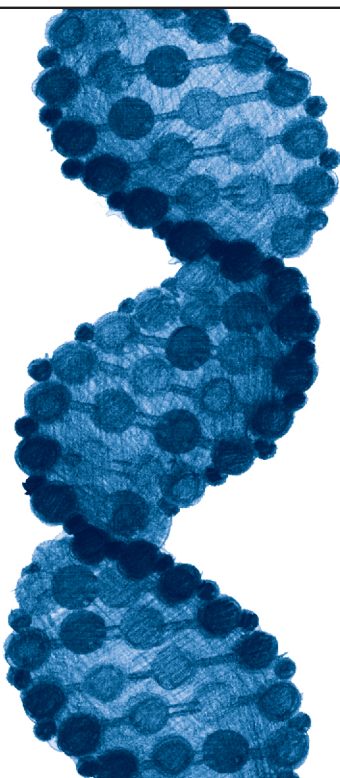


NA POGRANICZU CHEMII I BIOLOGII



TOM XXXV

WYDAWNICTWO
NAUKOWE UAM

NA POGRANICZU
CHEMII I BIOLOGII

UNIwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

NA POGRANICZU CHEMII I BIOLOGII

TOM XXXV

pod redakcją

HENRYKA KORONIAKA I JANA BARCISZEWSKIEGO



POZNAŃ 2015

Recenzent: prof. dr hab. Bernard Lammek

Podręcznik dla studentów chemii, biologii, chemii bioorganicznej,
biotechnologii i biologii molekularnej
oraz dla młodych pracowników nauki

Wydanie publikacji dofinansowane przez Wydział Chemii UAM

© Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu,
Wydawnictwo Naukowe UAM, Poznań 2015

Redaktor: Katarzyna Muzia

Redaktor techniczny: Dorota Borowiak

Łamanie komputerowe: Eugeniusz Strykowski

Projekt okładki: Ewa Wąsowska

ISBN 978-83-232-2989-6

WYDAWNICTWO NAUKOWE UNIwersytetu IM. ADAMA MICKIEWICZA W POZNANIU
61-701 POZNAŃ, UL. FREDRY 10

www.press.amu.edu.pl

Sekretariat: tel. 61 829 46 46, faks 61 829 46 47, e-mail: wyd nauk@amu.edu.pl

Dział sprzedaży: tel. 61 829 46 40, e-mail: press@amu.edu.pl

Wydanie I. Ark. wyd. 19,50. Ark. druk. 16,50.

DRUK I OPRAWA: EXPOL, WŁOCŁAWEK, UL. BRZESKA 4

SPIS TREŚCI

Przedmowa	9
Część pierwsza: BIOLOGIA CHEMICZNA	
DARIA KACZMARCZYK, STANISŁAW LOCHYŃSKI Kombucha broth as a natural source of organic acids	13
ALEKSANDRA TESMAR, DARIUSZ WYRZYKOWSKI, DAGMARA JACEWICZ, JOANNA PRANCZK, LECH CHMURZYŃSKI Reaktywne formy tlenu – wrogowie czy sprzymierzeńcy komórek roślin- nych?	23
JOANNA PRANCZK, DAGMARA JACEWICZ, DARIUSZ WYRZYKOWSKI, ALEKSANDRA TESMAR, LECH CHMURZYŃSKI Ochrona komórek roślinnych – antyoksydanty w roli głównej	35
AGATA ZAUSZKIEWICZ-PAWLAK, JOLANTA KUBASIK, KAMILA SIEDLECKA-KROPLEWSKA, NATALIA MELKA, MICHAŁ WOŹNIAK Syntetyczne utleniacze i przeciwutleniacze w modelu peroksydacji lipidów i badaniach uszkodzeń błon komórkowych	45
DOROTA SKÓRA, KAROLINA NISKA, MACIEJ NIEDŹWIECKI, ELŻBIETA DROŻYŃSKA, MICHAŁ WOŹNIAK, MAGDALENA GÓRSKA Białka szoku termicznego i ich rola w diagnostyce i terapii chorób nowo- tworowych u dzieci	59
HALINA STROIŃSKA, ZBIGNIEW MAĆKIEWICZ Peptydy z grupy hemorfin o potencjalnych właściwościach przeciwbólowych ..	71
MAŁGORZATA URBAŃCZYK, JOANNA KRZCIUK-GULA, NORBERT SEWALD, RAFAŁ LATAJKA Synthesis of antifreeze glycopeptides (AFGP)	81
MATEUSZ PALLACH, NATALIA NOWACKA, MAŁGORZATA CZERWICKA, KAROLINA OSSOWSKA, SYLWIA SZULTA, RENATA NOWAK, ZBIGNIEW KACZYŃSKI Badania strukturalne polisacharydów wyizolowanych z grzybów wielko- owocnikowych (<i>Basidiomycetes</i>)	89

DAGMARA LUBOWIECKA, KAROLINA NISKA, EWELINA ZIELIŃSKA, URSZULA POPOWSKA, IWONA INKIELEWICZ-STĘPNIAK, ZBIGNIEW ŚLEDZINSKI, MICHAŁ WOŹNIAK	
Wpływ greliny na dysfunkcję śródbłonka naczyniowego wywołaną przez cukrzycę	97
MAŁGORZATA BUREK, ILONA WANDZIK, SYLWIA WAŚKIEWICZ	
Hydrożele zawierające jednostki cukrowe jako potencjalne nośniki leków	107
Część druga: CHEMIA ORGANICZNA	
KAROLINA OSSOWSKA, EWA KUPFERSCHMIED, MAŁGORZATA CZERWICKA, SYLWIA SZULTA, MATEUSZ PALLACH, ZBIGNIEW KACZYŃSKI	
Izolacja i określenie struktury chemicznej o-antygeny bakterii <i>Dickeya</i> <i>solani</i>	121
MAREK KŁOBUCKI, ALEKSANDRA GRUDNIEWSKA, CZESŁAW WAWRZEŃCZYK	
Otrzymywanie i aktywność farmakologiczna modyfikowanych glicerofosfo- lipidów	131
JUSTYNA BEDNARKO, JUSTYNA WIELIŃSKA, BEATA LIBEREK, ANDRZEJ NOWACKI	
Badania konformacyjne kwasu treonukleinowego z wykorzystaniem metod chemii teoretycznej	141
MAGDALENA BOJKO, JERZY FALANDYSZ, ZBIGNIEW MAĆKIEWICZ	
Oznaczanie witamin rozpuszczalnych w tłuszczach zawartych w grzybach z zastosowaniem HPLC	151
EWELINA KIREJCZYK, PIOTR P. WIECZOREK	
Wykorzystanie dwuwymiarowej chromatografii cieczowej w analizie zwią- zków farmaceutycznych w próbkach wód środowiskowych	159
KAROLINA KUCAB, PIOTR P. WIECZOREK	
Metody przygotowania próbek o złożonym składzie matrycy do oznaczania ksenobiotyków	169
JUSTYNA WIELIŃSKA, JUSTYNA BEDNARKO, ANDRZEJ NOWACKI, BEATA LIBEREK	
Zastosowanie metod DFT do badania równowag kwasowo-zasadowych wy- branych leków przeciwnowotworowych	179
Część trzecia: CHEMIA BIONIEORGANICZNA	
MAŁGORZATA T. KACZMAREK, MICHAŁ ZABISZAK, RENATA JASTRZĄB	
Biologicznie aktywne kompleksy jonów lantanowców – związki nowej ge- neracji	189
JUSTYNA WOJCIESZEK, LENA RUZIK, MACIEJ JAROSZ	
Zastosowanie modelu trawienia <i>in vitro</i> w ocenie bioprzyswajalności pier- wiastków śladowych	205

WIOLETTA JAKUBCZAK, MAJA HACZYK, MICHAŁ CHUDY, ARTUR DYBKO, KATARZYNA PAWLAK	
Określanie zmian homeostazy metali w komórkach rakowych i prawidłowych za pomocą spektrometrii mas z jonizacją w plazmie indukcyjnie sprzężonej	215
KAMILA KARMOWSKA, BARBARA PATORCZYK-PYTLIK	
Zawartość i przemiany siarki w glebie	225
MONIKA KUPIEC, KATARZYNA PAWLAK	
Analiza jakościowa metabolitów kompleksów złota o potencjalnych właściwościach przeciwnowotworowych	235
KATARZYNA BRAMA, KATARZYNA TRACZ, DANUTA MARIA ANTOSIEWICZ, KATARZYNA PAWLAK	
Analiza kompleksów nikotianaminy z wybranymi metalami za pomocą HILIC ESI MS/MS	245
KINGA ŁUCZKA, BARBARA GRZMIL, BOGUMIŁ KIC, KRZYSZTOF KOWALCZYK	
Badania antykorozyjnych pigmentów fosforanowych	255

PRZEDMOWA



Niniejszy XXXV tom serii *Na pograniczu chemii i biologii* jest zbiorem 24 krótkich artykułów, eksperymentalnych lub przeglądowych, przygotowanych i przedstawionych przez doktorantów podczas corocznej konferencji w Karpaczu. Tom ten podzielony jest na trzy części: biologię chemiczną, chemię organiczną i chemię bionieorganiczną.

W pracach zaprezentowano wyniki badań z realizacji pojedynczych projektów badawczych, a także krytyczne opracowania ważnych problemów naukowych. Przypisanie danego artykułu do określonej części nie jest oparte na ostrych kryteriach. Heterogenność tematyczna oraz różnorodność stosowanych metod doświadczalnych pokazują wielki potencjał badawczy młodych pracowników nauki oraz naszych polskich instytutów.

Mamy nadzieję, że lektura tego tomu będzie źródłem wiedzy o nowych zagadnieniach i zjawiskach biologicznych oraz podejściach doświadczalnych mających na celu rozpoznanie problemów biologicznych. Opracowania są dobrą podstawą do uzupełnienia wiedzy z wybranych dziedzin. Kierujemy je do studentów i młodych pracowników nauki.

Henryk Koroniak

Jan Barciszewski

Redaktorzy *Na pograniczu chemii i biologii*

Część pierwsza



**BIOLOGIA
CHEMICZNA**

KOMBUCHA BROTH AS A NATURAL SOURCE OF ORGANIC ACIDS¹

DARIA KACZMARCZYK^{1,2*}, STANISŁAW LOCHYŃSKI^{1,2}

¹ Department of Bioorganic Chemistry, Faculty of Chemistry,
Wrocław University of Technology

ul. Wybrzeże Wyspiańskiego 27, 50-370 Wrocław, Poland

² Institute of Cosmetology, Wrocław College of Physiotherapy
ul. Kościuszki 4, 50-038 Wrocław, Poland

* e-mail: daria.kaczmarczyk@pwr.wroc.pl

Keywords: tea infusion, Kombucha, titration

1. Introduction

Tea infusion has been known and consumed in many countries all over the world for millennia. In China, many kinds of leaves have been used for five thousand years, mainly as stimulating and purifying elixir [1, 2]. It has endured the test of time and evolved into one of the most popular drinks valued for its taste and beneficial properties which finds the reflection in recent scientific reports [3, 4].

Apart from the larger scale of production, that needs to meet a demand, the methods of acquiring the final product remain fairly unchanged. Underdeveloped leaf buds and early two-, three-days old leaves are the resource of a quality black tea. After harvesting they are initially dried, next rolled or chopped, then fermented and finally dried again [5]. This process ensures that enzymes present in leaves become active and

¹ The following research was co-financed from “Stypendia naukowe dla najlepszych doktorantów i młodych doktorów” funds, being a part of “Rozwój potencjału dydaktyczno-naukowego młodej kadry akademickiej Politechniki Wrocławskiej” project, co-financed by European Union as a part of European Social Fund. Agreement number: MK/SN/496/IX/2013/U.

give the product its desirable properties. Green tea however, is received by quick drying directly after harvesting. In this case the intention is to keep enzymes deactivated [6].

Depending on kind and origin, tea drinks tend to regulate proper function of digestive system, strengthen walls of blood vessels, improve general physical efficiency and concentration [5].

The Kombucha drink in its traditional and most popular form is acquired in fermentation process utilizing tea and sucrose [7]. However, many cases of using different substrates are known and documented (teas and local herbs, other forms of carbohydrates as the source of energy) [1]. Depending on region and ethnic origin, Kombucha can be named in misleading way, such as: Manchurian mushroom, tea fungus or Chinese mushroom [7, 8]. After more precise studies that followed increased scientific interest, it was proved to be a symbiotic colony of multiple non-pathogenic bacteria and yeast rather than a fungus [3, 4, 9]. Two distinctive phases can be identified in the final form of Kombucha. The first one – bacterial cellulose of extremely high purity and superior spatial distribution of fibers is synthesized by acetic acid bacteria strains [4]. It manifests itself in form of cream-colored or light beige layers suspended in the liquid phase [10]. Thanks to its superior quality, properties and possible use, the bacterial cellulose has become a potent and popular object of studies. The main microorganisms responsible for the synthesis were identified as *Gluconacetobacter xylinum* [7, 9]. The successful research and experiments have been performed in recent years proving that the bacterial cellulose can be used as medical dressings, well suited to use on hard healing wounds, such as burnings [11].

The second phase, being the topic of this paper, is the consumable slightly sparkling broth of unique sweet and sour taste [8]. The organoleptic tests proved that various combinations of ingredients, as well as growth methodology have an impact on final reception of the drink.

Kombucha drink has become the field of interest mainly for its potential therapeutic properties [4]. Kombucha has become a potent research object, alongside with tea. It is a well known remedy used in folk medicine, believed to cure many illnesses and improving wellbeing in general, boosting awareness and concentration, extending longevity as well as having anti-carcinogenic and anti-diabetic effects, treatment for gastric ulcers and high cholesterol and impacting immune response and liver detoxification [2, 7, 8, 9].

There are several origin theories found in literature. It is possible that Kombucha comes from Far East, where first evidence date on 2nd century BC [9]. In year 414 AD it was brought from China to Japan by

the command of ruling Emperor as a digestion ailment remedy and already renowned universal drug [2]. Kombucha and its beneficial health properties were rediscovered in the beginning of 20th century. A group Japanese researchers in their study on longevity among Caucasian natives whose age exceeded one hundred years reported that subjects had regularly consumed fermented tea drink [2]. Tea fungus can be found in many homes being grown using traditional methods [9].

Over the years of studies more substantial and precise decomposition of Kombucha was made. Apart from aforementioned organisms and cellulose – organic acids, vitamins, polyphenols and mineral compounds can be accounted as the main components [3, 4]. The research started leaning towards its potential beneficial influence on health. The specific set of substances inspired a search in the field of skin, hair and nails care. Possibilities of introducing into many industry branches arisen.

Some cases of intolerance and poisoning have been recorded, but rarely directly tied to Kombucha. Allergic reactions, digestive problems and – in extreme case – kidney failure, may have been an effect of questionable quality of growth [2].

Being a product of tea fermentation, Kombucha expresses antioxidant and antidiabetic activity thanks to tea polyphenols and ascorbic acid. It was proven that Kombucha has greater activity than unfermented tea [12]. It can be used as a natural antioxidant with ability of mitigating oxidative stress, maintaining body mass or restoring blood glucose levels [13].

The trend of using natural ingredients in the industry, especially the food and cosmetic, has triggered even greater need of pursuing alternative sources. Kombucha drink, being a potent source of acids has become a field of interest and studies. The starting point of author's research was a desire of combining all beneficial properties of tea and Kombucha in cosmetology and further testing acquired results using scientific methods.

2. Objective

The aim of this work is to determine the properties of products of biotransformations of selected tea kinds, with particular focus on substances present in the infusion and acids produced during Kombucha growth as well as discovering and fixing optimal measurement conditions. The purpose of conducted experiment was to evaluate if the aforementioned organic acids can become a potential ingredient in many in-

dustry branches (food, cosmetic). It seems to be an interesting field of study with great research potential. Conducting research on temporal and environmental conditions impact on acid production intensity is preliminary step to further analysis encompassing the influence of natural ingredients on skin properties (inter alia: moisture content, sebum production, exfoliation).

3. Material and methods

The culture was conducted in a set of two sterile 200 ml beakers by preparing tea infusions, using 4 g of black, green or white tea each per 1000 ml of distilled water. The sucrose responsible for providing energy, was added in two quantities: 50 g and 100 g per 1000 ml. The resulting set-up, summarized in Table, was finally tripled in order to minimize randomness and decrease error spread. The set of 18 samples (6 tea – sucrose variants distinguished by sample symbol multiplied 3 times) gave a variety of properties for comparison and analysis. Each sample was initiated by 100 ml of a starter culture per 1000 ml for inoculation and initial acidification. Described experiment was held in the following environmental conditions: room temperature and low light exposition.

Table. The list of samples and their symbols used for Kombucha grow in the experiment (tripled for each measurement cycle)

Tea	Sucrose content [g] per 1000 ml of distilled water	Sample symbol
Black	50	Bk 50
Green		Gr 50
White		Wh 50
Black	100	Bk 100
Green		Gr 100
White		Wh 100

In the course of the experiment, the following parameters and dependencies were recorded and calculated for each sample:

- pH changes – recorded using multifunction tester/conductometer;
- mass (further recalculated as percentage change in relation to initial mass) – measured using electronic scales;

- total acid content calculation by titration method using sodium hydroxide as standard solution and phenolphthalein as an indicator.

The previous research showed that there is a need for fixing optimal culture growth condition by maintaining possibly unchanged parameters for all samples and keeping optimal measurement conditions. As the experiment developed, pH of acidifying solution, initial mass of cellulose layer and added white tea samples were normalized. What is more, the methodology of data acquisition (pH meter, titration) was controlled made repeatable. Also, the measurement scenarios were put in place: the number of measurement cycles and number of repetitions were assigned; multiple measurements in series allowed to acquire statistical assessment metrics (expected values, error spread, deviations). Changes in time and differences depending on kind of used tea (black, green, white), quantity of sucrose were calculated with variable cycle time of 22 days (measurements taken in fixed and equal time periods). Finally, the extended measurement cycle of 43 days was kept in order to observe more dependencies.

4. Results and discussion

In order to acquire pH and acid content data, two measurement cycles were performed using 6 variants of tea – sucrose samples (see Table). The whole batch of test material was tripled in order to minimize the risk of contamination and to decrease result spread. Figure 1 shows averaged pH measurement results in function of cycle time. Marked error bars reflect doubled standard deviations for each sample triplet.

In the second measurement cycle, the aforementioned control of starter culture masses and initial pH levels was incorporated. In most of the samples it resulted in decreased spread (Figure 1b, c). The lowest pH level was achieved for green and white teas.

For all combinations of teas and sucrose content, one can observe identical direction of pH changes in time. What is more, pH decreases in all samples during whole cycle time and is more rapid in the first phase. After around two weeks of observations, pH changes speed has decreased, which is finely visible on figure 2 encompassing extended measurement cycle. These observations correspond with previous results and literature data [4, 9]. In all cases, from the beginning of the cycle, sucrose content has visible influence on pH level, which is lower in samples rich in sucrose.

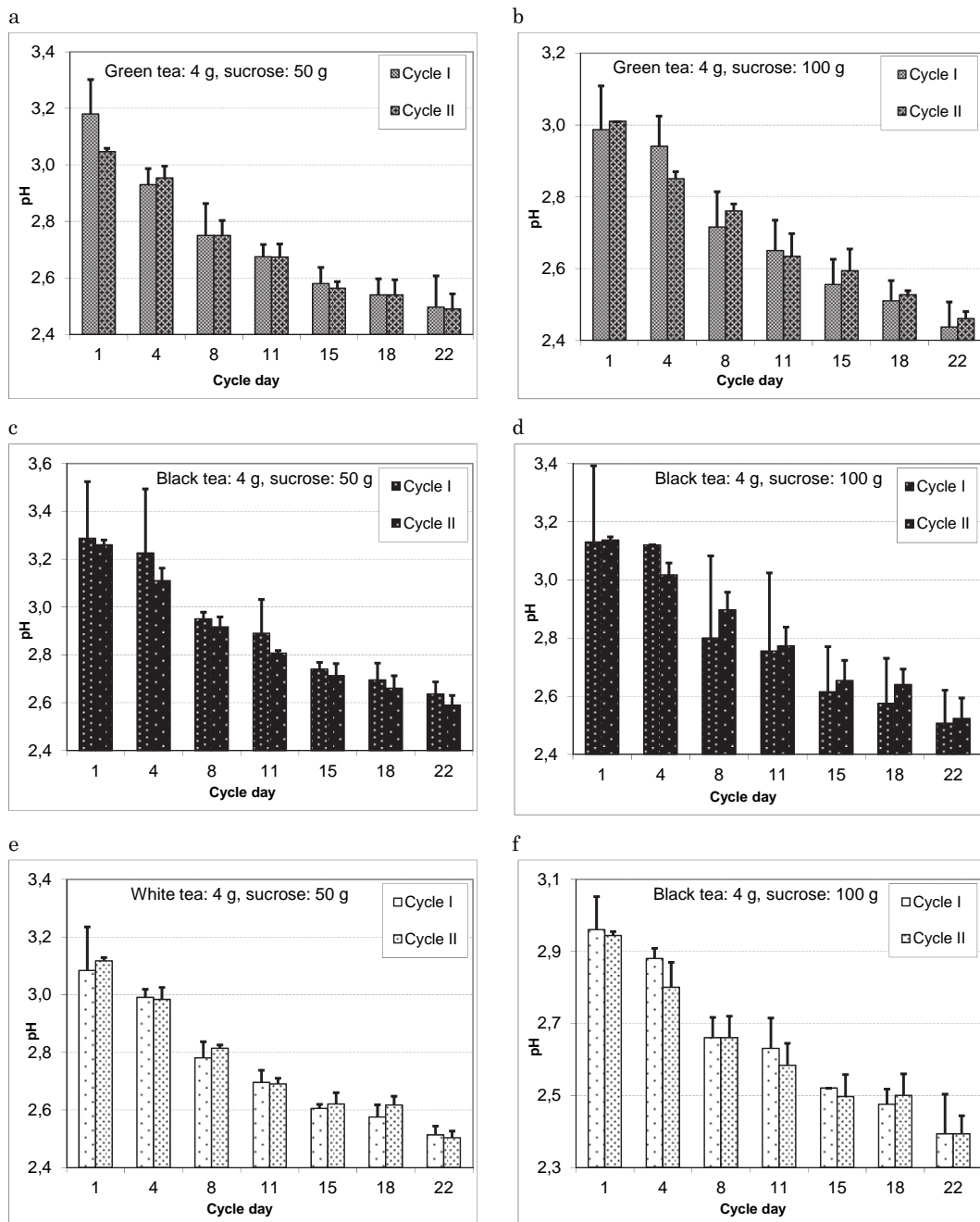


Fig. 1. pH changes in function of time: a) green tea, 50 g of sucrose; b) green tea, 100 g of sucrose; c) black tea, 50 g of sucrose; d) black tea, 100 g of sucrose; e) white tea, 50 g of sucrose; f) white tea, 100 g of sucrose

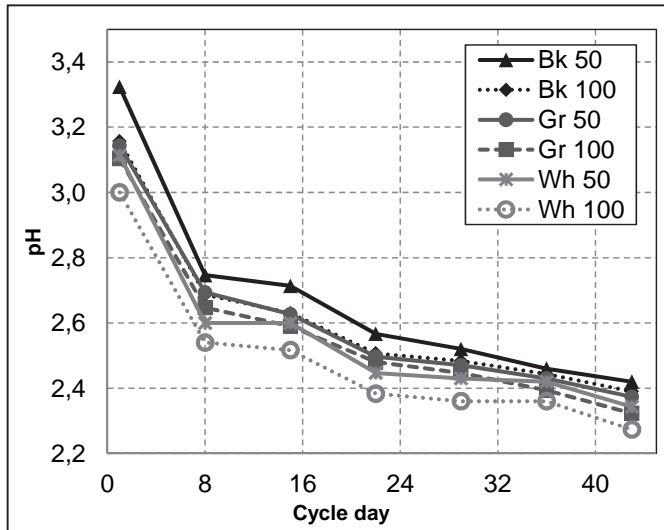


Fig. 2. pH changes comparison for all tea – sucrose variants including extended measurement cycle of 40 days. Dotted lines represent samples with sucrose content of 100 g

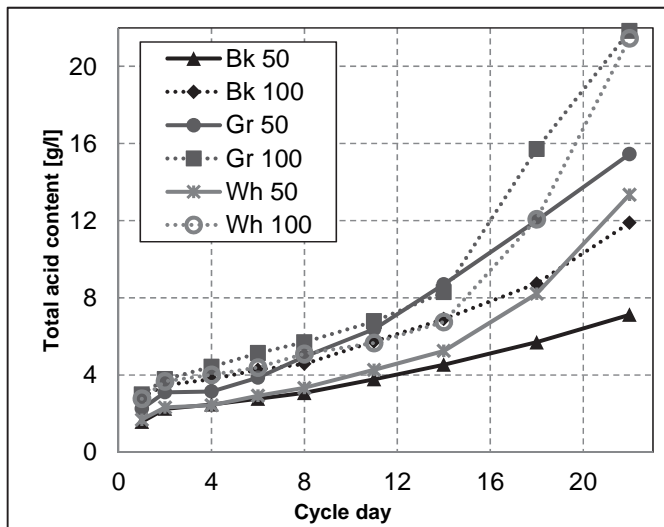


Fig. 3. Total acid content in consecutive days of the measurement cycle. Dotted lines represent samples with sucrose content of 100 g

Total acid content was evaluated using titration method with standard solution of sodium hydroxide with phenolphthalein as indicator. Figure 3 presents averaged acid content results for all combination tea –

sucrose. The trend corresponds with literature data [14] and measurements performed with and pH-meter, acid content is higher for green and white tea samples.

Increased sucrose content resulted in greater acid production for all respective samples sets. Performed experiment shows that one can control and tune the acidity levels using various substrate proportions.

5. Conclusions and perspectives

Progressive acidification of solution during cycle time was observed for all researched samples. Result spread was decreased by unifying and equalizing of acidifying solution pH and initial masses for all sample combinations. The longer measurement cycle is, the more factors become responsible for acid content changes in samples. Increased sucrose content has low impact on scale of acidification. The total acid content trend matches results taken using pH meter. White and green tea samples produced more acids in comparison to samples with black tea. The most common scenario was a tenfold increase of acid content per double mass increment.

The results acquired during described research may contribute to expanding the range of use of presented natural ingredients in cosmetic industry. They are also proven to have beneficial influence on functional properties of skin by moisturizing, regulating and exfoliating action.

Literature

- [1] Velićanski A., Cvetković D., Markov S. (2013) Characteristics of Kombucha fermentation on medicinal herbs from Lamiaceae family, *Rom. Biotech. Lett.* 18, 8034–8042.
- [2] Dufresne C., Farnworth E. (2000) Tea, Kombucha, and health: a review, *Food Res. Int.* 33, 409–421.
- [3] Bhattacharya S., Gachhui R., Sil P.C. (2013) Effect of Kombucha, a fermented black tea in attenuating oxidative stress mediated tissue damage in alloxan induced diabetic rats, *Food Chem. Toxicol.* 60, 328–340.
- [4] Lončar E.S., Kanurić K.G., Malbaša R.V., Durić M.S., Milanović S.D. (2014) Kinetics of saccharose fermentation by Kombucha, *Chem. Ind. Chem. Eng. Q.* 20, 345–352.
- [5] Kuntze L. (2003) Tea, Black/Green, [w:] *The ABC Clinical Guide to Herbs*, red. M. Blumenthal, American Botanical Council, Austin TX, 335–351.
- [6] Matławska I. (2006) *Farmakognozja*, Wyd. Nauk. Akademii Medycznej w Poznaniu, Poznań.
- [7] Jarrell J., Cal T., Bennett J.W. (2000) The Kombucha Consortia of yeasts and bacteria, *Mycologist* 14, 166–170.

-
- [8] Jayabalan R., Marimuthu S., Thangaraj P., Sathishkumar M., Binupriya A.R., Swaminathan K., Yun S.E. (2008) Preservation of Kombucha Tea – Effect of Temperature on Tea Components and Free Radical Scavenging Properties, *J. Agric. Food Chem.* 56, 9064–9071.
- [9] Marsh A.J., O'Sullivan O., Hill C., Ross R.P., Cotter P.D. (2014) Sequence-based analysis of the bacterial and fungal compositions of multiple kombucha (tea fungus) samples, *Food Microbiol.* 38, 171–178.
- [10] Zhu C., Li F., Zhou X., Lin L., Zhang T. (2013) Kombucha synthesized bacterial cellulose: Preparation, characterization, and biocompatibility evaluation, *J. Biomed. Mater. Res. A* 102, 1548–1557.
- [11] Kubiak K., Kalinowska H., Peplińska M., Bielecki S. (2009) Bacterial cellulose as a nanobiomaterial, *Post. Biol. Komórki* 25, 85–98.
- [12] Jayabalan R., Malbasa R.V., Loncar E.S., Vitas J.S., Sathishkumar M. (2014) A Review on Kombucha Tea-Microbiology, Composition, Fermentation, Beneficial Effects, Toxicity, and Tea Fungus, *Compr. Rev. Food Sci. F* 13, 538–550.
- [13] Bhattacharya S., Gachhui R., Sil P.C. (2013) Effect of Kombucha, a fermented black tea in attenuating oxidative stress mediated tissue damage in alloxan induced diabetic rats, *Food Chem. Toxicol.* 60, 328–340.
- [14] Malbasa R.V., Loncar E.S., Kolarov L.A. (2006) Influence of black tea concentrate on Kombucha fermentation, *Act. Period. Technolog.* 37, 137–143.

REAKTYWNE FORMY TLENU – WROGOWIE CZY SPRZYMIERZEŃCY KOMÓREK ROŚLINNYCH?*

ALEKSANDRA TESMAR, DARIUSZ WYRZYKOWSKI,
DAGMARA JACEWICZ, JOANNA PRANCZK,
LECH CHMURZYŃSKI

Wydział Chemii, Uniwersytet Gdański
ul. Wita Stwosza 63, 80-308 Gdańsk
e-mail: aleksandra.tesmar@phdstud.ug.edu.pl

Hasła do zapamiętania: reaktywne formy tlenu, RFT, ROS, dysmutaza ponadtlenkowa, peroksydaza glutationowa, katalaza, stres oksydacyjny

Wykaz skrótów:

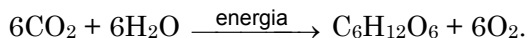
RFT (ROS)	– reaktywne formy tlenu (<i>reactive oxygen species</i>)
Q [•]	– wolny rodnik atakujący cząsteczkę RH
RH	– atakowana cząsteczka
Ar	– pierścień aromatyczny
SOD	– dysmutaza ponadtlenkowa
GPX	– peroksydaza glutationowa
APX	– peroksydaza askorbinianowa
CAT	– katalaza,
PCD	– programowana śmierć komórki (<i>programmed cell death</i>)
HR	– reakcja nadwrażliwości (<i>hypersensitive reaction</i>)

1. Wstęp

Komórki roślinne to podstawowe jednostki budulcowe roślin. Spełniają one również wiele innych funkcji. Do najważniejszych z nich zalicza się pobieranie substancji odżywczych, które zamieniane są

* Praca wspierana finansowo przez Narodowe Centrum Nauki w ramach dotacji grant UMO-2012/07/B/ST5/00753.

w przemianach biologiczno-chemicznych na energię (metabolizm). Inną funkcją komórek roślinnych jest wytworzenie specjalnych organelli (chloroplastów) zdolnych do przeprowadzania fotosyntezy oksygeniczej:

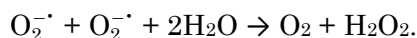


Obecnie uważa się, że proces ten przyczynił się do zmiany składu atmosfery, co w konsekwencji spowodowało ewolucję życia na Ziemi. Dzięki obecności tlenu mogły rozwinąć się nowe organizmy – w tym człowiek. Z drugiej jednak strony tlen cząsteczkowy jest utleniaczem, a w wyniku reakcji z innymi związkami redukuje się, pobierając od nich elektrony.

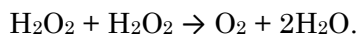
Badania przeprowadzone na przełomie ostatnich dziesięcioleci wskazują jednoznacznie, że reaktywne formy tlenu uważane są za jedną z przyczyn chorób neurodegeneracyjnych oraz nowotworowych. Ponadto, RFT powodują utlenianie kwasów tłuszczowych, steroidów. Są one również odpowiedzialne za: uwalnianie żelaza z białek, uszkodzenia błon komórkowych, zmiany strukturalne i funkcjonalne białek enzymatycznych i nieenzymatycznych, a także za zaburzenia w budowie DNA. Z drugiej strony RFT w stężeniu fizjologicznym wywierają pozytywne działanie w sygnalizacji komórkowej czy w generowaniu wzrostu roślin [1].

2. Reaktywne formy tlenu

W wyniku przyłączenia do nisko reaktywnego tlenu cząsteczkowego (O_2) jednego elektronu powstaje wysoce reaktywny anionorodnik nadadtlenkowy ($\text{O}_2^{\cdot -}$), który jest prekursorem wielu innych ROS, w szczególności powstającego w reakcji dysmutacji (dysproporcjonowania) nadtlenu wodoru H_2O_2 :

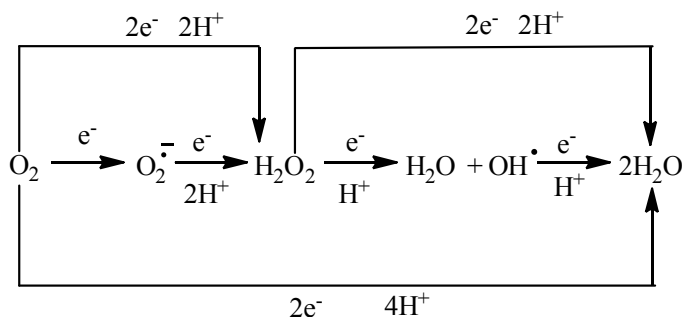


Powstający H_2O_2 może dalej ulegać dysproporcjonowaniu z wytworzeniem wody i tlenu:



Schemat reakcji prowadzących do powstania reaktywnych form tlenu z tlenu cząsteczkowego przedstawiono na rysunku 1 [2].

Wraz z dostarczeniem następnego elektronu nadtlenu wodoru rozpada się z wytworzeniem rodnika hydroksylowego OH^{\cdot} , który jest najbardziej reaktywnym utleniaczem spotykanym w organizmach żywych. Właściwość ta jest przyczyną reakcji opisywanego rodnika z większością substancji organizmu ludzkiego. Jest szczególnie niebezpieczny z powodu



Rys. 1. Reakcje pomiędzy poszczególnymi stadiami redukcji tlenu

dużej reaktywności z DNA i RNA, co może powodować mutacje [3]. Na ostatnim etapie rodnik ten ulega przekształceniu do cząsteczki wody.

W przemianie tlenu do cząsteczki wody z wytworzeniem pośrednich reaktywnych produktów powstaje tylko niewielka część wszystkich poznanych rodników. Istnieje wiele innych reaktywnych form powstających w różnych reakcjach chemicznych. Wybrane przykłady rodników oraz reaktywnych form tlenu i azotu przedstawiono w tabeli 1.

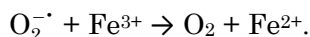
Tabela 1. Przykłady reaktywnych form tlenu i azotu

Nazwa związku	Wzór	Klasyfikacja
Anionorodnik ponadtlenkowy	$\text{O}_2^{\cdot-}$	RODNIKI NIEORGANICZNE
Rodnik wodoronadtlenkowy	NO_2^{\cdot}	
Nadtlenek wodoru	H_2O_2	
Rodnik hydroksylowy	$\cdot\text{OH}$	
Tlen singletowy	$^1\text{O}_2$	
Ozon	O_3	
Nadtlenek azotu	NO^{\cdot}	
Ditlenek azotu	NO_2^{\cdot}	
Rodniki alkoksyłowe	R-O^{\cdot}	RODNIKI ORGANICZNE R = szkielet węglowy
Rodniki nadtlenkowe	$\text{R}_1\text{-CH}(\text{OO}^{\cdot})\text{-R}_2$	
Epoksydy		

Znaczne ilości toksycznych rodników hydroksylowych $\text{OH}\cdot$ powstają w wyniku reakcji Fentona. Proces ten jest katalizowany jonami miedzi(II) lub żelaza(II) i przebiega następująco [4]:



W wyniku redukcji jonów żelaza(III) za pomocą anionorodnika ponadtlenkowego powstają jony żelaza(II), od ilości których zależy wydajność reakcji Fentona [5]:



Poprzez połączenie powyższych dwóch równań otrzymuje się równanie opisujące reakcję Habera–Weissa [6]:



2.1. Właściwości chemiczne reaktywnych form tlenu

Większość rodników powstaje poprzez reakcje z innymi rodnikami w reakcjach łańcuchowych. Wyróżniamy trzy typy takich reakcji. Są to reakcje: inicjacji, propagacji (prolongacji) oraz terminacji [2]. W reakcjach inicjacji z cząsteczek niebędących wolnymi rodnikami powstają wolne rodniki. Czynnikiem inicjującym reakcje łańcuchowe mogą być: pro-

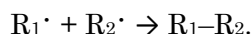
Tabela 2. Główne typy reakcji propagacji

Nazwa reakcji	Schemat	Opis
Przeniesienie atomu lub grupy atomów	$\text{Q}\cdot + \text{RH} \rightarrow \text{QH} + \text{R}\cdot$	Atak wolnego rodnika na atom wodoru drugiej cząsteczki.
Addycja	$\text{Q}\cdot + \text{R}-\text{CH}=\text{CH}-\text{R}' \rightarrow \text{R}-\text{CH}-\text{C}\cdot(\text{Q})-\text{R}'$	Przyłączenie wolnego rodnika do cząsteczki zawierającej podwójne wiązanie.
B-eliminacja	$\text{R}-\text{C}-\text{C}\cdot \rightarrow \text{R}\cdot + \text{C}=\text{C}$	Rozerwanie wiązania w położeniu β względem niesparowanego elektronu w stabilnej cząsteczce przekształconej w wolny rodnik.
Jednoelektrodowe reakcje redoks	$\text{R}\cdot + \text{Q} \rightarrow \text{Q}\cdot + \text{R}$	Przeniesienie elektronów w wyniku reakcji redoks.
Przegrupowania rodników alkilowych	$(\text{Ar})_3\text{C}-\text{CH}_2\cdot \rightarrow (\text{Ar})_2-\text{C}-\text{CH}_2-\text{Ar}$	Wewnątrzcząsteczkowe przegrupowania mniej stabilnych wolnych rodników do bardziej stabilnych. (Im wyższa rzędowość rodnika, tym większa stabilność.)

mieniowanie gamma (radioliza), promieniowanie elektromagnetyczne – światło (fotoliza), promieniowanie nadfioletowe – prowadzące do jonizacji cząsteczek tlenu i utworzenia ozonu oraz ultradźwięki (sonoliza).

W reakcjach propagacji sumaryczna liczba wolnych rodników nie ulega zmianie, zmieniają się natomiast cząsteczki będące nosicielami niesparowanych elektronów. W tabeli 2 przedstawiono pięć głównych typów propagacji.

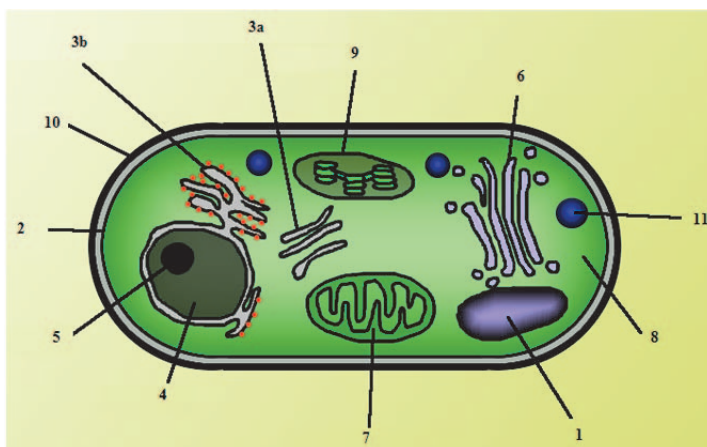
W procesie terminacji reagują z sobą dwa rodniki, co prowadzi do wygaszenia ich aktywności:



W wyniku takiej przemiany powstają nowe związki chemiczne, których aktywność biologiczna względem komórek może być szkodliwa.

3. Miejsca powstawania RFT w komórkach roślinnych

Istnieje wiele rodzajów komórek roślinnych różniących się między sobą pochodzeniem i spełnianymi funkcjami, jednak wszystkie charakteryzują się podobną budową. Zawierają określone struktury podkomórkowe, takie jak: jądro komórkowe, plastydy, mitochondria, retikulum plazmatyczne, aparat Golgiego, wakuole, cytoplazma, ściana komórkowa. Schemat budowy komórki roślinnej przedstawiono na rysunku 2.



Rys. 2. Schemat budowy komórki roślinnej [16]

1 – wodniczka, 2 – błona komórkowa, 3a – retikulum endoplazmatyczne gładkie, 3b – retikulum endoplazmatyczne szorstkie, 4 – jądro komórkowe, 5 – jąderko, 6 – aparat Golgiego, 7 – mitochondrium, 8 – cytozol, 9 – chloroplast, 10 – ściana komórkowa 11 – peroksysonomy

Najważniejszym miejscem powstawania reaktywnych form tlenu w komórce roślinnej są chloroplasty i peroksosomy [7–9]. W chloroplastach powstaje głównie anionorodnik ponadtlenkowy, który wytwarzany jest w reakcji Mehlera [2, 10, 11]. W peroksosomach wytwarzany jest przede wszystkim nadtlenek wodoru, którego źródłem są oksydazy flawinowe [9, 12].

Okolo 2% tlenu, biorącego udział w mitochondrialnym cyklu oddechowym, przekształca się w formy reaktywne [13, 14]. Produkcja RFT w mitochondriach u roślin zachodzi w mniejszym stopniu w porównaniu z komórkami zwierzęcymi [12]. Spowodowane jest to występowaniem alternatywnej oksydazy, która sprawuje kontrolę nad generowaniem nowych rodników tlenowych [9].

Znane są również przypadki powstawania reaktywnych form tlenu w błonach komórkowych, w reakcjach katalizowanych przez oksydazę NADPH nazywaną oksydazą fagocytów [15].

4. Mechanizmy obronne roślin przeciwko RFT

Reaktywne formy tlenu reagują ze składnikami komórek, modyfikując je i uszkadzając. W każdym organizmie zostaje wytworzony stan równowagi pomiędzy szybkością produkowania reaktywnych form tlenu a potencjałem przeciwutleniającym, który chroni komórki przed zniszczeniem [3]. Proces przesunięcia równowagi w stronę zwiększania ilości reaktywnych form tlenu, czyli niekontrolowanego wzrostu reaktywnych metabolitów nazywany jest stresem oksydacyjnym. W konsekwencji stresu oksydacyjnego w roślinach może powstać wiele chorób i stanów patologicznych. Na przełomie lat rośliny wytworzyły wiele mechanizmów obronnych, pozwalających chronić komórki przed działaniem RFT.

4.1. Enzymy chroniące komórki przez RFT

Do enzymów wykazujących działanie ochronne przeciwko RFT zalicza się m.in.: dysmutazy ponadtlenkowe (SOD), peroksydazę glutationową (GPX), peroksydazę askorbinianową (APX) oraz katalazę (CAT) [17].

Jednymi z najważniejszych enzymów pełniących rolę regulatorów RFT w komórkach są dysmutazy ponadtlenkowe. Ich działanie polega na katalizowaniu reakcji dysmutacji anionorodnika ponadtlenkowego do nadtlenu wodoru i tlenu [2, 18]. Enzymy z grupy SOD zalicza się do metaloprotein. Składają się z części białkowej (apoenzym) oraz katalitycznej grupy prostetycznej w formie jonu metalu, pełniącego funkcję centrum aktywnego. Ist-

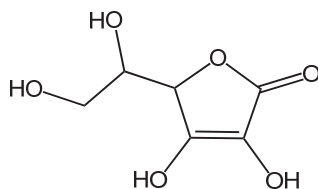
nieją trzy formy izomeryczne dysmutazy ponadtlenkowej. Różnią się one między sobą miejscem występowania w komórce oraz rodzajem jonu metalu zajmującym centrum aktywne. Zaliczamy do nich enzymy:

- cytoplazmatyczny, zawierający jony cynku i miedzi (CuZn – SOD, SOD – 1),
- mitochondrialny, zawierający jony manganu (Mn – SOD, SOD – 2),
- zewnątrzkomórkowy, z jonami cynku i miedzi (EC – SOD, SOD – 3).

Działanie pozostałych enzymów (GPX, APX, CAT) polega głównie na usuwaniu nadtlenu wodoru powstałego w reakcji dysproporcjonowania.

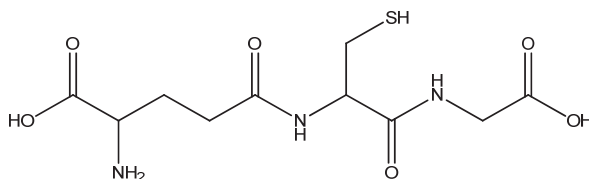
4.2. Nieenzymatyczne antyoksydanty

Nie tylko enzymy mogą chronić komórkę przed uszkodzeniami spowodowanymi przez RFT. Takie związki, jak kwas askorbinowy (rys. 3), glutation (rys. 4), karotenoidy, a także alkaloidy, witamina E (tokoferole) czy flawonoidy pełnią rolę aktywnych antyoksydantów.



Rys. 3. Wzór strukturalny kwasu askorbinowego

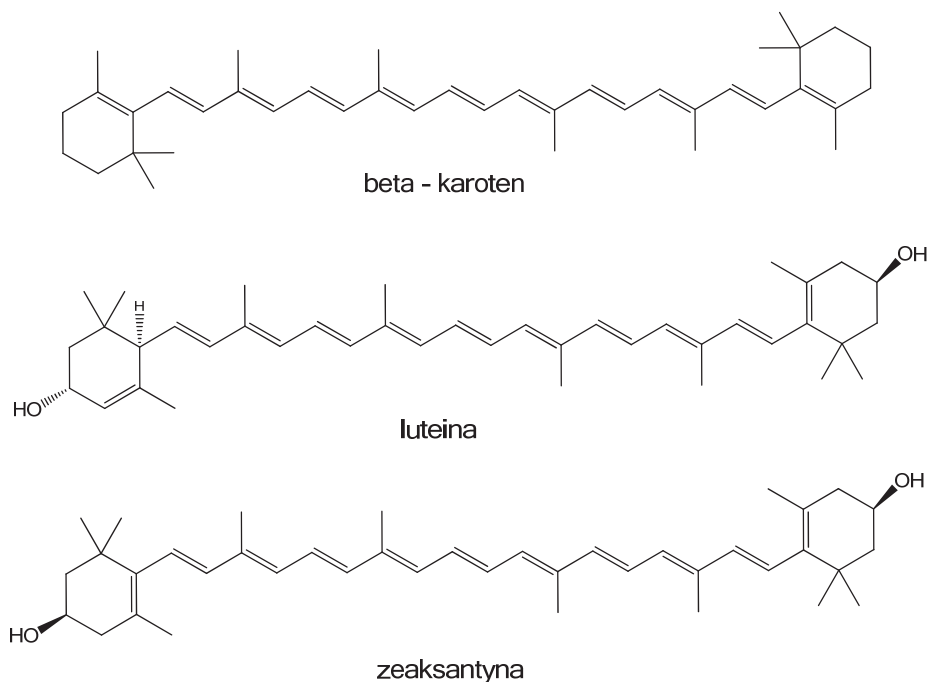
Glutation (γ -glutamyl-cysteinyl-glicyna) to tripeptyd o właściwościach przeciwutleniających, zbudowany z reszt aminokwasowych kwasu glutaminowego, cysteiny i glicyny. Swoje działanie antyoksydacyjne przejawia w odtwarzaniu grup tiolowych $-SH$ w białkach [19]. Największe stężenie glutationu wśród składników komórkowych znajduje się w cytoplazmie, mitochondriach i jądrze, a najniższe w siateczce śródplazmatycznej [20].



Rys. 4. Wzór strukturalny glutationu

Bardzo ważną rolę w komórkach pełni kwas askorbinowy, powszechnie nazywany witaminą C. Związek ten wykazuje właściwości hydrofilowe, dlatego jego działanie będzie największe w cytoplazmie komórki. Jest zaliczany do najmniej toksycznych, ale jednocześnie najsilniej działających przeciwutleniaczy. Bierze udział w dezaktywacji większości reaktywnych form tlenu. Związek ten ma również zdolność regeneracji rodnika α -tokoferolowego, powstającego w reakcji witaminy E z produktami autooksydacji tłuszczu.

Karotenoidy należą do związków lipofilowych. Jest to grupa barwników roślinnych odpowiedzialnych za żółtą, pomarańczową i czerwoną barwę wielu warzyw i owoców. Ich budowa oparta jest na połączeniu ośmiu jednostek izoprenowych. Wykazują aktywność prowitaminową oraz szeroką aktywność antyoksydacyjną. Wśród karotenoidów o charakterze prowitaminy A wyróżnia się β -karoten, α -karoten i β -kryptoksantynę. Przykładem natomiast karotenoidów niemających własności prowitaminy A są: likopen, luteina, zeaksantyna, astaksantyna, kantakstantyna, fukoksantyna [21]. Wzory strukturalne wybranych przedstawicieli karotenoidów przedstawiono na rysunku 5.



Rys. 5. Wzory strukturalne wybranych karotenoidów

5. Pozytywny wpływ RFT na rośliny

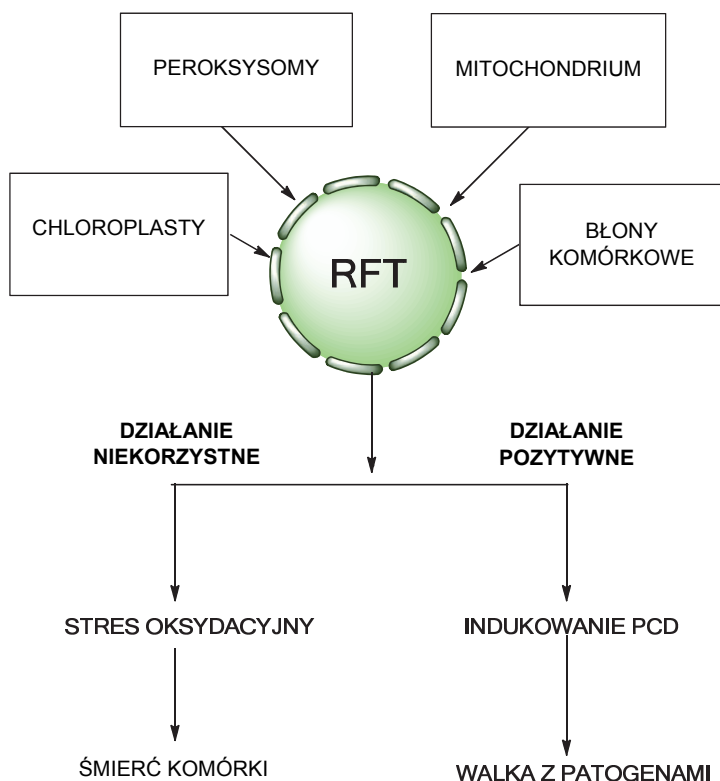
Jak wynika z badań prowadzonych w ostatnich latach, reaktywne formy tlenu mają również pozytywny wpływ na komórki. Odgrywają kluczową rolę w przekazywaniu sygnałów w komórce roślinnej. Proces ten pozwala na sterowanie tak ważnymi funkcjami, jak: programowanie śmierci komórki (PCD), odpowiedź na stres biotyczny i abiotyczny (udział RFT w odpowiedzi na atak patogenów), ruchy aparatów szparkowych, wzrost czy cykl komórkowy [17, 22, 23].

Duże znaczenie w walce z patogenami ma udział nadtlenu wodoru. Wysoki poziom H_2O_2 w miejscu infekcji jest toksyczny zarówno dla zdrowych tkanek, jak i komórek inwazyjnych. Pozwala to na zahamowanie rozprzestrzeniania się infekcji [24]. Znany jest pozytywny wpływ działania reaktywnych form tlenu na proces kiełkowania nasion. W zależności od stężenia RFT nasiona mogą pozostać w stanie spoczynku lub może rozpocząć się ich wzrost [25].

Programowana śmierć komórki (PCD) to zjawisko, które towarzyszy każdej komórce, zachodzące podczas jej niezaburzonego rozwoju. Reakcja nadwrażliwości HR jest specyficzną formą programowanej śmierci komórki. Wywołują ją czynniki chorobotwórcze, takie jak bakterie, wirusy i grzyby. Reakcja HR obejmuje tylko zainfekowane tkanki. Poprzez śmierć chorych i uszkodzonych komórek organizm zatrzymuje rozprzestrzenianie się patogenów. Jak wynika z doniesień literaturowych, wolne rodniki tlenowe mają swój udział w indukowaniu reakcji HR [8, 18].

6. Podsumowanie

Komórki roślinne wykształciły system polegający na kontroli produkcji i usuwaniu reaktywnych form tlenu. Zaburzenie tej równowagi (stres oksydacyjny) prowadzi do wielu groźnych chorób. Odkrycia ostatnich dziesięcioleci pokazały inną – pozytywną zależność między RFT a funkcjonowaniem komórek. Reaktywne formy tlenu generowane są głównie w chloroplastach, peroksosomach, mitochondrium oraz błonach komórkowych. Ich rola w komórkach roślinnych może przyjmować dwie drogi działania: pozytywną, opierającą się na walce z patogenami, jak również negatywną, prowadzącą do śmierci komórki (rys. 6). Wiedza na temat RFT, jak również ich pozytywnego i negatywnego wpływu na komórki roślinne, jest ciągle w toku badań i stanowi szeroki pole do dyskusji dla chemików i biologów.



Rys. 6. Wpływ reaktywnych form tlenu na komórki roślinne

Literatura

- [1] Szymanska R., Strzalka K. (2010) Reaktywne formy tlenu w roślinach – powstawanie, dezaktywacja i rola w przekazywaniu sygnału, *Post Bioch* 2(56), 182–190.
- [2] Bartosz G. (2009) Druga twarz tlenu – Wolne rodniki w przyrodzie, Wyd. Nauk. PWN, Warszawa.
- [3] Grajek W. (2007) Przeciwuutleniacze w żywności, WNT, Warszawa.
- [4] Kalisz O., Wolski T., Gerkowicz M., Smorawski M. (2007) Reaktywne formy tlenu [RTF] oraz ich rola w patogenezie niektórych chorób, *Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska. Sectio DD: Medicina Veterinaria* 1(62), 87–99.
- [5] Puzanowska-Tarasiewicz H., Starczewska B., Kuźmicka L. (2008) Reaktywne formy tlenu, *Bromat. Chem. Toksykol.* 41(4), 1007–1015.
- [6] Kehrer J.P. (2000) The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity, *Toxicology* 149(1), 43–50.
- [7] Nowicka B., Kruk J. (2013) Reaktywne formy tlenu w roślinach – więcej niż trucizna, *Kosmos* 4(62), 583–596.

- [8] Van Breusegem F., Vranová E., Da J.F., Inzé D. (2001) The role of active oxygen species in plant signal transduction, *Plant Sci.* 161(3), 405–414.
- [9] Malecka A., Tomaszewska B. (2005) Reaktywne formy tlenu w komórkach roślinnych i enzymatyczne systemy obronne, *Post. Biol. Kom.* 2(32), 311–325.
- [10] Polle A. (2001) Dissecting the superoxide dismutase – ascorbate – glutathione – pathway in chloroplasts by metabolic modeling. Computer simulations as a step towards flux analysis, *Plant Physiol.* 126(1), 445–462.
- [11] Lindsey A.R. (1998) Transgenic plant research, *Harwood Academic Publishers* 241–262.
- [12] Foyer C.H., Noctor G. (2003) Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria, *Physiol Plantarum* 119(3), 355–364.
- [13] Braidot E., Petrusa E., Vianello A., Macri F. (1999) Hydrogen peroxide generation by higher plant mitochondria oxidizing complex I or complex II substrates, *FEBS lett.* 451(3), 347–350.
- [14] Becana M., Dalton D.A., Moran J.F., Iturbe-Ormaetxe I., Matamoros M.A., Rubio M. (2000) Reactive oxygen species and antioxidants in legume nodules, *Physiol Plantarum* 109(4), 372–381.
- [15] Hippeli S., Heiser I., Elstner E.F. (1999) Activated oxygen and free oxygen radicals in pathology: New insights and analogies between animals and plants, *Plant Physiol. Bioch.* 37(3), 167–178.
- [16] <<http://www.scholaris.pl/resources/run/id/58121>>, [dostęp: 07.10.2015].
- [17] Ahmad P., Sarwat M., Sharma S. (2008) Reactive oxygen species, antioxidants and signaling in plants, *J. Plant Biol.* 51(3), 167–173.
- [18] Kozłowska M., Konieczny G. (2003) *Biologia odporności roślin na patogeny i szkodniki*, Wyd. Akademii Rolniczej im. Augusta Cieszkowskiego, Poznań.
- [19] Hassa R., Mrzigod J., Nowakowski J. (2004) *Podręczny słownik chemiczny*, Videograf II, Katowice.
- [20] Anderson M.E., Powrie F., Puri R.N., Meister A. (1985) Glutathione monoethyl ester: preparation, uptake by tissues, and conversion to glutathione, *Arch Biochem Biophys* 239(2), 538–548.
- [21] Guz J., Dziaman T., Szpila A. (2007) Czy witaminy antyoksydacyjne mają wpływ na proces karcynogenezy, *Postep Hig. Med. Dośw.* 61, 185–198.
- [22] Foyer C.H., Noctor G. (2005) Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses, *Plant Cell* 17(7), 1866–1875.
- [23] Bailey-Serres J., Mittler R. (2006) The roles of reactive oxygen species in plant cells, *Plant Physiol* 141(2), 311–311.
- [24] Levine A., Pennell R.I., Alvarez M.E., Palmer R., Lamb C. (1996) Calcium-mediated apoptosis in a plant hypersensitive disease resistance response, *Curr Biol.* 6(4), 427–437.
- [25] Krasuska U., Gniazdowska A., Bogatek R. (2011) Rola ROS w fizjologii nasion, *Kosmos* 1(60), 113–128.

OCHRONA KOMÓREK ROŚLINNYCH – ANTYOKSYDANTY W ROLI GŁÓWNEJ*

JOANNA PRANCZK, DAGMARA JACEWICZ,
DARIUSZ WYRZYKOWSKI, ALEKSANDRA TESMAR,
LECH CHMURZYŃSKI

Wydział Chemii, Uniwersytet Gdański
ul. Wita Stwosza 63, 80-308 Gdańsk
e-mail: joanna.pranczk@phdstud.ug.edu.pl

Hasła do zapamiętania: antyoksydanty, reaktywne formy tlenu, komórki roślinne, właściwości cytoprotekcyjne

Wykaz skrótów:

RFT	– reaktywne formy tlenu
NBT	– błękit nitrotetrazoliowy
BHA	– butylohydroksyanizol
BHT	– butylohydroksytoluen
TBHQ	– butylohydrochinon
MnTMPyP	– porfiryna tetrakis(1-metylo-4-pirydył) manganu(III)
MnTBAP	– chlorek porfiryryny tetrakis(4-benzoesowy) manganu(III)
SOD-1	– dysmutaza cytoplazmatyczna
SOD-2	– dysmutaza mitochondrialna
SOD-3 / EC SOD	– dysmutaza zewnątrzkomórkowa

1. Wstęp

Reaktywne formy tlenu (RFT) występujące w przyrodzie to przede wszystkim anionorodnik ponadtlenkowy, rodnik ponadtlenkowy (rodnik wodoronadtlenkowy), tlen singletowy oraz nadtlenek wodoru [1, 2].

* Projekt sfinansowany ze środków Narodowego Centrum Nauki, przyznanych na podstawie decyzji numer DEC-2012/07/B/ST5/00753.

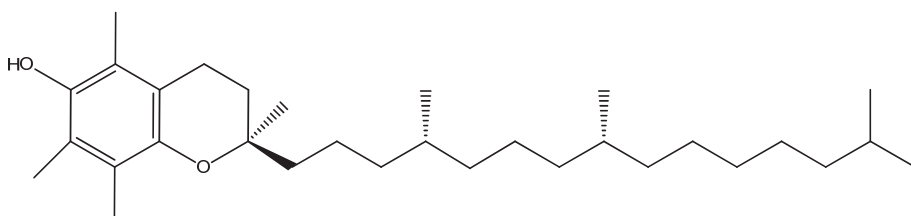
RFT występują także w organizmach żywych, np. w komórkach roślinnych. Pełnią liczne funkcje metaboliczne, występując jako substraty i produkty wielu szlaków metabolicznych, np. szlak łańcucha oddechowego [3]. RFT uczestniczą w bardzo ważnych dla komórek procesach, takich jak wzrost komórki, proliferacja czy różnicowanie komórki. Zaburzenie mechanizmów szlaków metabolicznych przez różne czynniki chorobotwórcze lub czynniki zewnętrzne powoduje nagły wzrost stężenia RFT w komórkach [4]. Kiedy stężenie RFT w organizmie jest wyższe od stężenia fizjologicznego, wtedy obserwuje się tzw. stres oksydacyjny [5, 6]. Długotrwałe występowanie stresu oksydacyjnego ma bardzo negatywne skutki dla komórek żywych. Doprowadzić może nawet do apoptozy i nekrozy komórek. W organizmie stres oksydacyjny jest zwalczany naturalnie przez systemy antyoksydacyjne, np. systemy enzymatyczne złożone z dysmutaz i kinaz [7–10]. Wysokie stężenie RFT niszczy każdy rodzaj białek. RFT powodują mutacje oraz indukują procesy cytotoksyczne [11, 12]. Często zdarza się tak, że efekt działania RFT występuje w miejscu bardzo odległym od miejsca występowania w komórce. Takie zjawisko jest możliwe, ponieważ centrum rodnikowe zostaje przeniesione w obrębie cząsteczki, wykorzystując aminokwasy takie, jak tryptofan, histydyna lub tyrozyna. Do przeniesienia RFT wykorzystywane są też aminokwasy zawierające atom siarki, np. cysteina lub metionina [13–15]. Wolne rodniki zakłócają wzrost tkanki, powodując zmiany w funkcjonowaniu i metabolizmie komórek. Stres oksydacyjny, oprócz niszczącego wpływu na organizm człowieka, ma negatywne znaczenie także dla roślin: stymuluje opadanie liści, hamuje rozwój chloroplastów, ogranicza wzrost korzeni, zmniejsza żywotność nasion i zwiększa częstość występowania nieprawidłowego wzrostu.

Rośliny odgrywają w życiu człowieka ogromną rolę nie tylko jako pożywienie, ale także są wykorzystywane do produkcji leków i kosmetyków. Ochrona komórek roślinnych jest bardzo ważna, dlatego współcześnie ze względu na zwiększone występowanie różnych czynników środowiskowych, związanych z zanieczyszczeniami środowiska, i czynników chorobotwórczych poszukuje się nowych substancji o właściwościach antyoksydacyjnych, antyapoptycznych oraz antynekrotycznych.

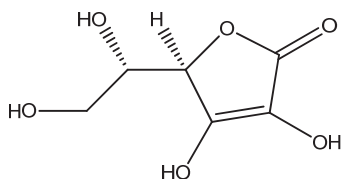
2. Antyoksydanty

Mianem antyoksydantów określa się substancje przyczyniające się do obniżenia stężenia wolnych rodników, w tym RFT. Przeciwutlenia-cze dzielą się na przeciwutleniacze enzymatyczne (dysmutaza ponadtl-

kowa, peroksydaza glutationowa), nieenzymatyczne (witamina A, E i C, glutation, ubiquinon i karotenoidy, ksantofile) oraz środki syntetyczne (syntetyzowane przez chemików, np. butylowany hydroksytoluen), w tym mimetyki dysmutazy ponadtlenkowej. Antyoksydantami o największej zdolności do usuwania RFT są witamina E, której najbardziej aktywną formą spośród wielu odmian jest α -tokoferol (rys. 1), witamina C (rys. 2), flawonoidy, karotenoidy oraz związki fenolowe [16]. Naturalnie występujące przeciwutleniacze pochodzące z owoców i warzyw odgrywają ważną rolę w profilaktyce wielu chorób, a także podczas samego procesu leczenia [17]. Związki chemiczne pochodzenia roślinnego wykazują dużą zdolność do usuwania RFT. Organizm ludzki jest wspomagany przez bezpośrednie dostarczanie antyoksydantów w postaci pożywienia. Jest to ważny element zróżnicowanej diety [18].



Rys. 1. Wzór strukturalny α -tokoferolu



Rys. 2. Wzór strukturalny witaminy C

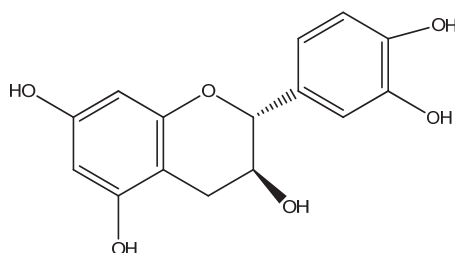
Usuwanie nadmiaru RFT jest bardzo istotne, ponieważ RFT silnie oddziałują z fosfatazami tyrozynowymi (PTPs) przez reakcję z elementami cysteiny, co powoduje odwracalną inaktywację. W ten sposób wpływają na regulację komórkowych procesów utleniania i redukcji [19]. W przypadku osłabienia organizmu, spowodowanego np. chorobą, aktywność enzymów przeciwutleniających jest znacznie niższa niż w przypadku zdrowego organizmu. Niska aktywność katalazy i dysmutazy ponadtlenkowej DNA jest bardzo niekorzystna dla komórek. Jednak nadekspresja

S-transferazy glutationowej, uczestniczącej w procesach detoksykacji, umożliwia przeżycie komórek, stanowiąc mechanizm obronny [20]. W wyniku stresu oksydacyjnego w komórkach nowotworowych może zachodzić aktywacja onkogenów lub oporność na leki.

2.1. Antyoksydanty nieenzymatyczne

Kwas askorbinowy, znany jako witamina C, jest jednym z najbardziej znanych przeciwutleniaczy. Jest związkiem rozpuszczalnym w wodzie i znajduje się w wielu owocach i warzywach, np. w takich cytrusach, jak grejpfruty, cytryny, pomarańcze; ponadto bogata w witaminę C jest także czerwona papryka, czarna porzeczka, dzika róża, a nawet natka pietruszki [21–24]. Kwas askorbinowy wykazuje silne właściwości redukujące. W wypadku niektórych enzymów występujących w organizmach żywych właściwości redukcyjne kwasu askorbinowego pozwalają utrzymać jony metali w postaci zredukowanej, np. kation żelaza(II). Ma to istotne znaczenie dla prawidłowego funkcjonowania enzymów. Witaminę C stosuje się często jako substancję wzorcową w badaniach właściwości antyoksydacyjnych różnych substancji. Witamina C pełni rolę substancji odniesienia m.in. w metodzie redukcji błękitu nitrotetrazoliowego (NBT) [25]. Kolejną grupą przeciwutleniaczy nieenzymatycznych są karotenoidy. Karotenoidy to grupa barwnych związków, które mają pochodzenie roślinne, np. znajdują się one w marchwi. Należą do prekursorów witaminy A. Zaliczane są też do substancji stanowiących główne źródło witaminy A. Bardzo dobrze rozpuszczają się w tłuszczach, natomiast są praktycznie nierozpuszczalne w wodzie. Do głównych ról witaminy A można zaliczyć wspomaganie stabilności błon komórkowych, przeciwdziałanie fotooksydacji w komórce, udział w procesie fotosyntezy [26, 27].

Inną grupą związków zaliczanych do przeciwutleniaczy są związki fenolowe. Fenole to związki, które mają w swojej strukturze grupę hydroksylową bezpośrednio związaną z pierścieniem aromatycznym. Tego typu związki chemiczne znane są ze swoich właściwości antyoksydacyjnych, przeciwnowotworowych, hipotensyjnych, a także przeciwzapalnych. Do związków fenolowych należą garbniki, flawonoidy oraz fenolokwasy. Do bardzo silnych antyoksydantów należy katechina (rys. 3) oraz kwercetyna [28]. Katechiny biorą udział w pochłanianiu promieniowania UV. Katechina i kwercetyna mają właściwości chelatujące jony metali, a także spowalniania procesów starzenia się komórki.



Rys. 3. Wzór strukturalny katechiny

Kolejną grupą antyoksydantów nieenzymatycznych są przeciwutleniacze syntetyczne. Do tej grupy należą butylohydroksyanizol (BHA), butylohydroksytoluen (BHT) i butylohydrochinon (TBHQ). Są szeroko stosowane jako antyutleniacze do konserwowania i stabilizacji żywności. Do syntetycznych antyoksydantów ponadto zalicza się związki kompleksowe porfiryna tetrakis(1-metylo-4-pirydyl) manganu(III) (MnTMPyP) i chlorek porfiryny tetrakis(4-benzoesowy) manganu(III) (MnTBAP) [29]. Wymienione związki zmiatają w głównej mierze anionorodnik ponadtlenkowy oraz niektóre inne reaktywne formy tlenu i azotu.

2.2. Antyoksydanty enzymatyczne

Do enzymatycznych przeciwutleniaczy należą katalazy, peroksydazy oraz dysmutazy ponadtlenkowe. Katalazy indukują rozkład nadtlenu wodoru na tlen i wodę, przez co obniżają stężenie nadtlenu wodoru w komórkach. Peroksydaza askorbinowa i glutationowa wspomaga unieczynnianie wolnych rodników. Peroksydaza rozkłada nadtlenek wodoru oraz rodniki organiczne, a także wraz z witaminą E bierze udział w zapobieganiu peroksydacji lipidów. Dysmutazy ponadtlenkowe natomiast stanowią grupę enzymów unieczyniających przede wszystkim anionorodnik ponadtlenkowy.

Dysmutaza cytoplazmatyczna (SOD-1) o masie cząsteczkowej równej 32 kDa jest jednym z rodzajów dysmutaz ponadtlenkowych, która w strukturze chemicznej zawiera kationy cynku(II) i miedzi(II) [30]. SOD-1 ma strukturę homodimeryczną. Stabilizacja trzeciorzędowej struktury białka w SOD-1 jest możliwa dzięki obecności kationu cynku(II). Z kolei kation miedzi(II) umożliwia SOD-1 pełnienie funkcji katalitycznych. W reakcjach utlenienia i redukcji kation cynku(II) nie bierze udziału w reakcji, jedynie kation miedzi(II) uczestniczy czynnie w reakcjach redoks SOD-1.

SOD-1 jest obecna w komórkach żywych w międzybłonowej przestrzeni mitochondrialnej, jądrze komórkowym oraz w cytoplazmie. SOD-1 wykazuje wysoką wrażliwość na jony cyjankowe.

Kolejną dysmutazą jest dysmutaza mitochondrialna – SOD-2 o masie cząsteczkowej równej 96 kDa. W strukturze chemicznej, w centrum aktywnym dysmutazy mitochondrialnej występuje kation manganu(II). Centralnie występujący kation manganu(II) odpowiada za właściwości katalityczne SOD-2, a ponadto pełni rolę stabilizującą strukturę trzeciorzędową SOD-2. Dysmutaza mitochondrialna nie jest czuła na jony cyjankowe, tak jak to ma miejsce w przypadku dysmutazy ponadtlenkowej cytoplazmatycznej. W SOD-2 ma miejsce tzw. sekwencja sygnałowa. Jej zadaniem jest uruchomienie transportu mitochondrialnego [31].

Trzecim typem dysmutazy ponadtlenkowej jest dysmutaza zewnątrzkomórkowa SOD-3 o masie cząsteczkowej 135 kDa. SOD-3 jest wydzielana poza komórkę. Najwyższe stężenie SOD-3 znajduje się na powierzchni komórek. Kationy miedzi(II) i cynku(II) stanowiące centrum aktywne SOD-3 są umieszczane w enzymie dopiero podczas transportowania EC SOD poza komórkę. SOD-3 tworzy struktury dimerowe, ale niewykluczone jest tworzenie przez SOD-3 struktur multimerowych. Spośród wszystkich dysmutaz SOD-3 ma największe zdolności przeciwutleniające [32].

3. Metody badań nad środkami ochrony roślin

Analiza składników substancji stosowanych do ochrony komórek roślinnych jest wykonywana za pomocą różnych metod, tj.:

- spektrometrii w bliskiej podczerwieni NIR,
- chromatografii w układzie gaz–ciecz sprzężonej ze spektrometrią masową (GC-MS),
- chromatografii w układzie ciecz–ciecz – chromatografia cieczowa (HPLC, RR-HPLC, LC/MS),
- metod klasycznych,
- chromatografii w układzie gaz–ciecz – chromatografia gazowa (GC),
- chromatografii planarnej – chromatografia cienkowarstwowa (TLC i HPTLC) [33].

Wprowadzanie na rynek nowych substancji ochrony komórek roślinnych, a nawet zmiana rozpuszczalnika czy zmiana substancji powierzchniowo-czynnej w środku ochronnym jest związana z koniecznością przeprowadzenia licznych analiz jakościowych oraz testów identyfikacyjnych. Podczas wykonywania testów w laboratorium stosuje się tzw. materiały odniesienia, a są nimi głównie certyfikowane wzorce analityczne sub-

stancji czynnych środków ochrony roślin. Do badań *in vitro* na materiale roślinnym zaleca się prowadzenie tzw. uprawy na szkle – metoda kultury *in vitro* [34–36]. Ten typ hodowli pozwala otrzymać materiał biologiczny w warunkach sterylnych. Główną zaletą prowadzenia takich hodowli jest uzyskanie zdolności komórek roślinnych do nieograniczonych możliwości dzielenia się tzw. efektu totipotencji [37]. W tym celu należy stosować specjalne odżywki roślinne bogate w substancje przyspieszające wzrost komórek. Do takich substancji należy mleczko kokosowe oraz mleczko kukurydziane. Komórki wykazujące zdolności do totipotencji nazywane są komórkami kompetentnymi. Aby uzyskać efekt totipotencji, bardzo ważne jest odpowiednie dobranie rodzaju substancji wzrostowych oraz dopasowanie ich w określonym stosunku do danego rodzaju komórek roślinnych.

RFT w wysokich stężeniach mają negatywny wpływ na komórki roślinne. Powodują zakłócenie prawidłowego działania organelli komórkowych. Są przede wszystkim przyczyną uszkodzeń DNA komórki roślinnej w bardzo szerokim zakresie działania. Nadmiar RFT ulega licznym reakcjom w komórce roślinnej, powodując m.in. powstawanie hydroksynadtlenków lipidów [38, 39]. Istotnym efektem utrzymywania się stresu oksydacyjnego w komórkach roślinnych jest zmiana przepuszczalności błony mitochondrialnej, a co za tym idzie – obniżenie potencjału błonowego. RFT ponadto powodują programowanie śmierci komórki roślinnej.

4. Podsumowanie

RFT występują naturalnie w komórkach żywych. Jednakże nagły wzrost ich stężenia w komórce uszkadza błonę komórkową oraz może prowadzić do apoptozy i nekrozy komórki. Ze względu na zmiany środowiskowe zachodzące współcześnie organizmy żywe są narażone na występowanie stresu oksydacyjnego. Dlatego antyoksydanty odgrywają bardzo ważną rolę dla organizmów żywych, np. komórek roślinnych. Przeciwutleniacze obniżają stężenie RFT. Stres oksydacyjny ma wpływ na wiele szlaków metabolicznych zachodzących w komórkach roślinnych, m.in. na wzrost komórki i jej różnicowanie. RFT wpływają na powstawanie mutacji w DNA. Dlatego działanie antyoksydantów jest nieocenione. Rośliny to bardzo ważny dla człowieka element przyrody, dlatego ulepszanie sposobów ich ochrony jest współcześnie często podejmowanym tematem przez wiele grup badawczych.

Literatura

- [1] Zelko I.N., Mariani T.J., Folz R.J. (2002) Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression, *Free Rad. Biol. Med.* 33, 337–349.
- [2] Chen S.R., Gee K.R. (2000) Redox-dependent trafficking of 2,3,4,5,6-pentafluorodihydro-tetramethylrosamine, a novel fluorogenic indicator of cellular oxidative activity, *Free Rad. Biol. Med.* 28, 1266–1278.
- [3] D'Autreaux B., Toledano M.B. (2007) ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 813–824.
- [4] Buetler T.M., Krauskopf A., Ruegg U.T. (2004) Role of superoxide as a signaling molecule, *News Physiol. Sci.* 19, 120–123.
- [5] Abrahamsson T., Brandt U., Marklund S.L., Sjoqvist P.O. (1992) Vascular bound recombinant extracellular superoxide dismutase type C protects against the detrimental effects of superoxide radicals on endothelium-dependent arterial relaxation, *Circ. Res.* 70, 264–271.
- [6] Johnson F., Giulivi C. (2005) Superoxide dismutases and their impact upon human health, *Mol. Aspects. Med.* 26, 340–352.
- [7] Fujimura M., Morita-Fujimura Y., Noshita N., Sugawara T., Kawase M., Chan P.H. (2000) The cytosolic antioxidant copper/zinc-superoxide dismutase prevents the early release of mitochondrial cytochrome c in ischemic brain after transient focal cerebral ischemia in mice, *J. Neurosci.* 20, 2817–2824.
- [8] Huang T.T., Carlson E.J., Kozy H.M., Mantha S., Goodman S.I., Ursell P.C., Epstein C.J. (2001) Genetic modification of prenatal lethality and dilated cardiomyopathy in Mn superoxide dismutase mutant mice, *Free Rad. Biol. Med.* 31, 1101–1110.
- [9] Elchuri S., Oberley T.D., Qi W., Eisenstein R.S., Jackson Roberts L., Van Remmen H., Epstein C.J., Huang T.T. (2005) CuZnSOD deficiency leads to persistent and widespread oxidative damage and hepatocarcinogenesis later in life, *Oncogene* 24, 367–380.
- [10] Wheeler M.D., Nakagami M., Bradford B.U., Uesugi T., Mason R.P., Connor H.D., Dikalova A., Kadiiska M., Thurman R.G. (2001) Overexpression of manganese superoxide dismutase prevents alcohol-induced liver injury in the rat, *J. Biol. Chem.* 276, 36664–36672.
- [11] Sheu S.S., Nauduri D., Anders M.W. (2006) Targeting antioxidants to mitochondria: a new therapeutic direction, *Biochim. Biophys. Acta* 1762, 256–265.
- [12] Czarna M., Jarmuszkievicz W. (2006) Rola mitochondriów w wytwarzaniu i usuwaniu reaktywnych form tlenu; związek z przesyłaniem sygnałów i programowana śmiercią komórki, *Post. Biochem.* 2, 145–156.
- [13] Kulbacka J., Saczko J., Chwiłkowska A. (2009) Stres oksydacyjny w procesach uszkodzenia komórek, *Pol. Merk. Lek.* 27, 44–47.
- [14] Foreman J., Demidchik V., Bothwell J.H.F., Mylona P., Miedema H., Torres M.A., Linstead P., Costa S., Brownlee C., Jones J.D.G., Davies J.M., Dolan L. (2003) Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth, *Nature* 422, 442–446.
- [15] Agati G., Azzarello E., Pollastri S., Tattini M. (2012) Flavonoids as antioxidants in plants: location and functional significance, *Plant Sci.* 196, 67–76.
- [16] Giorgio M., Trinei M., Migliaccio E., Pelicci P.G. (2007) Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals?, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 722–728.

- [17] D'Autreaux B., Toledano M.B. (2007) ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 813–824.
- [18] Rhee S.G. (2006) H₂O₂, a necessary evil for cell signaling, *Science* 312, 1882–1883.
- [19] Sun H., Gao J., Ferrington D.A., Biesiada H., Williams T.D., Squier T.C. (1999) Repair of oxidized calmodulin by methionine sulfide restores ability to activate the plasma membrane Ca-ATPase, *Biochemistry* 38, 105–112.
- [20] Townsend D.M., Tew K.D. (2003) The role of glutathione-S-transferase in anticancer drug resistance, *Oncogene* 22, 7369–7375.
- [21] Bendich A., Machlin L.J., Scandurra O., Burton G.W., Wayner D.D.M. (1986) The antioxidant role of vitamin C, *Adv. Free Rad. Biol. Med.* 2, 419–444.
- [22] Arrigoni O., De Tullio M.C. (2002) Ascorbic acid: much more than just an antioxidant, *Biochim. Biophys. Acta* 1569, 1–9.
- [23] Machlin L.J., Bendich A. (1987) Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients, *FASEB* 1, 441–445.
- [24] Zhang D., Hamauzu Y. (2004) Phenolics, ascorbic acid, carotenoids and antioxidant activity of broccoli and their changes during conventional and microwave cooking, *Food Chem.* 88, 503–509.
- [25] Pranczk J., Jacewicz D., Wyrzykowski D., Chmurzyński L. (2014) Analytical Methods for Determination of Reactive Oxygen Species, *Curr. Pharm. Anal.* 10, 293–304.
- [26] Zalega J., Szostak-Węgierek D. (2013) Żywnienie w profilaktyce nowotworów. Część I. Polifenole roślinne, karotenoidy, błonnik pokarmowy, *Probl. Hig. Epidemiol.* 94, 41–49.
- [27] Bagchi D., Garg A., Krohn R.L., Bagchi M., Tran M.X., Stohs S.J. (1997) Oxygen free radical scavenging abilities of vitamins C and E, and a grape seed proanthocyanidin extract in vitro, *Res. Commun. Mol. Path.* 95, 179–189.
- [28] Afanas' ev I.B., Dcrozshko A.I., Brodskii A.V., Kostyuk V.A., Potapovitch A.I. (1989) Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation, *Biochem. Pharmacol.* 38, 1763–1769.
- [29] Faulkner K.M., Liochev S.I., Fridovich I. (1994) Stable Mn(III) porphyrins mimic superoxide dismutase *in vitro* and substitute for it *in vivo*, *J. Biol. Chem.* 269, 23471–23476.
- [30] Vujaskovic Z., Batinic-Haberle I., Rabbani Z.N., Feng Q., Kang S.K., Spasojevic I., Samulski T.V., Fridovich I., Dewhirst M.W., Anscher M.S. (2002) A small molecular weight catalytic metalloporphyrin antioxidant with superoxide dismutase (SOD) mimetic properties protects lungs from radiation-induced injury, *Free Rad. Biol. Med.* 33, 857–863.
- [31] Van Raamsdonk J.M., Hekimi S. (2009) Deletion of the mitochondrial superoxide dismutase sod-2 extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*, *PLoS Genet.* 5, e1000361.
- [32] Zelko I.N., Mariansi T.J., Folz R.J. (2002). Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression, *Free Rad. Biol. Med.* 33, 337–349.
- [33] Tukey Jr H.B. (1970) The leaching of substances from plants, *Ann. Rev. Plant Physio.* 21, 305–324.
- [34] Djordjevic M.A., Bezos A., Susanti D., Marmuse L., Driguez H., Samain E., Vauzeilles B., Beau J.M., Kordbacheh F., Rolfe B.G., Schwörer R., Daines A.M., Gresshoff P.M., Parish C.R. (2014) Lipo-Chitin Oligosaccharides, Plant Symbiosis Signalling Molecules That Modulate Mammalian Angiogenesis In Vitro, *PLoS one* 9, e112635.

- [35] Wolf S., Höfte H. (2014) Growth control: a saga of cell walls, ROS, and peptide receptors, *Plant Cell* 26, 1848–1856.
- [36] Mobini S.H., Lulsdorf M., Warkentin T.D., Vandenberg A. (2014) Plant growth regulators improve in vitro flowering and rapid generation advancement in lentil and faba bean, *In Vitro Cell. Dev-Pl.* 51, 71–79.
- [37] Fuławka Ł., Donizy P., Hałoń A. (2014) Czynniki Yamanaki i rdzeniowe czynniki transkrypcyjne–molekularne ogniwa między embriogenezą i karcynogenezą. *Post. Hig. Med. Dośw.* 68, 715–721.
- [38] Siedow J.N., Moore A.L. (1993) A kinetic model for the regulation of electron transfer through the cyanide-resistant pathway in plant mitochondria, *Biochim. Biophys. Acta* 1142, 165–174.
- [39] Siedow J.N., Umbach A.L., Moore A.L. (1995) The active site of the cyanide-resistant oxidase from plant mitochondria contains a coupled binuclear iron center, *FEBS Lett.* 362, 10–14.

SYNTETYCZNE UTLENIACZE I PRZECIWUTLENIACZE W MODELU PEROKSYDACJI LIPIDÓW I BADANIACH USZKODZEŃ BŁON KOMÓRKOWYCH

AGATA ZAUSKIEWICZ-PAWLAK¹, JOLANTA KUBASIK²,
KAMILA SIEDLECKA-KROPLEWSKA¹, NATALIA MELKA³,
MICHAŁ WOŹNIAK⁴

¹ Katedra i Zakład Histologii, Gdański Uniwersytet Medyczny
ul. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk

² Zakład Mikroskopii Elektronowej, Gdański Uniwersytet Medyczny
ul. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk

³ Katedra Anatomii, Zakład Anatomii i Neurobiologii, Gdański Uniwersytet Medyczny
ul. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk

⁴ Katedra i Zakład Chemii Medycznej, Gdański Uniwersytet Medyczny
ul. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk

e-mail: agatapawlak@gumed.edu.pl; ksiedlecka@gumed.edu.pl;
melka@gumed.edu.pl; mwozniak@gumed.edu.pl

Hasła do zapamiętania: wodoronadtlenek *tert*-butylu, wodoronadtlenek kumenu, TEMPO, TEMPOL, stres oksydacyjny, peroksydacja białek, peroksydacja lipidów błonowych

Wykaz skrótów:

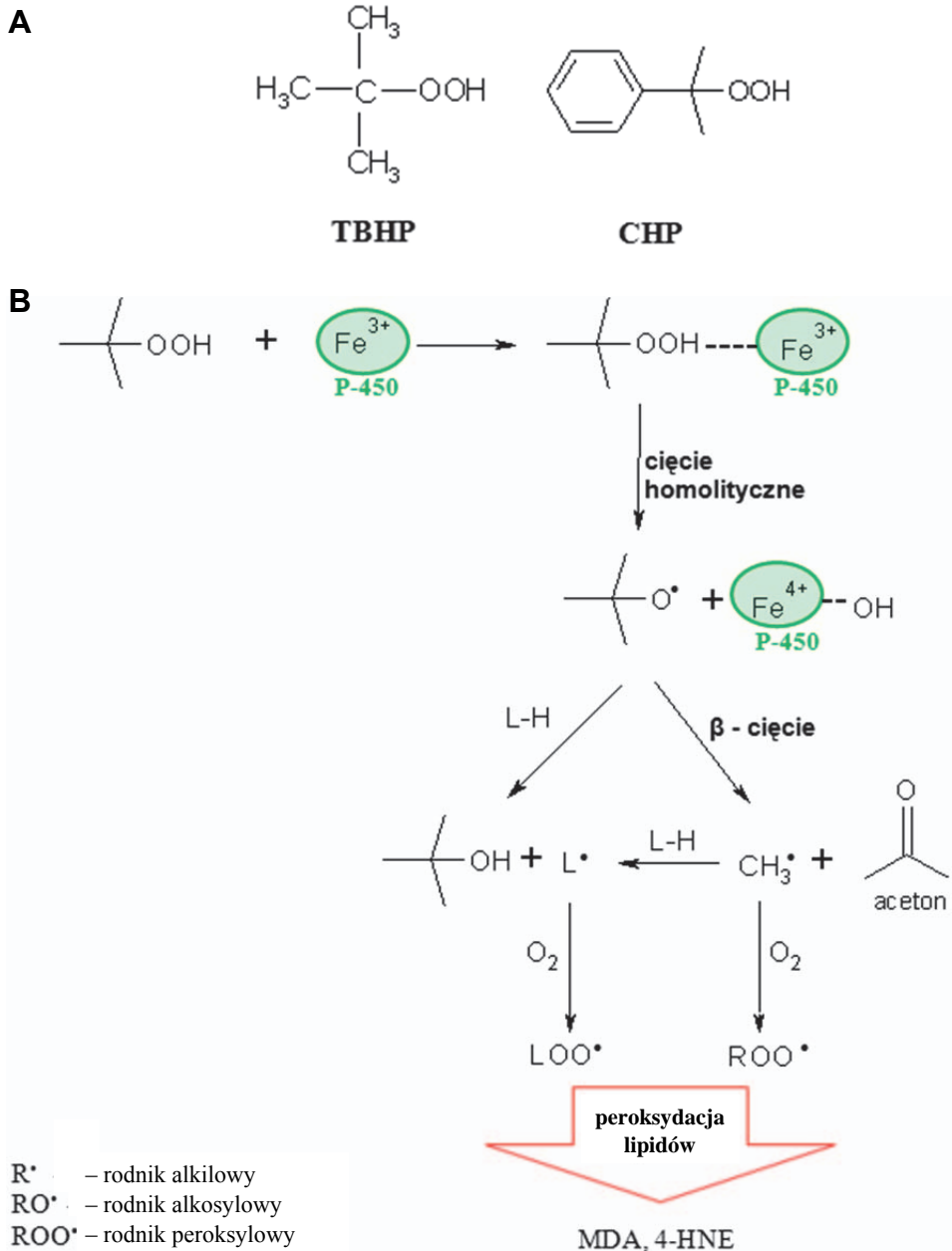
- CH₃ – rodnik metylowy
- CHP – wodoronadtlenek kumenu
- 4-HNE – 4-hydroksynonenal
- HSA – ludzka albumina osocza
- MDA – dialdehyd malonowy
- OH – rodnik hydroksylowy
- RFT – reaktywne formy tlenu
- RFA – reaktywne formy azotu
- RO• – rodnik alkoksylowy

- SH – grupy tiolowe
SOD – dysmutaza nadtlenkowa
TBHP – wodoronadtlenek *tert*-butylu
TEMPO – 2,2,6,6-tetrametylopiperydyno-1-tlenek
TEMPOL – 4-OH-TEMPO, 4-hydroksy-2,2,6,6-tetrametylopiperydyno-1-tlenek

1. Wstęp

1.1. Utleniacze: wodoronadtlenek *tert*-butylu i wodoronadtlenek kumenu

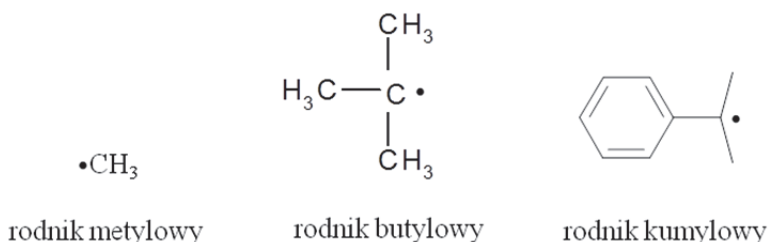
W organizmach żywych wodoronadtlenki towarzyszą przemianom metabolicznym tlenu oraz występują jako formy pośrednie w reakcjach enzymatycznych. Dotyczy to zarówno nadtlenku wodoru, jak i organicznych wodoronadtlenków, takich jak wodoronadtlenki *tert*-butylu (TBHP) i kumenu (CHP), które biorą udział w peroksydacji lipidów oraz powodują uszkodzenia błon komórkowych i białek. Z tego względu nadają się świetnie do odtworzenia modelu peroksydacji lipidów i badania uszkodzeń błon w komórkach. TBHP jest bardziej polarny, łatwiej przechodzi przez błony oraz ma większe powinowactwo do hydrofilowych części lipidów i białek. Aromatyczny CHP jest bardziej hydrofobowy, ma więc większe powinowactwo do lipidów. Organiczne wodoronadtlenki redukowane są przez enzym peroksydazę glutationu (GPx). Ponieważ nie reagują z katalazą, posłużyły do badania komórkowych szlaków metabolizmu wodoronadtlenków, w których katalaza nie bierze udziału [1]. Badano wpływ obu wspomnianych wodoronadtlenków na perfundowanej wątrobie szczura, izolowanych szczurzych hepatocytach, a także frakcji mitochondriów i mikrosomów [1]. Wykazali oni, że wątroba zdolna jest do usuwania organicznych wodoronadtlenków, jednocześnie zaobserwowali wzrost disulfidu glutationu (GSSG) w przestrzeni zewnątrzkomórkowej, świadczący o wzmożonej aktywności peroksydazy glutationu. Zaobserwowali również udział siateczki śródplazmatycznej w usuwaniu TBHP i CHP poprzez redukujące właściwości cytochromu P-450. Zostało to potwierdzone również w późniejszych pracach, tzn. że TBHP i CHP w hepatocytach metabolizowane są przy udziale enzymów cytochromu P-450 do wysoce reaktywnych cytotoksycznych rodników powodujących peroksydację lipidów i białek [2–5]. Zbadano, że w wyniku rozpadu homolitycznego wiązania O–O powstaje rodnik alkoksyłowy (RO•), który inicjuje proces peroksydacji lipidów w komórce poprzez oderwanie protonu od niena-



Rys. 1. (A) Struktura chemiczna wodoronadtlenku *tert*-butylu i wodoronadtlenku kumenu. (B) Metabolizm wodoronadtlenków w komórce przy udziale cytochromu P-450 na przykładzie TBHP. Według Weissa i Estabrooka; R = CH₃; (CH₃)₃C[•]; C₆H₅C[•](CH₃)₂

syconych kwasów tłuszczowych lub ulega β -cięciu do rodnika metylowego ($\cdot\text{CH}_3$) i acetonu bądź acetofenonu (rys. 1) [6, 7].

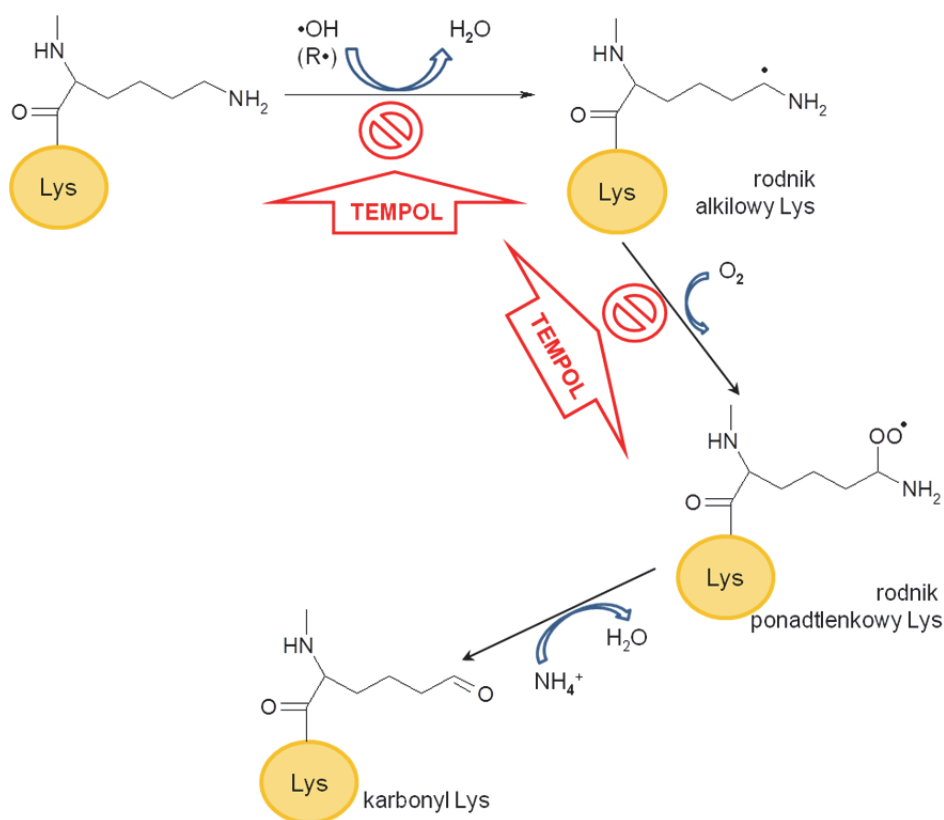
W izolowanych hepatocytach szczurzych traktowanych TBHP zaobserwowano intensywne pęczkowanie błony komórkowej oraz towarzyszący mu spadek ilości aktywności związanej z błoną [8, 9]. Ponadto zaobserwowano utratę równowagi wapniowej, gwałtowny wzrost cytozolowego stężenia wolnego wapnia oraz aktywację endonukleaz jako początek uszkodzeń cytotoxycznych [10]. Poza tym, TBHP prowadzi do uwolnienia kwasu arachidonowego z błonowych fosfolipidów i tworzenia malonyldialdehydu (MDA), a więc do peroksydacji lipidów i w konsekwencji do śmierci komórki [11]. Zaobserwowano również uszkodzenia mitochondriów, a ściślej załamanie mitochondrialnego potencjału błonowego i związaną z tym ucieczkę cytochromu c do cytoplazmy [12].



Rys. 2. Struktura chemiczna rodników alkilowych

TBHP zastosowany w modelu doświadczalnym wywoływał ostre zapalenie trzustki (OZT) u szczurów, związane z nekrozą komórek trzustkowych oraz wzrostem poziomu grup karbonylowych i spadkiem poziomu grup tiolowych (SH), co było odzwierciedleniem oksydacyjnych uszkodzeń białek [13, 14]. Prace nad utlenianiem białek prowadzili również Temple i współpracownicy, badając wpływ stresu oksydacyjnego na białka ludzkiej albuminy osocza (HSA) [15]. Wykazali oni, że utlenianie reszt lizyny katalizowane jonami metali było bardzo selektywne, gdyż tylko dwie z 59 reszt, tj. Lys-97 i Lys-186, uległy utlenieniu do semialdehydu 2-aminoadypinowego mającego grupę karbonylową [15]. W niniejszej pracy wybrano ludzką albuminę osocza oraz izolowane błony komórkowe do stworzenia modelu indukowanej wodoronadtlenkami TBHP i CHP peroksydacji białek i lipidów (rys. 3). Wybór HSA jako modelu oksydacyjnej modyfikacji białka podyktowany był tym, iż jest ona białkiem wykazującym oddziaływanie polarne (wiązaną jonów żelaza) i niepolarną (wiązaną kwasów tłuszczowych). Podobnie cytoskielet aktynowy w komórce, który z jednej strony kotwiczy w cytoplazmie, a z drugiej w błonie

komórkowej, jest strukturą o silnie polarnym charakterze. Z uwagi na silnie polarny charakter HSA w miejscu wiązania żelaza postawiono pytanie, jaka będzie efektywność niepolarnego TEMPO (2,2,6,6-tetrametylopiperydyno-1-tlenek) i polarnego TEMPOL (4-OH-TEMPO, 4-hydroksy-2,2,6,6-tetrametylopiperydyno-1-tlenek) w ochronie przed stresem oksydacyjnym. Uwzględniono zróżnicowane powinowactwo aminooksyli do polarnych domen białka ulegającego oksydacji.

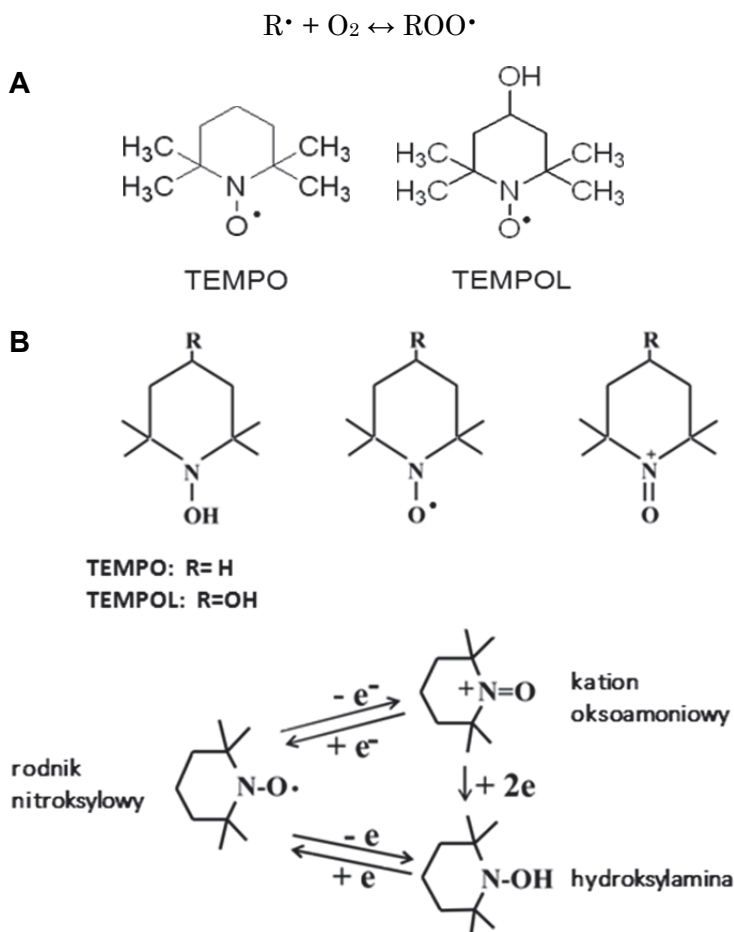


Rys. 3. Schemat reakcji utleniania reszt lizyny przez rodnik alkilowy ($\text{R}\cdot$) do emialdehydu 2-aminoadypinowego (z resztą karbonylową) oraz TEMPOL jako inhibitor reakcji

1.2. Przeciwutleniacze: TEMPO i TEMPOL

Przeciwutleniacz to każdy związek, który opóźnia, zapobiega lub usuwa uszkodzenia powstałe w procesie utleniania [16]. TEMPO i TEMPOL to drobnocząsteczkowe syntetyczne aminoksyle cykliczne, mimetyki SOD,

stabilne rodniki nitroksylowe o właściwościach zmiataczy wolnych rodników. Charakteryzują się dużą łatwością przenikania do wnętrza komórek przez błony ze względu na niewielką masę cząsteczkową. Wykorzystywane są powszechnie w EPR jako znaczniki spinowe w badaniach nad strukturą błon. Komórkowe reakcje redoks redukują rodnik nitroksylowy do hydroksylaminy lub utleniają do kationu oksoamoniowego. Ta dysproporcja powoduje utratę paramagnetycznych właściwości TEMPO i TEMPOL (rys. 4). Ponadto, nie reagują one z rodnikami tlenkowymi, a jedynie z rod-

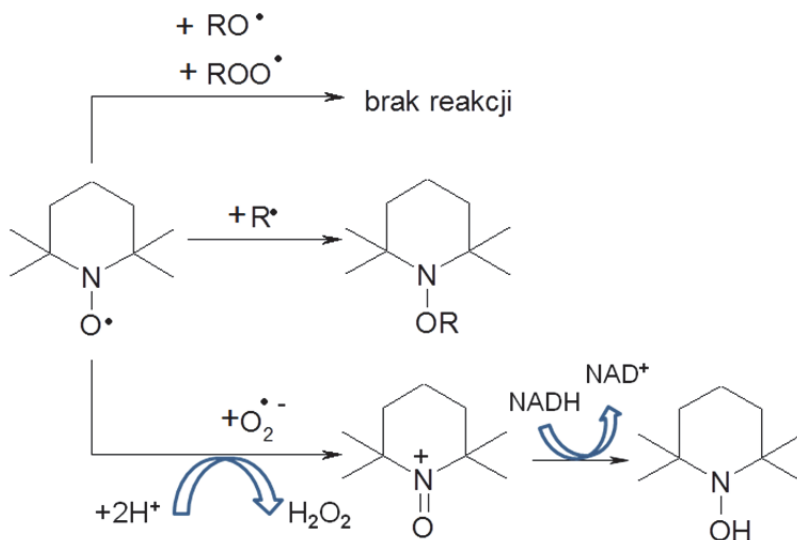


Rys. 4. Piperydynowe rodniki nitroksylowe TEMPO i TEMPOL. (A) Struktura chemiczna rodników nitroksylowych. (B) Podstawowa reakcja redoks wolnych rodników nitroksylowych [20]

Rodnik nitroksylowy utleniany jest do kationu oksoamoniowego (formy pośredniej) lub redukowany do hydroksylaminy w zależności od stanu redoks układu, w którym się znajduje (np. w komórce)

nikami alkilowymi, tj. węglowymi oraz anionorodnikiem ponadtlenkowym (rys. 5). Dzięki tym właściwościom są znakomitymi zmiataczami wolnych rodników w modelu oksydacyjnych uszkodzeń wywołanych wodoronadtlenkami; zwłaszcza jeśli weźmiemy pod uwagę ich zdolność do wiązania rodników alkilowych (butylowego i kumylowego), powstających jako produkt metabolizmu TBHP i CHP. Stałe szybkości reakcji z rodnikami nitroksylowymi wynoszą: dla rodnika metylowego $\cdot\text{CH}_3$ $10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$; butylowego $(\text{CH}_3)_3\text{C}\cdot$ $7,6 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$; kumylowego $\text{C}_6\text{H}_5(\text{CH}_3)_3\text{C}\cdot$ $1,2 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ [19, 20], natomiast dla anionorodnika ponadtlenkowego $\text{O}_2^{\cdot-}$ jest rzędu $10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ [21]. Tłumaczy to wybór wymienionych rodników nitroksylowych TEMPO i TEMPOL na przeciwutleniacze mające zapobiegać stresowi oksydacyjnemu generowanemu przez wodoronadtlenki w modelu doświadczalnym przyjętym w niniejszej, pracy. Ponieważ w warunkach tlenowych stężenie O_2 w tkankach jest znacznie niższe niż w płucach i krwi tętniczej, powstające rodniki alkilowe pozostają w równowadze z O_2 według poniższego schematu reakcji [16].

W obszernej pracy przeglądowej Wilcox [21] opisał i uszeregował ochronne działanie TEMPOL na komórki i tkanki różnego typu. Okazało się, że TEMPOL przeciwdziałał uszkodzeniom spowodowanym RFT i RFA w różnych typach komórek, tkanek i całych organizmach zwierzęcych; w różnych typach modeli doświadczalnych związanych ze stresem oksydacyjnym.



Rys. 5. Schemat właściwości rodnika nitroksylowego jako zmiatacza wolnych rodników, na przykładzie TEMPO. $\text{RO}\cdot$ =rodnik alkoksylový, $\text{ROO}\cdot$ =rodnik nadtlenkový, $\text{R}\cdot$ =rodnik alkilový, $\text{O}_2^{\cdot-}$ =anionorodnik ponadtlenkový

TEMPOL m.in. katalizował dysmutację $O_2^{\cdot-}$, metabolizował H_2O_2 w obecności hemoprotein i zapobiegał powstawaniu $\cdot OH$ w reakcji Fentona. Tym właściwościom towarzyszyły: ograniczenie peroksydacji lipidów, oksydacyjnych uszkodzeń białek (tworzenia grup karbonylowych), nitracji reszt tyrozynowych i uszkodzeń DNA oraz wzmożona bioaktywność tlenu azotu NO w ścianach naczyń i narządach wewnętrznych [22]. Badania na modelach zwierzęcych wykazały, że TEMPOL ograniczył lub zapobiegł uszkodzeniom spowodowanym reperfuzją po niedokrwieniu wielu narządów (nerek, serca, mózgu, układu trawiennego). Zachował również funkcjonalność mitochondriów i zapobiegł zmianom naczyniowym towarzyszącym nadciśnieniu tętniczemu [23]. TEMPOL wykazał także pozytywne działanie w chorobach metabolicznych dzięki ochronie funkcji mitochondriów i błon komórkowych oraz aktywności NO. W zwierzęcym modelu cukrzycy wydajnie chronił nerki i naczynia przed uszkodzeniami oraz korzystnie wpływał na wydzielanie insuliny i przyswajanie glukozy w insulinooporności [21]. W modelu cukrzycy u otyłych szczurów (będących na wysokotłuszczowej diecie) doustnie podawany TEMPOL obniżył poziom glukozy i insuliny w osoczu u tych zwierząt, jak również spowodował obniżenie ciśnienia krwi [24, 25]. TEMPOL był skuteczny w ochronie wątroby przed uszkodzeniami spowodowanymi alkoholem oraz w niealkoholowej stłuszczeniowej chorobie wątroby [26]. Ponadto, TEMPOL zapobiegł peroksydacji lipidów w hepatocytach szczurzych indukowanej-CHP oraz utracie integralności błony komórkowej, jak również zapobiegł apoptozie indukowanej TBHP w tymocytach izolowanych ze szczurów [2, 27]. Ponadto, zapobiegł OZT indukowanemu L-argininą lub TBHP u szczurów [28, 29]. Co więcej, TEMPOL przeciwdziałał tworzeniu megamitochondriów w hepatocytach szczurzych po indukcji stresu oksydacyjnego chloramfenikolem, etanolem lub hydrazyną [30, 31].

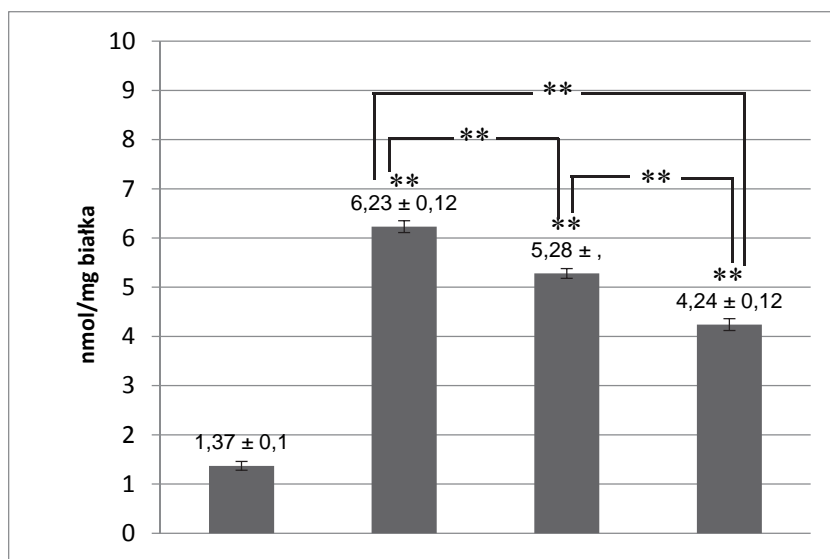
Obecnie TEMPOL jest stosowany u pacjentów poddawanych radioterapii w celu zapobiegania łysieniu wywołanym promieniowaniem. Chroni zdrowe komórki przed promieniowaniem, nie wpływa natomiast na wrażliwość (na promieniowanie) komórek nowotworowych. Ma to związek z niskim ciśnieniem parcjalnym tlenu i wysokim poziomem rodnika ponadtlenkowego $O_2^{\cdot-}$ w komórkach nowotworowych, przez co następuje redukcja TEMPOL do hydroksylaminy i utrata jego właściwości paramagnetycznych [21].

2. Oksydacyjna modyfikacja białek

Jednym ze skutków oddziaływań RFT z białkami jest utlenianie grup aminowych reszt aminokwasowych do grup karbonylowych. Oznaczenie zawartości grup karbonylowych w próbie pozwala ocenić stopień

oksydatywnej modyfikacji białek. Zbadano stopień utlenienia białek ludzkiej surowicy HSA podczas oksydacji katalizowanej jonami metali ($\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$) w obecności i przy braku ochronnego wpływu przeciwutleniaczy. Zastosowany model miał na celu poznanie stopnia oksydacyjnych uszkodzeń białek wchodzących w skład cytoszkieletu i błon komórkowych oraz ich inhibicji przez TEMPO i TEMPOL (rys. 6).

Wykazano, że FeCl_3 w obecności kwasu askorbinowego spowodował utlenienie białka HSA. Po 1 h inkubacji zanotowano wzrost poziomu grup karbonylowych. Osiągnął on wartość $6,23 \pm 0,12$ nmoli C=O/mg białka, przy czym w próbie kontrolnej wynosił $1,37 \pm 0,10$ nmoli C=O/mg białka. TEMPO i TEMPOL wykazały natomiast działanie ochronne. TEMPOL działał skuteczniej pod względem hamowania oksydacji albuminy w porównaniu z TEMPO (rys. 6).



Rys. 6. Oksydacja ludzkiej albuminy osocza po 1 h inkubacji z $100 \mu\text{M}$ FeCl_3 w obecności 25 mM kwasu askorbinowego oraz w obecności $10 \mu\text{M}$ TEMPO lub TEMPOL (** $p < 0,01$)

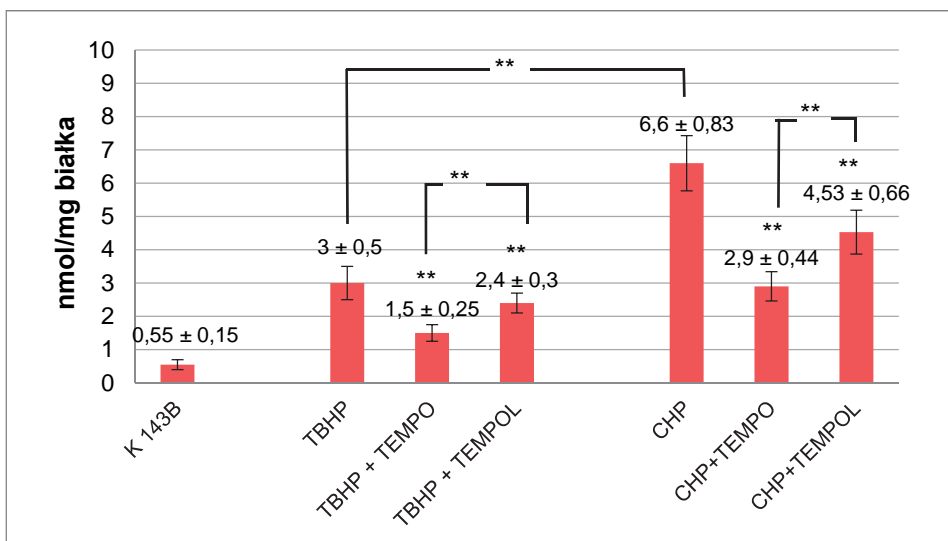
Na wykresie przedstawiono wartości średnie \pm SD

3. Peroksydacja lipidów w błonach komórkowych

Zbadano stopień oksydacyjnych uszkodzeń lipidów spowodowanych działaniem wodoronadtlenków TBHP i CHP [$50 \mu\text{M}$] przez 30 min oraz ochronnego wpływu TEMPO i TEMPOL [$50 \mu\text{M}$]. W tym celu frakcje

blon komórkowych wyizolowanych z komórek ludzkiej linii kostniakomięsaka 143B poddano działaniu wymienionych związków i zmierzono poziom MDA i 4-HNE (rys. 7).

Zaobserwowano, że CHP spowodował dwukrotny wzrost poziomu produktów peroksydacji lipidów MDA+4-HNE w stosunku do TBHP ($6,60 \pm 0,83$ wobec $3,0 \pm 0,5$ odpowiednio). TEMPO i TEMPOL natomiast zahamowały istotnie stopień oksydacyjnych uszkodzeń lipidów błonowych, przy czym TEMPO skuteczniej hamował tworzenie MDA i 4-HNE w obu badanych próbach. Wszystkie wyniki wyraźnie różniły się od próby nietraktowanej wodoronadtlenkami (rys. 7).



Rys. 7. Inhibicja peroksydacji lipidów w izolowanych błonach komórkowych z komórek 143B. TEMPO zahamował o 50% i 56%, TEMPOL zaś o 20% i 31% w stosunku do TBHP i CHP odpowiednio (** $p < 0,01$)

Na wykresie przedstawiono wartości średnie \pm SD

4. Wnioski i dyskusja

TEMPO i TEMPOL to syntetyczne lipofilne antyoksydanty, mitemyki SOD, w związku z czym ich działanie ochronne wynika z podobnego mechanizmu [32, 33]. Fosfolipidy błonowe są bardzo wrażliwe na ataki wolnych rodników, które prowadzą do peroksydacji lipidów, zaburzenia płynności błony – dwuwarstwy lipidowej, a w końcu do śmierci

komórki. Dlatego TEMPO i TEMPOL wydawały się doskonałymi antyoksydantami, które miały przeciwdziałać peroksydacji lipidów błonowych spowodowanej przez wodoronadtlenki TBHP i CHP. Istotnie, po zastosowaniu TEMPOL wobec komórek 143B stwierdzono działanie ochronne tego związku. Do podobnych wniosków doszli badacze, którzy wykazali antyoksydacyjne i ochronne działanie flawonoidu – hesperydyny na ludzkie hepatocyty poddane działaniu TBHP [8]. Wykazano ponadto, że TEMPOL chronił przed uszkodzeniami spowodowanymi O_2^- i NO_2 w modelu OZT wywołanego L-argininą [34]. TEMPOL miał ochronny wpływ również na proces tworzenia megamitochondriów w komórkach hepatocytów szczurzych linii RL-34 poddanych stresowi oksydacyjnemu indukowanemu cykloheksymidem lub chloramfenikolem [35]. Badania przedstawione w niniejszej pracy potwierdziły obserwacje przytoczonych autorów na temat antyoksydacyjnego działania tych związków. Za różnice pomiędzy działaniem TEMPO i TEMPOL odpowiada grupa hydroksylowa obecna przy węglu C4. Jak wiadomo, podlegająca oksydacji albumina zawiera polarne łańcuchy boczne (ujemnie naładowane Glu, Asp i Asn) wiążące żelazo [15]. Ponieważ TEMPOL jest również polarny, a dzięki grupie OH bardziej hydrofilowy niż TEMPO, ma on większe powinowactwo do białek i jest bardziej efektywny, jeśli chodzi o ich oksydację. TEMPO z kolei jest bardziej efektywny w ochronie przed peroksydacją lipidów spowodowaną działaniem rodników węglowych generowanych podczas metabolizmu wodoronadtlenków TBHP i CHP w komórce [36].

5. Perspektywy

Wyniki przedstawione w niniejszej pracy są częścią pracy doktorskiej pt. *Zmiany w strukturze błony komórkowej i budowie cytoszkieletu pod wpływem stresu oksydacyjnego i przeciwutleniaczy*, poświęconej mechanizmowi pączkowania błony komórkowej związanemu ze stresem oksydacyjnym. Jak wykazano, u podłoża opisywanych zmian leżały oksydacyjne modyfikacje białek budujących cytoszkielet oraz białek i lipidów budujących błony komórkowe. Za modyfikacje te przypuszczalnie odpowiedzialne były rodniki alifatyczne, ponieważ użyte zmiatacze wolnych rodników TEMPO i TEMPOL skutecznie je wyłapywały. Opierając się na wynikach powyższych badań oraz na wcześniejszych doniesieniach, można przypuszczać, że TEMPOL może być stosowany terapeutycznie w profilaktyce chorób związanych z oksydacyjnymi uszkodzeniami tkanek, m.in. hepatocytów i związanymi z nimi zaburzeniami czynności wątroby.

Literatura

- [1] Sies H., Summer K.H. (1975) Hydroperoxide-metabolizing systems in rat liver, *Eur. J. Biochem.* 57, 503–512.
- [2] Anari M.R., Khan S., O'Brien P.J. (1996) The involvement of cytochrome P-450 peroxidase in the metabolic bioactivation of cumene hydroperoxide by isolated rat hepatocytes, *Chem. Res. Toxicol.* 9, 924–931.
- [3] Castilho R.F., Kowaltowski A.J., Meinicke A.R., Bechara E.J., Vercesi A.E. (1995) Permeabilization of the inner mitochondrial membrane by Ca²⁺ ions is stimulated by t-butyl hydroperoxide and mediated by reactive oxygen species generated by mitochondria, *Free. Radic. Biol. Med.* 18, 479–486.
- [4] Meinicke A.R., Zavan S.S., Ferreira A.M., Vercesi A.E., Bechara E.J. (1996) The calcium sensor ruthenium red can act as a Fenton-type reagent, *Arch. Biochem. Biophys.* 328, 239–244.
- [5] Rosen G.M., Rauckman E.J. (1980) Spin trapping of the primary radical involved in the activation of the carcinogen N-hydroxy-2-acetylaminofluorene by cumene hydroperoxide-hematin, *Mol. Pharmacol.* 17, 233–238.
- [6] Barr D.P., Mason R.P. (1995) Mechanism of radical production from the reaction of cytochrome c with organic hydroperoxides. An ESR spin trapping investigation, *J. Biol. Chem.* 270, 12709–12716.
- [7] Weiss R.H., Estabrook R.W. (1986) The mechanism of cumene hydroperoxide-dependent lipid peroxidation: the function of cytochrome P-450, *Arch. Biochem. Biophys.* 251, 348–360.
- [8] Chen H.W., Chiang T., Wang C.Y., Lii C.K. (2000) Inhibition of tert-butyl hydroperoxide-induced cell membrane bleb formation by alpha-tocopherol and glutathione, *Food Chem. Toxicol.* 38, 1089–1096.
- [9] Lemasters J.J., DiGuiseppi J., Nieminen A.L., Herman B. (1987) Blebbing, free Ca²⁺ and mitochondrial membrane potential preceding cell death in hepatocytes, *Nature* 325, 78–81.
- [10] Sakaida I., Thomas A.P., Farber J.L. (1991) Increases in cytosolic calcium ion concentration can be dissociated from the killing of cultured hepatocytes by tert-butyl hydroperoxide, *J. Biol. Chem.* 266, 717–722.
- [11] Martin C., Martinez R., Navarro R., Ruiz-Sanz J.I., Lacort M., Ruiz-Larrea M.B. (2001) Tert-Butyl hydroperoxide-induced lipid signaling in hepatocytes: involvement of glutathione and free radicals, *Biochem. Pharmacol.* 62, 705–712.
- [12] Sarkar M.K., Sil P.C. (2010) Prevention of tertiary butyl hydroperoxide induced oxidative impairment and cell death by a novel antioxidant protein molecule isolated from the herb *Phyllanthus niruri*, *Toxicol. in Vitro* 24, 1711–1719.
- [13] Ławiński M., Śledziński Z., Kubasik-Juraniec J., Spodnik J.H., Woźniak M., Bogusławski W. (2005) Does resveratrol prevent free radical-induced acute pancreatitis?, *Pancreas* 31, 43–47.
- [14] Śledziński Z., Woźniak M., Brunelli A., Lezoche E., Scutti G., Kossowska E., Janowski K., Stanek A., Bertoli E. (2000) Experimental pancreatitis induced by synthetic prooxidant tert-butyl hydroperoxide, *Pancreas* 20, 146–151.
- [15] Temple A., Yen T.Y., Gronert S. (2006) Identification of specific protein carbonylation sites in model oxidations of human serum albumin, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 17, 1172–1180.

- [16] Halliwell B., Gutteridge J. (2007) Free radicals in biology and medicine, Oxford University Press, Oxford.
- [17] Bowry V., Lusztyk J., Ingold K.U. (1990) Calibration of very fast alkyl radical 'clock' rearrangements using nitroxides, *Pure Appl. Chem.* 62, 213–216.
- [18] Chateauneuf J., Lusztyk J., Ingold K.U. (1988) Absolute rate constants for the reactions of some carbon-centered radicals with 2,2,6,6-tetramethyl-1-piperidinoxyl, *J. Org. Chem.* 8, 1629–1632.
- [19] Czapski G., Samuni A., Goldstein S. (2002) Superoxide dismutase mimics: antioxidative and adverse effects, *Methods. Enzymol.* 349, 234–242.
- [20] Soule B.P., Hyodo F., Matsumoto K., Simone N.L., Cook J.A., Krishna M.C., Mitchell J.B. (2007) The chemistry and biology of nitroxide compounds, *Free Radic. Biol. Med.* 42, 1632–1650.
- [21] Wilcox C.S. (2010) Effects of tempol and redox-cycling nitroxides in models of oxidative stress, *Pharmacol. Ther.* 126, 119–145.
- [22] Damiani E., Kalinska B., Canapa A., Canestrari S., Wozniak M., Olmo E., Greci L. (2000) The effects of nitroxide radicals on oxidative DNA damage, *Free Radic. Biol. Med.* 28, 1257–1265.
- [23] Adeagbo A.S., Joshua I.G., Falkner C., Matheson P.J. (2003) Tempol, an antioxidant, restores endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated vasodilation during hypertension, *Eur. J. Pharmacol.* 481, 91–100.
- [24] Ebenezer P.J., Mariappan N., Elks C.M., Haque M., Francis J. (2009) Diet-induced renal changes in Zucker rats are ameliorated by the superoxide dismutase mimetic TEMPOL, *Obesity* 17, 1994–2002.
- [25] Rafikova O., Salah E.M., Tofovic S.P. (2008) Renal and metabolic effects of tempol in obese ZSF1 rats-distinct role for superoxide and hydrogen peroxide in diabetic renal injury, *Metabolism* 57, 1434–1444.
- [26] Wei Y., Clark S.E., Thyfault J.P., Uptergrove G.M., Li W., Whaley-Connell A., Ferrario C.M., Sowers J.R., Ibdah J.A. (2009) Oxidative stress-mediated mitochondrial dysfunction contributes to angiotensin II-induced nonalcoholic fatty liver disease in transgenic Ren2 rats, *Am. J. Pathol.* 174, 1329–1337.
- [27] Kossowska E., Zauszkiewicz A., Kubasik-Juraniec J., Tukaj C., Spodnik J.H., Hallman A., Klimek J., Syta E., Figarski A., Wakabayashi T., Woźniak M. (2004) 4-OH-TEMPO prevents the morphological alteration of rat thymocytes primed to apoptosis by oxidative stress inducer ButOOH, *Folia Morphol.* 63, 261–265.
- [28] Dąbrowska A., Jacewicz D., Łapińska A., Banecki B., Figarski A., Szkatuła M., Lehman J., Krajewski J., Kubasik-Juraniec J., Woźniak M., Chmurzynski L. (2005) Pivotal participation of nitrogen dioxide in L-arginine induced acute necrotizing pancreatitis: protective role of superoxide scavenger 4-OH-TEMPO, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 326(2), 313–320.
- [29] Śledziński Z., Woźniak M., Antosiewicz J., Lezoche E., Familiari M., Bertoli E., Greci L., Brunelli A., Mazera N., Wajda Z. (1995) Protective effect of 4-hydroxy-TEMPO, a low molecular weight superoxide dismutase mimic, on free radical toxicity in experimental pancreatitis, *Int. J. Pancreatol.* 18, 153–160.
- [30] Wakabayashi T. (2002) Megamitochondria formation – physiology and pathology, *J. Cell Mol. Med.* 6, 497–538.
- [31] Wakabayashi T., Adachi K., Matsuhashi T., Woźniak M., Antosiewicz J., Karbowsky M. (1997) Suppression of the formation of megamitochondria by scavengers for free radicals, *Mol. Aspects Med.* 18, 51–61.

- [32] Offer T., Russo A., Samuni A. (2000) The pro-oxidative activity of SOD and nitroxide SOD mimics, *FASEB. J.* 14, 1215–1223.
- [33] Samuni A., Mitchell J.B., DeGraff W., Krishna C.M., Samuni U., Russo A. (1991) Nitroxide SOD-mimics: modes of action, *Free Radic. Res. Commun.* 12–13, 187–194.
- [34] Jacewicz D., Dąbrowska A., Wyrzykowski D., Pranczk J., Woźniak M., Kubasik-Juraniec J., Knap N., Siedlecka K., Neuwelt A.J., Chmurzyński L. (2010) A novel biosensor for evaluation of apoptotic or necrotic effects of nitrogen dioxide during acute pancreatitis in rat, *Sensors* 10, 280–291.
- [35] Karbowski M., Kurono C., Woźniak M., Ostrowski M., Teranishi M., Soji T., Wakabayashi T. (1999) Cycloheximide and 4-OH-TEMPO suppress chloramphenicol-induced apoptosis in RL-34 cells via the suppression of the formation of megamitochondria, *Biochim. Biophys. Acta – Mol. Cell Res.* 1449, 25–40.
- [36] Goldstein S., Samuni A., Hideg K., Merenyi G. (2006) Structure-activity relationship of cyclic nitroxides as SOD mimics and scavengers of nitrogen dioxide and carbonate radicals, *J. Phys. Chem. A.* 110, 3679–3685.

BIAŁKA SZOKU TERMICZNEGO I ICH ROLA W DIAGNOSTYCE I TERAPII CHOROÓB NOWOTWOROWYCH U DZIECI

DOROTA SKÓRA^{1,2}, KAROLINA NISKA²,
MACIEJ NIEDŹWIECKI¹, ELŻBIETA DROŻYNSKA¹,
MICHAŁ WOŹNIAK², MAGDALENA GÓRSKA²

¹ Katedra i Klinika Pediatrii, Hematologii i Onkologii, Gdański Uniwersytet Medyczny
ul. Dębinki 7, 80-952 Gdańsk

² Katedra i Zakład Chemii Medycznej, Gdański Uniwersytet Medyczny
ul. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk
e-mail m.gorska@gumed.edu.pl

Hasła do zapamiętania: HSPs, inhibitory HSPs, modyfikacje potranslacyjne

Wykaz skrótów:

HSPs	– białka szoku termicznego
APCs	– komórki prezentujące antygeny
MHC	– układ zgodności tkankowej
GIST	– nowotwór podścieliskowy przewodu pokarmowego
MB	– <i>medulloblastoma</i>
OS	– <i>osteosarcoma</i>
NB	– <i>neuroblastoma</i>
17-DMAG	– <i>alvespimycyna</i>
17-AAG	– <i>tanespimycyna</i>
IPI-504	– <i>retaspimycyna</i>
NVP-AUY922	– <i>luminespib</i>

1. Wstęp

Białka szoku termicznego (HSPs), tzw. molekularne chaperony, należą do grupy białek odpowiedzialnych za regulację wielu procesów wewnątrzkomórkowych. HSPs są sklasyfikowane w sześć pod-

grup w zależności od ich masy molekularnej: HSP100, HSP90, HSP70, HSP60, HSP40 i małe HSPs (sHSPs) od 12 do 42 kDa. Sekwencja aminokwasowa powyższych białek wykazuje wysoce konserwatywną strukturę pierwszorzędową. Funkcja poszczególnych chaperonów zależy od ich lokalizacji. Wewnątrzkomórkowe HSPs biorą udział w fałdowaniu nowo zsyntetyzowanych protein, transportowaniu ich do poszczególnych organelli i naprawie uszkodzonych białek lub kierowaniu ich na drogę eliminacji. Zewnątrzkomórkowe HSPs są odpowiedzialne za indukowanie odpowiedzi immunologicznej przez prezentację antygenów, aktywację limfocytów i makrofagów oraz udział w dojrzewaniu komórek dendrytycznych. To tylko nieliczne z zadań, jakie spełniają.

Synteza większości HSPs zachodzi konstytutywnie, ale ich nadekspresja jest obserwowana podczas ekspozycji komórek na czynniki stresowe (wzrost temperatury, toksyny, UV, promieniowanie, niedotlenienie) [1–5]. Nadprodukcja HSPs umożliwia tym komórkom przetrwać w warunkach skrajnie niekorzystnych poprzez udział w naprawie nieprawidłowo sfałdowanych białek bądź ich eliminację, jeżeli są nieodwracalnie uszkodzone oraz bezpośredni i pośredni wpływ na regulację procesu apoptozy [6, 7].

Zauważalne w ostatnich latach zwiększenie zainteresowania HSPs jest spowodowane obiecującymi wynikami doniesień dotyczących potencjalnego udziału tych protein w patogenezie niektórych schorzeń, tj. niewydolności nerek [8], miażdżycy [9], choroby Alzheimera [10] oraz chorób onkologicznych [11]. Na podstawie rozlicznych eksperymentów wysunięto hipotezę, że HSPs mogą być zaangażowane w procesy kancerogenezy i wzrost chemiooporności komórek nowotworowych. Obecnie trwają badania nad zastosowaniem inhibitorów białek szoku termicznego w terapii przeciwnowotworowej, a łączenie niewielkich dawek inhibitorów białek HSP ze standardową chemioterapią w wielu przypadkach jest skuteczną drogą leczenia postaci opornych [12].

2. Krótka charakterystyka poszczególnych grup HSPs

HSPs mimo udowodnionego udziału w regulacji procesów apoptozy spełniają wiele innych funkcji w organizmie. Do jednych z lepiej poznanych białek szoku termicznego należy zaliczyć grupę białek HSP90. Znane są dwie izoformy tego białka: HSP90 alfa, która

podlega konstytutywnej ekspresji w cytoplazmie komórek większości ssaków oraz HSP90 beta – indukowana przez czynniki stresowe [13]. Wzrost stężenia HSP90 wykazywany jest w komórkach raka jajnika, piersi, trzustki czy raka żołądka [14]. HSP90, podobnie jak HSP70, jest stwierdzana w cytoplazmie komórek prezentujących antygeny (APCs). Wraz z wieloma innymi białkami HSPs tworzą kompleksy, które po „obróbce” przez komórki APC prezentowane są komórkom głównego układu zgodności tkankowej MHC I. Wszystkie te procesy prowadzą do aktywacji limfocytów T cytotoksycznych [15–17]. Ponadto, HSP70 są wydzielane do przestrzeni międzykomórkowej, a poprzez wiązanie do specyficznych receptorów uruchamiają syntezę i wydzielanie cytokin prozapalnych [18]. W wielu badaniach udowodniono jednoznaczny związek pomiędzy zwiększoną ekspresją HSP27 a opornością na leki przeciwnowotworowe, agresywnością przebiegu procesu nowotworowego, przerzutami i gorszymi rokowaniami co do przeżycia [19–22].

Tabela. Inhibitory białek szoku termicznego HSP90 w badaniach klinicznych

Inhibitor HSP90	Nowotwór	Faza badania klinicznego
Tanespimycyna + transtuzumab	przerzutowy rak piersi z dodatnią ekspresją receptora HER2	II
Tanespimycyna + bortezomib	nawrotowy chemooporny szpiczak mnogi	II/III
Tanespimycyna + bortezomib	zaawansowane guzy lite, chłoniaki	I
Tanespimycyna + transtuzumab	przerzutowy rak piersi z dodatnią ekspresją receptora HER2	II
BIIB021 + eksemestan (aromazyna)	hormonozależny przerzutowy rak piersi	II
BIIB021	GIST oporny na imatinib i sunitinib	II
Luminespib + transtuzumab	zaawansowany rak piersi z dodatnią ekspresją receptora HER2	I/II

Większość doniesień koncentruje się na badaniach przeprowadzonych wśród dorosłych, jednak ze względu na różnice w epidemiologii i patogenezie nowotworów wśród pacjentów pediatrycznych wymagają one odrębnej analizy. Dlatego w niniejszym rozdziale chcielibyśmy skupić się na przedstawieniu najnowszych wyników badań dotyczących udziału HSPs w schorzeniach onkologicznych wieku dziecięcego.

3. Zastosowanie białek szoku termicznego w diagnostyce i terapii chorób nowotworowych u dzieci

3.1. Ostre białaczki dziecięce

Choroby układu krwiotwórczego to najczęstsze choroby nowotworowe wieku dziecięcego. Stanowią około 26% wszystkich schorzeń onkologicznych w grupie wiekowej do 18. r.ż. Ostra białaczka limfoblastyczna występuje najczęściej, jest przyczyną około 80% wszystkich białaczek dziecięcych. Ostre białaczki nieлимfoblastyczne to pozostałe 15–20% chorych [23]. Istnieje wiele hipotez dotyczących etiopatogenezy białaczki, jednak żadna z nich, mimo znacznych postępów w medycynie, nie wydaje się jednoznaczna.

Na podstawie badań można wysnuć wniosek, że jedno z białek szoku termicznego – HSP27 odgrywa ważną rolę w patogenezie ostrej białaczki szpikowej i generowaniu chemiooporności na terapię przeciwnowotworową. Wśród chorych z wysoką ekspresją HSP27 częstość wznów jest zdecydowanie większa. Ponadto, wrażliwość komórek i efektywność leczenia przeciwnowotworowego wzrasta wraz ze spadkiem ekspresji HSP27 [24–27].

We wszystkich liniach białaczkowych stwierdza się także wysoką ekspresję HSP60, największą w komórkach linii Jurkat i CCRF-CEM (obie od chorych z ALL) [25]. HSP60 współdziałają z HSP10. Jest to stosunkowo nowo odkryta proteina grupy białek szoku termicznego. Udowodniono, że HSP10 są obecne w prekursorach linii mieloidalnej i megakariocytarnej, podczas gdy nie stwierdza się ich obecności w komórkach dojrzałych [28].

Do niedawna uważano, iż HSP72 wykazuje ekspresję na powierzchni komórek nowotworowych, co stanowiłoby ogromny przełom w diagnostyce i leczeniu onkologicznym, jednakże według ostatnich doniesień obecność HSP72 na powierzchni komórek zależy od stosowanych metod badawczych. Zaobserwowano bowiem, że wszelkie manipulacje, tj. stosowanie poszczególnych odczynników chemicznych, mrożenie czy rozmrażanie komórek ma wpływ na ekspresję HSP72 na ich powierzchni [25]. Ponadto, dodatnia ekspresja HSP o masie cząsteczkowej 70 kDa wykazywana jest na komórkach blastycznych u pacjentów po chemioterapii i radioterapii [29]. Odkryto jednak nowy parametr, który może być wykorzystany w praktyce klinicznej – cHSP70, czyli krążące w osoczu HSP, którego stężenie odzwierciedla

stopień zaawansowania białaczki. Stężenie cHSP koreluje z poziomem beta2-mikroglobuliny, LDH i leukocytozą. Z tego powodu wolne HSP70 może być użytecznym wskaźnikiem diagnostycznym i rokowniczym niezależnym od chemicznych i fizycznych manipulacji [30].

Wysoka ekspresja HSP90 jest natomiast stwierdzana w komórkach nowotworowych obecnych we krwi obwodowej chorych na ostrą białaczkę limfoblastyczną, co różni je od prawidłowych komórek krwi [31]. HSP90 może stanowić w przyszłości również użyteczny czynnik rokowniczy, ponieważ nadekspresja izoformy alfa i beta jest obserwowana w źle rokujących podtypach ostrej białaczki szpikowej [32].

3.2. Guzy ośrodkowego układu nerwowego

Guzy centralnego układu nerwowego zajmują drugie miejsce wśród najczęstszych chorób nowotworowych u dzieci i pierwsze wśród guzów litych. *Medulloblastoma* (rdzeniak zarodkowy) jest jednym z najgorzej rokujących z nich, stąd ogromna część badaczy skupia się na poszukiwaniu nowych czynników prognostycznych i terapii przeciwnowotworowych stosowanych w leczeniu tego schorzenia.

Wyniki badań nad udziałem HSP w patogenezie guzów o.u.n. i wykorzystaniem tych białek w praktyce klinicznej do celów diagnostycznych są niejednoznaczne. Według doświadczenia przeprowadzonego przez zespół Hauser i in. [33] w komórkach rdzeniaka zarodkowego obserwuje się wysoką ekspresję białek szoku termicznego o masie cząsteczkowej 27 kDa, 70 kDa oraz 90 kDa, jednak poziom ekspresji tych protein nie korelował z poznanymi już czynnikami prognostycznymi czy typem histologicznym *medulloblastoma*. Z drugiej strony, wyniki ostatnich doniesień, przeprowadzonych przy użyciu mikromacierzy, dowodzą, że białka szoku termicznego wykazują zróżnicowaną ekspresję poszczególnych grup białek w zależności od typu histopatologicznego MB. Podtyp *extensive nodularity* – prezentujący silnie wyrażoną guzkowość, charakteryzuje się lepszym rokowaniem niż rdzeniak klasyczny. Stwierdza się w nim niską ekspresję HSP27 (pSer15) i wysoką HSP60. Znacznie wyższą ekspresję HSP70 wykazano w wariantcie wielkokomórkowym rdzeniaka, który wiąże się ze złą prognozą i rozsiewem choroby nowotworowej [34, 35]. Wysokie HSP70 korelowało z dodatnim indeksem Ki-67, który jest komórkowym markerem proliferacji i niekorzystnego rokowania u chorych z MB. Ponadto, podczas analizy wszystkich podtypów MB stwierdzono dodatnią korelację pomiędzy ekspresją HSP40 a białkiem p53 [35].

Według raportu Ray i in. [36] białko p53 stanowi wskaźnik korzystnego rokowania u chorych na rdzeniaka zarodkowego.

Zwiększona ekspresja HSP 90 jest obserwowana w wielu typach nowotworów, także w MB. Udowodniono, że poprzez wielosygnałowe oddziaływania inhibitory HSP90, tj. 17-DMAG oraz 17-AAG, skracają życie komórek neoplazmatycznych MB, sugerując, że leki te mogą stanowić w przyszłości obiecującą opcję terapeutyczną [37, 38].

Aktualnie w eksperymentalnym leczeniu guzów mózgu wykonuje się próby miejscowej podaży rekombinowanego HSP70 do łoża po resekowanym nowotworze mózgu. Po 12 miesiącach oceniono wyniki leczenia. Kompletną odpowiedź obserwowano u jednego pacjenta, częściową u kolejnego, 9 pacjentów wykazywało stabilny obraz choroby. Tylko u jednego chorego stwierdzono progresję choroby [39].

3.3. *Osteosarcoma* – kostniakomięsak kości

Osteosarcoma to stosunkowo rzadko rozpoznawany nowotwór, jednak u dzieci, młodzieży i młodych dorosłych stanowi najczęstszy złośliwy guz kości. Zgodnie z klasyfikacją WHO *osteosarcoma* dzieli się na kilka typów różniących się pod względem wyglądu histopatologicznego i agresywności przebiegu klinicznego: wariant konwencjonalny, teleangiektyczny, drobnokomórkowy, wysoko różnicowany wewnątrzszpikowy, okostnowy, przykostny i nisko różnicowany powierzchniowy [40]. Najczęstszym typem jest typ konwencjonalny, inne występują zdecydowanie rzadziej [41]. Mimo znacznego progresu w leczeniu tego typu nowotworu, poprzez rozwój technik chirurgicznych, zastosowanie chemioterapii adjuwantowej i neoadjuwantowej, pięcioletnie przeżycie pacjenta nadal waha się w granicach 50–70% [42, 43]. Trudno ocenić rokowanie chorych na *osteosarcoma*, ponieważ obecne czynniki prognostyczne nie są pomocne w ocenie korzyści z intensyfikacji terapii przeciwnowotworowej bądź podawania zredukowanych dawek chemioterapii celem oszczędzenia organizmu przed skutkami powikłań po chemioterapii.

Wysoką ekspresję HSP27 i HSP70 wykazuje się w wariantcie konwencjonalnym OS – podtypie wymagającym agresywnego leczenia [44]. Co więcej, poziom ekspresji HSP27 koreluje z obecnością odległych przerzutów [45] i zdecydowanie gorszymi wartościami prognostycznymi [46]. Potwierdza to hipotezę, że białko szoku termicznego o masie cząsteczkowej 27 kDa może stanowić biomarker agresywności

przebiegu choroby nowotworowej. Ponadto, Trieb z zespołem [47] analizował obecność przeciwciał anti-HSP60, anti-HSP70 oraz anti-HSP90 w osoczu chorych z OS. Wykazał, że stężenie anti-HSP60 w momencie rozpoznania choroby jest znacznie większe u pacjentów z *osteosarcoma* w porównaniu do chorych z mięsakiem Ewinga, chrzęstniakomięsakiem czy w porównaniu do grupy kontrolnej. Zaobserwowano także dodatnią korelację między stężeniem przeciwciał anti-HSP70 a obecnością przerzutów odległych do płuc u chorych na OS, wysokie miano przeciwciał anti-HSP90 wiąże się z dobrą odpowiedzią na chemioterapię. Ich brak łączy się z ryzykiem wystąpienia odległych przerzutów [48]. Przeciwciała anti-HSP stanowią więc obiecujący wskaźnik złośliwości OS. Niezbędne jest przeprowadzenie badań wśród większej liczby pacjentów celem potwierdzenia danej teorii.

Inhibitory HSPs – geldanamycyna i jej analogi są obecnie szeroko testowane w badaniach klinicznych nad zastosowaniem ich w terapii OS. Obiecujące wyniki dostarcza zespół Lamourex [49], który wykorzystał do swoich doświadczeń nowy syntetyczny inhibitor HSP90 – PF-04942847. W odróżnieniu od innych inhibitorów, tj. geldanamycyna, 17-AAG, PF-04942847 selektywnie hamuje proces różnicowania osteoklastów. W badaniu przeprowadzonym przez nasz zespół [50] wykazaliśmy, że przeciwnowotworowe działanie geldanamycyny, które prowadzi do indukcji apoptozy komórek linii *osteosarcoma*, ma związek z hiperacetylacją HSP60.

Inhibitory białek szoku termicznego są wykorzystywane w połączeniu z lekami przeciwnowotworowymi, których działanie skupia się na hamowaniu aktywności telomerazy, tj. imetelstad.

W komórkach nowotworowych działanie telomerazy jest zdecydowanie niepożądane, ponieważ zahamowuje ona proces starzenia komórki. Z ostatnich doniesień wynika, że HSP90 wpływa na biologię telomerów i oddziałuje z podjednostką hTERT telomerazy ludzkiej. Kompleks promuje wiązanie DNA i nukleotydów do telomerazy, a tym samym przyczynia się do utrzymania długości telomerów. Zastosowanie inhibitorów białek szoku termicznego skutkuje zahamowaniem procesu [51].

Zarówno inhibitory telomerazy, jak i inhibitory HSPs potencjalizują swoje działanie i skutkują skróceniem telomerów w większym stopniu niż w przypadku działania każdej z tych substancji oddzielnie. Ma to swoje przełożenie na całkowite zahamowanie wzrostu linii komórkowych OS. Badania wymagają przełożenia na model zwierzęcy [52].

3.4. *Neuroblastoma* – nerwiak zarodkowy

Neuroblastoma – nerwiak zarodkowy jest trzecim co do częstości występowania nowotworem wieku dziecięcego. Leczenie i związane z tym rokowanie w dużej mierze zależy od stratyfikacji ryzyka. Wyniki przeprowadzanych badań skłaniają do redukcji dawek chemioterapii u pacjentów z NB niskiego ryzyka i na odwrót – pacjenci z NB o wysokim stopniu zaawansowania powinni otrzymywać zdecydowanie bardziej agresywną chemioterapię.

Stosunkowo niewiele informacji jest dostępnych na temat funkcji HSP w komórkach NB [53]. Stwierdzono, że GRP75, należące do białek szoku termicznego o masie cząsteczkowej 70 kDa, wykazuje znaczną nadekspresję w komórkach NB. Co więcej, odnotowano dodatnią korelację między produkcją tej proteiny a stopniem zróżnicowania komórek nowotworowych oraz wczesnym stadium choroby i odwrotną korelację między amplifikacją MYCN. Z analiz wynika, że GRP 75 jest niezależnym dobrym czynnikiem rokowniczym w NB [54], co w obliczu doniesień o ekspresji HSP70 w innych nowotworach jest dość nietypowym zjawiskiem.

4. Modyfikacje potranslacyjne HSPs

Modyfikacje potranslacyjne, tj. hiperfosforylacja, acetylacja, S-nitrozylacja, oksydacja, mogą zmieniać chemiczne i fizyczne właściwości białek, wpływać na ich stabilność, aktywność oraz regulację funkcji HSPs i funkcji białek, z którymi oddziałują [55]. Najwięcej badań dotyczących modyfikacji potranslacyjnych białek szoku termicznego dotyczy procesu fosforylacji. Supresja konstytutywnej fosforylacji HSP90beta w miejscach Ser-225 i Ser-226 może przyczynić się do chemiooporności w komórkach białaczkowych poprzez wzmacnianie interakcji między HSP beta i Apaf-1, co chroni przed formowaniem struktury apoptosomu [56]. We wspomnianym doniesieniu fosforylowana forma seryny moduluje funkcję HSP27 i ma funkcję prognostyczną u chorych z *medulloblastoma* [35]. Acetylacja polega na dołączeniu grupy acetylowej najczęściej do reszty lizynowej białka. Yu i in. [57] wykazał, że acetylacja HSP90 destabilizuje interakcje z białkami, tj. ErbB2, Raf-1, p53 mającymi zasadniczy wpływ na modulację procesów wewnątrzkomórkowych.

5. Perspektywy

HSPs należą do grupy białek odpowiedzialnych za regulację wielu procesów wewnątrzkomórkowych. Ekspresja tych białek jest indukowana stanami patofizjologicznymi, dlatego HSPs, ze względu na aktywność oraz nadekspresję w wielu typach komórek nowotworowych, mogą być rozważane pod kątem użycia ich jako biomarkery nowotworowe oraz markery efektywności chemioterapii.

Literatura

- [1] Li Z., Menoret A., Srivastava P. (2002) Roles of heat-shock proteins in antigen presentation and cross-presentation, *Curr. Opin. Immunol.* 45–51.
- [2] Wallin R.P., Lundqvist A., More S.H., von Bonin A., Kiessling R., Ljunggren H.G. (2002) Heat-shock proteins as activators of the innate immune system, *Trends Immunol.* 23, 130–135.
- [3] Tsan M.-F., Gao B. (2004) Cytokine function of heat shock proteins, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 286, C739–C744.
- [4] Calderwood S.K., Mambula S.S., Gray Jr P.J., Theriault J.R. (2007) Extracellular heat shock proteins in cell signaling, *FEBS Lett.* 581, 3689–3694.
- [5] Pockley A.G., Muthana M., Caderwood S.K. (2008) The dual immunoregulatory roles of stress proteins, *Trends Biochem. Sci.* 33, 71–79.
- [6] Arbeiter K., Bidmon B., Endemann M., Onno Bender T., Eickelberg O., Ruffingshofer D., Mueller T., Regele H., Herkner K., Aufricht C. (2001) Peritoneal dialysate fluid composition determines heat shock protein expression patterns in human mesothelial cells, *Kidney Int.* 60, 1930–1937.
- [7] Neckers L. (2007) Heat shock protein 90: the cancer chaperone, *J. Biosci.* 32(3), 517–530.
- [8] Marzec Ł., Zdrojewski Z., Bryl E. (2007) Białko szoku termicznego 72(Hsp72) w chorobach nerek, *Nefrol. Dial. Pol.* 11, 78–82.
- [9] Hansson G.K. (2005) Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease, *N. Engl. J. Med.* 352, 1685–1695.
- [10] Dewji N.N., Do C. (1996) Heat shock factor-1 mediates the transcriptional activation of Alzheimer's beta-amyloid precursor protein gene in response to stress, *Brain. Res. Mol. Brain Res.* 35, 325–333.
- [11] Heimbrecht K., Zeise E., Rensing L. (2000) Chaperones in cell cycle regulation and mitogenic signal transduction: a review, *Cell Prolif.* 33, 341–352.
- [12] Giménez O.A., Montalar S.J. (2010) Heat shock proteins in oncology, *Clin. Transl. Oncol.* 12, 166–173.
- [13] Gorska M., Popowska U., Sielicka-Dudzin A., Kuban-Jankowska A., Sawczuk W., Knap N., Cicero G., Wozniak F. (2012) Geldanamycin and its derivatives as Hsp90 inhibitors, *Front. Biosc. (Landmark Ed)*. Jun 1, 17, 2269–2277.
- [14] Ochel H.J., Gademan G. (2002) Heat-shock protein 90: potential involvement in the pathogenesis of malignancy and pharmacological intervention, *Onkologie* 25, 466–73.
- [15] Musiał K., Zwolińska D. (2010) Białka szoku cieplnego w przewlekłej chorobie nerek. Obrońcy czy agresorzy?, *Nefrol. Dializoter. Pol.* 14, 4, 206–210.

- [16] Cymerys J., Niemiałtowski M. (2004) Białka szoku cieplnego – molekularne perpetuum mobile, *Post. Biol. Kom.* 31, 331–352.
- [17] Menoret A., Chandawarkar R.Y., Srivastava P.K. (2000) Natural autoantibodies against heat-shock proteins hsp70 and gp96: implications for immunotherapy using heat-shock proteins, *Immunology* 101, 364–370.
- [18] Asea A. (2005) Stress proteins and initiation of immune response: chaperokine activity of hsp72, *Immunol. Rev.* 11, 34–43.
- [19] Bauer K., Nitsche U., Slotta-Huspenina J., Drecoll E., Von Weyhern C.H., Rosenberg R., Höfler H., Langer R. (2012) High HSP27 and HSP70 expression levels are independent adverse prognostic factors in primary resected colon cancer, *Cell Oncol.* (Dordr) 35, 197–205.
- [20] Chen S.F., Nieh S., Jao S.W., Liu C.L., Wu C.H., Chang Y.C., Yang C.Y., Lin Y.S. (2012) Quercetin suppresses drug-resistant spheres via the p38 MAPK-Hsp27 apoptotic pathway in oral cancer cells, *PLoS One* 7(11), e49275.
- [21] Ciocca D.R., Arrigo A.P., Calderwood S.K. (2013) Heat shock proteins and heat shock factor 1 in carcinogenesis and tumor development: an update *Arch Toxicol.* 87, 19–48.
- [22] Pavan S., Musiani D., Torchiano E., Migliardi G., Gai M., Di Cunto F., Erriquez J., Olivero M., Di Renzo M.F. (2013) HSP27 is required for invasion and metastasis triggered by hepatocyte growth factor, *Int. J. Cancer.* 134, 1289–1299.
- [23] Kowalczyk J.R. (2011) Wprowadzenie do onkologii i hematologii dziecięcej. Skrypt dla lekarzy specjalizujących się w onkologii i hematologii dziecięcej, Oficyna Drukarska, Warszawa, 5–11.
- [24] Madsen P.S., Hokland P., Clausen N., Ellegaard J., Hokland M. (1995) Differential expression levels of the heat shock protein 27 isoforms in pediatric normal, nonleukemic and common acute lymphoblastic leukemia B-cell precursors, *Blood* 85(2), 510–521.
- [25] Sedlackova L., Spacek M., Holler E., Imryskova Z., Hromadnikova I. (2011) Heat-shock protein expression in leukemia, *Tumor Biol.* 32, 33–44.
- [26] Khalil A.A., Kabapy N.F., Deraz S.F., Smith C. (2011) Heat shock proteins in oncology: Diagnostic biomarkers or therapeutic targets?, *Biochim. Biophys. Acta* 1816, 89–104.
- [27] Yang L., Cao L., Yang M., Tang D., Kang R., Min X., Zhu S., Yu Y. (2013) Hsp27: a novel therapeutic target for pediatric M4/M5 acute myeloid leukemia, *Oncol Rep.* 29(4), 1459–1466.
- [28] Cappello F., Tripodo C., Farina F., Franco V., Zummo G. (2004) HSP10 selective preference for myeloid and megakaryocytic precursors in normal human bone marrow, *Eur. J. Histochem.* 48, 3, 261–265.
- [29] Hromadnikova I., Sedlackova L. (2008) Analysis of cell surface and relative gene expression of heat shock protein 70 in human leukemia cell lines, *Leuk. Lymphoma* 49(3), 570–576.
- [30] Gehrman M., Radons J., Molls M., Multhoff G. (2008) The therapeutic implications of clinically applied modifiers of heat shock protein 70 (Hsp70) expression by tumor cells, *Cell Stress Chaperones* 13(1), 1–10.
- [31] Yufu Y., Nishimura J., Nawata H. (1992) High constitutive expression of heat shock protein 90 alpha in human leukemia cells, *Leuk Res.* 16(6–7), 597–605.
- [32] Flandrin P., Guyotat D., Duval A., Cornillon J., Tavernier E., Nadal N. (2008) Significance of heat-shock protein (HSP) 90 expression in acute myeloid leukemia cells, *Cell Stress Chaperones* 13(3), 357–364.
- [33] Hauser P., Hanzély Z., Jakab Z., Oláh L., Szabó E., Jeney A., Schuler D., Fekete G., Bognár L., Garami M. (2006) Expression and Prognostic Examination of Heat Shock

- Proteins (HSP 27, HSP 70, and HSP 90) in Medulloblastoma, *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 28(7), 461–466.
- [34] Grajkowska W. (2011) Rdzeniak – heterogenność tkanki histopatologicznego, *Aktualn. Neurol.* 11(2), 96–99.
- [35] Alexiou G.A., Vartholomatos G., Stefanaki K., Patereli A., Dova L., Karamoutsios A., Lallas G., Sfakianos G., Moschovi M., Prodromou N. (2013) Expression of heat shock proteins in medulloblastoma, *J. Neurosurg. Pediatr.* 12(5), 452–427.
- [36] Ray A., Ho M., Ma J., Parkes R.K., Mainprize T.G., Ueda S. (2004) A clinicobiological model predicting survival in medulloblastoma, *Clin. Cancer. Res.* 10, 76, 13–20.
- [37] Ayrault O., Godeny M.D., Dillon C., Zindy F., Fitzgerald P., Roussel M.F., Beereb H. (2009) Inhibition of Hsp90 via 17-DMAG induces apoptosis in a p53-dependent manner to prevent medulloblastoma, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Oct. 6, 106(40), 17037–17042.
- [38] Calabrese C., Frank A., Maclean K., Gilbertson R. (2003) Medulloblastoma sensitivity to 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin requires MEK/ERKM, *J. Biol. Chem.* Jul. 4, 278(27), 24951–24959.
- [39] Shevtsov M.A., Kim A.V., Samochernych K.A., Romanova I.V., Margulis B.A., Guzhova I.V., Yakovenko I.V., Ischenko A.M., Khachatryan W.A. (2014) Pilot study of intratumoral injection of recombinant heat shock protein 70 in the treatment of malignant brain tumors in children, *Onco. Targets Ther.* Jun. 18, 7, 1071–1081.
- [40] Yarmish G., Klein M.J., Landa J., Lefkowitz R.A., Hwang S. (2010) Imaging characteristics of primary osteosarcoma: nonconventional subtypes, *Radiographics* 30(6), 1653–1672.
- [41] Weiss A., Khoury J.D., Hoffer F.A. (2007) Telangiectatic osteosarcoma: the St. Jude Children's Research Hospital's experience, *Cancer* 109(8), 1627–1637.
- [42] Broadhead M.L., Clark J.C.M., Myers D.E., Dass C.R., Choong P. (2011) The molecular pathogenesis of osteosarcoma: a review, *Sarcoma*, 959248.
- [43] Geller D.S., Gorlick R. (2010) Osteosarcoma: a review of diagnosis, management, and treatment strategies, *Clinical advances in hematology & oncology* 8, 705–718.
- [44] Blake M.A., Kalra M.K. (2008) *Imaging in Oncology*, Springer, New York USA, 369–387.
- [45] Moon A., Bacchini P., Bertoni F., Olvi L.G., Santini-Araujo E., Kim Y.W., Park Y.K. (2010) Expression of heat shock proteins in osteosarcomas, *Pathology* 42(5) 421–425.
- [46] Uozaki H., Ishida T., Kakiuchi C., Horiuchi H., Gotoh T., Iijima T., Imamura T., Machinami R. (2000) Expression of heat shock proteins in osteosarcoma and its relationship to prognosis *Pathology – Research and Practice Volume* 196, Issue 10, 665–673.
- [47] Trieb K., Gerth R., Windhager R., Grohs J.G., Holzer G., Berger P., Kotz R. (2000) Serum antibodies against the heat shock protein 60 are elevated in patients with osteosarcoma, *Immunobiology* 201(3–4), 368–376.
- [48] Trieb K., Gerth R., Holzer G., Grohs J.G., Berger P., Kotz R. (2000) Antibodies to heat shock protein 90 in osteosarcoma patients correlate with response to neoadjuvant chemotherapy, *Br. J. Cancer* 82(1), 85–87.
- [49] Lamoureux F., Baud'Huin M., Ory B., Heymann D., Redini F. (2014) Preclinical efficacy of PF-04942847, a novel HSP90 inhibitor, in osteosarcoma, *Bone Abstracts* 3, PP94.
- [50] Gorska M., Gammazza M., Zmijewski A., Campanella C., Cappello F., Wasiewicz T., Kuban-Jankowska A., Daca A., Sielicka A., Popowska U., Knap N., Antoniewicz J., Wakabayashi T., Wozniak M. (2013) Geldanamycin-induced osteosarcoma cell death

- is associated with hyperacetylation and loss of mitochondrial pool of heat shock protein 60 (hsp60), *PLoS One* 8(8), e71135.
- [51] DeZwaan D.C., Freeman B.C. (2010) HSP90 manages the ends *Trends Biochem Sci.* 35(7), 384–391.
- [52] Hu Y., Bobb D., He J., Hill D.A., Dome J.S. (2015) The HSP90 inhibitor alvespimycin enhances the potency of telomerase inhibition by imetelstat in human osteosarcoma, *Cancer Biol. Ther.* 16(6), 949–957.
- [53] Kowalczyk J.R. (2001) Hematologia i onkologia – postępy 2000, *Medycyna Praktyczna – Pediaatria* 2, 88.
- [54] Hsu W.M., Lee H., Juan H.F., Shih Y.Y., Wang B.J., Pan C.Y., Jeng Y.M., Chang H.H., Lu M.Y., Lin K.H., Lai H.S., Chen W.J., Tsay Y.G., Liao Y.F., Hsieh F.J. (2008) Identification of GRP75 as an independent favorable prognostic marker of neuroblastoma by a proteomics analysis, *Clin. Cancer Res.* 1, 14(19), 6237–6245.
- [55] Scroggins B.T., Neckers L. (2007) Post-translational modification of heat shock protein 90: impact on chaperone function, *Expert. Opin. Drug. Discov.* 2, 1403–1414.
- [56] Kurokawa M., Zhao C., Reya T., Kornbluth S. (2008) Inhibition of apoptosome formation by suppression of Hsp90beta phosphorylation in tyrosine kinase-induced leukemias, *Mol. Cell Biol.* 28, 5494–5506.
- [57] Yu X., Guo Z.S., Marcu M.G., Neckers L., Nguyen D.M., Chen G.A., Schrupp D.S. (2002) Modulation of p53, ErbB1, ErbB2, and Raf-1 expression in lung cancer cells by depsipeptide FR901228, *J. Natl. Cancer Inst.* 94, 504–513.

PEPTYDY Z GRUPY HEMORFIN O POTENCJALNYCH WŁAŚCIWOŚCIACH PRZECIWBÓLOWYCH

HALINA STROŃSKA, ZBIGNIEW MAĆKIEWICZ

Pracownia Chemii Makromolekuł Biologicznych,
Katedra Biotechnologii Molekularnej, Wydział Chemii, Uniwersytet Gdański
ul. Wita Stwosza 63, 80-308 Gdańsk

Hasła do zapamiętania: ból, opioidy, peptydy, hemorfiny

Wykaz skrótów:

NEP – neprylizyna
APN – aminopeptydaza N
DPP III – peptydaza didpeptydylowa III

1. Wstęp

Ból według Międzynarodowego Stowarzyszenia Badania Bólu (IASP, *International Accociation for the Study of Pain*) definiowany jest jako subiektywne, negatywne doznania zmysłowe i uczuciowe spowodowane rzeczywistym lub zagrażającym uszkodzeniem tkanek lub też odczuwane jako uszkodzenie [1].

Istnieje wiele teoretycznych modeli bólu, a najbardziej uniwersalnym wydaje się ten zaproponowany przez Wade'a i Price'a [2]. Zgodnie z tym modelem ból opisywany jest jako proces złożony z czterech etapów: doznania zmysłowo-dyskryminacyjnego (czyli nieprzyjemnego uczucia, którego będziemy chcieli w przyszłości unikać), reakcji przykrości (która jest rodzajem prostej reakcji uczuciowej), cierpienia oraz behawioralnej ekspresji bólu. Cierpienie w tym wypadku jest zjawiskiem bardzo złożonym, gdyż zawiera w sobie rozbudowane reakcje uczuciowe, takie jak depresja, lęk czy gniew. Natomiast behawioralna ekspresja bólu, która bywa także określana jako zachowanie bólowe, wyrażana jest m.in. w aktywności codziennej i sprawności ruchowej.

Opisany model bólowy ułatwia dogłębne zrozumienie uczucia bólu oraz umożliwia rozwój działań terapeutycznych tak, aby stały się one bardziej efektywne. Szczegółowe informacje o zależności między odczuwaniem bólu a jego uzewnętrznieniem oraz aspektem psychologicznym mogą ułatwić bardziej adekwatną charakterystykę bólu, co z kolei wpływa na zwiększenie skuteczności prowadzonego leczenia [3].

2. Leczenie bólu

Generalnie leczenie bólu typowymi farmakologicznymi środkami przeciwbólowymi polega na znoszeniu bólu lub też znacznym podwyższeniu progu jego odczuwania. Na ogół takie leczenie jest wystarczająco efektywne. Niestety zdarza się też tak, że niezbędne jest uzupełnianie terapii o leki działające na psychikę, z uwagi na złożony charakter tegoż zjawiska. Wskazane jest tu stosowanie środków uspokajających, przeciwłękowych i przeciwdepresyjnych, dzięki którym możliwe jest podwyższenie progu tolerancji na ból, gdyż, jak wiadomo, negatywne emocje powodują dużo większe przeżywanie uczucia bólu [3].

Omawiając psychologiczne aspekty bólu, należy też wspomnieć o bardzo ważnym czynniku warunkującym skuteczność terapeutyczną – efekcie placebo. Powszechnie obserwuje się skuteczne działanie przeciwbólowe środków farmakologicznych, które pozbawione są takich właściwości. Zjawisko to jest wyrażeniem oczekiwania na efekt przeciwbólowy, które następnie dość często przeradza się w typowy odruch warunkowy, będący myśleniem typu: „zastrzyk zawsze uśmierza ból” [4–6]. Efekt ten tłumaczy się uczestnictwem opioidów endogennych. Obok efektu placebo należy wymienić również istotny efekt nocebo. Jest to hiperalgezia powodowana przez oddziaływanie czynników pogarszających stan psychiczny osoby chorej. Bierze w tym udział układ cholecystokininowy, który oddziałuje na psychikę [7–9].

Ból jest sygnałem informującym o uszkodzeniu tkanek lub zagrożeniu ich uszkodzeniem. Rodzaj, umiejscowienie i nasilenie bólu najczęściej pozwalają ustalić rozległość uszkodzenia, jego rodzaj, a także narząd, który temu uszkodzeniu uległ. Doznania bólowe są bez wątpienia niezbędne jako sygnał alarmowy. Jednak, gdy po wypełnieniu swojego zadania nie ustępują, mogą powodować wystąpienie wielu niekorzystnych czy wręcz niebezpiecznych dla zdrowia i życia objawów [10]. Dlatego tak ważna jest walka z bólem, niezależnie od źródła jego pochodzenia.

2.1. Leki przeciwbólowe

Leki stosowane w celu zmniejszenia natężenia bólu znane są już od bardzo dawna. Dla przykładu, morfina stosowana była już w III w. p.n.e., a co ciekawe nadal jest to niezastąpiony lek przeciwbólowy w niektórych przypadkach [11]. Aktualnie używane leki przeciwbólowe można podzielić ze względu na ich siłę, mechanizm działania oraz budowę chemiczną na dwie główne grupy: opioidowe i nieopiodowe leki przeciwbólowe.

Do pierwszej grupy należą takie farmaceutyki przeciwbólowe, które charakteryzują się silnym działaniem na ośrodkowy układ nerwowy. Leki te znoszą nawet bóle pochodzenia trzewnego o bardzo dużym natężeniu. W większych dawkach mogą powodować stan podobny do znieczulenia ogólnego (narkozy). Długotrwałe stosowanie tego typu preparatów grozi rozwojem tolerancji oraz lekozależności. Dlatego leki te zwane są narkotycznymi lekami przeciwbólowymi [11].

Drugą grupę tworzą nienarkotyczne farmaceutyki przeciwbólowe, które działają słabiej ośrodkowo oraz z reguły nie powodują rozwoju tolerancji i nigdy – nałogu. Ponadto charakteryzują się działaniem przeciwgorączkowym i przeciwzapalnym. Leki te znoszą bóle o stosunkowo małym natężeniu, jak np. bóle głowy czy bóle mięśniowe, nie uśmierzają natomiast bardzo silnych bólów, takich jak np. bóle pooperacyjne czy nowotworowe. Ich aktywność przeciwbólowa ma charakter tzw. pułapowy, co oznacza, że po przekroczeniu pewnych konkretnych dawek efekt przeciwbólowy nie zwiększa się [10].

3. Opioidy i lekozależność

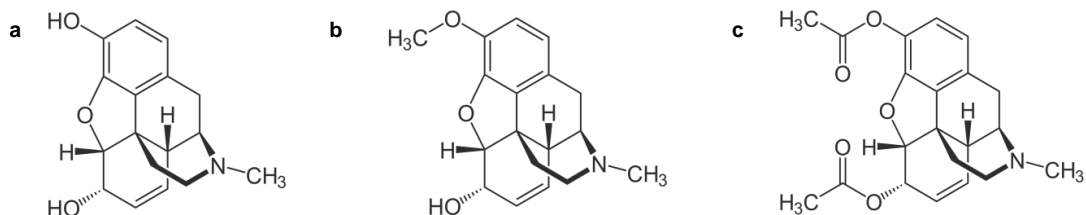
Lecnicze zastosowanie opium miało swoje początki już w starożytności. Od momentu natomiast wyizolowania głównego alkaloidu fenantrenowego opium – morfiny przez Friedricha Sertürnera w 1805 r. [12] wciąż trwają badania nad mechanizmem działania opioidów oraz ich właściwościami. Spośród wielu naturalnych alkaloidów fenantrenowych opium obecnie w lecznictwie zastosowanie mają morfina oraz kodeina. Związki te należą do silnych opioidowych leków przeciwbólowych, a ponadto wykazują właściwości przeciwkaszlowe i zapierające.

Morfina otrzymywana jest naturalnie z soku mlecznego niedojrzałych makówek maku lekarskiego (*Papaver somniferum*). Wykazuje ona powinowactwo głównie do receptorów opioidowych podtypu μ . Obok silnego działania ośrodkowego (przeciwbólowego), które dominuje w wypadku morfiny i innych leków morfinopodobnych, występuje także działanie na

narządy obwodowe, a szczególnie na przewod pokarmowy. Po zastosowaniu przeciętnych dawek leczniczych morfiny pojawia się działanie uspokajające. Objawia się ono sennością, trudnościami w koncentracji, spowolnieniem procesów myślenia oraz zmniejszeniem aktywności fizycznej. Przy dużych dawkach natomiast występuje stan podobny do znieczulenia ogólnego. Innym istotnym efektem ubocznym stosowania tego farmaceutyku jest występowanie depresji czynności oddechowej. Kodeina zaś wykazuje dużo słabsze działanie przeciwbólowe i przeciwbiegunkowe, a w lecznictwie stosowana jest głównie jako lek przeciwkaszlowy.

Przy omawianiu działań niepożądanych towarzyszących przyjmowaniu morfiny oraz farmaceutyków morfinopodobnych nie można pominąć takich efektów, jak tolerancja i lekozależność. Danysz i Gryglewski definiują lekozależność jako stan zarówno psychiczny, jak i fizyczny, który wynika z interakcji leku z żywym organizmem i charakteryzuje się zmianą zachowania, a także innymi reakcjami. Ściśle związana jest z tym tendencja, tudzież pożądanie regularnego zażywania danej substancji w celu doznawania jej efektów psychofarmakologicznych lub też w celu nie dopuszczenia do wystąpienia nieprzyjemnych doznań wynikających z odstawienia leku [11]. W powstaniu lekozależności bardzo ważną rolę odgrywa dawka leku. Podczas gdy w wypadku narkotycznych farmaceutyków analgetycznych nawet kilkunastodniowa terapia dawkami leczniczymi może doprowadzić do lekozależności, w wypadku innych leków dawka ta musi być przekroczona 2–8-krotnie, aby wywołać taki efekt.

Niestety mechanizm zjawiska lekozależności nie jest jeszcze dobrze poznany. Niektóre różnice w budowie chemicznej związków, nawet w przypadku tej samej grupy leków, powodują utratę lub nasilenie właściwości uzależniających. Najlepszym przykładem jest tutaj morfina i jej pochodne. Wskutek podstawienia grupy metylowej do morfiny (rys. a) powstaje kodeina (rys. b), którą cechuje dużo słabsze działanie uzależniające. Przez podstawienie dwóch grup acetylowych do morfiny otrzymujemy heroinę (rys. c), która z kolei charakteryzuje się jeszcze silniejszym efektem uzależniającym niż morfina.



Rys. Struktury leków opioidowych: a) morfina; b) kodeina; c) heroina

Bardzo ważnym czynnikiem ułatwiającym rozwój lekozależności jest tolerancja wytworzona na dany związek. Pod pojęciem tolerancji rozumie się zmniejszenie oczekiwanego efektu danej dawki leku, co implikuje konieczność jej zwiększenia, celem uzyskania pożądanego rezultatu leczenia. Dla niektórych środków farmakologicznych wzrost tej tolerancji bywa bardzo duży. Dla przykładu, narkomani są w stanie przyjąć takie dzienne dawki, które kilkakrotnie przewyższają dawki śmiertelne [11].

4. Peptydy opioidowe

Fakt istnienia w organizmie ludzkim receptorów specyficznych dla egzogennych związków opioidowych, takich jak morfina i kodeina, skłonił naukowców do wysunięcia hipotezy, iż muszą istnieć także endogenne związki wykazujące powinowactwo do receptorów opioidowych [11]. Rozpoczęto więc poszukiwania, które z czasem doprowadziły do odkrycia wielu endogennych związków o charakterze opioidowym mających właściwości przeciwbólowe. Przez długi czas określano je wspólnym mianem „endorfin” [10]. Obecnie wszystkie związki wykazujące powinowactwo do receptorów opioidowych nazywane są opioidami, a wśród nich rozróżnia się opioidy egzo- oraz endogenne. Nie trudno się domyślić, że do pierwszej grupy zaliczane są substancje pochodzenia roślinnego, takie jak wspomniane morfina i kodeina. Do endogennych opioidów obecnych naturalnie w organizmie należą m.in. peptydy opioidowe.

Peptydy opioidowe to związki niezwykle aktywne biologicznie. Przedstawicielami tej grupy są m.in. endorfiny, enkefaliny i dynorfiny. Substancje te, mimo przynależności do jednej grupy, charakteryzują się nieco zróżnicowanymi właściwościami, a także odmiennym miejscem pochodzenia. Dla przykładu, β -endorfiny powstają w przysadce mózgowej, podczas gdy enkefaliny zarówno w przysadce, jak i rdzeniu nadnerczy. Związki te różnią się także miejscem występowania – β -endorfiny głównie występują w jądrze łukowatym podwzgórza oraz w istocie szarej, enkefaliny zaś znajdują się zarówno w podwzgórzu, jak i w innych strukturach mózgu oraz tkankach obwodowych. Wspólną cechą peptydów opioidowych jest wywoływanie silnego działania przeciwbólowego, charakterystycznego dla związków typu morfiny [10].

Z uwagi na wysokie ryzyko wystąpienia uzależnienia oraz innych bardzo uciążliwych efektów ubocznych, w wypadku stosowania leków opioidowych znanych dotychczas, zaczęto szukać swego rodzaju alternatywy, która wyeliminowałaby w możliwie najwyższym stopniu wszystkie (a przynajmniej większość) działań niepożądanych. Z tego właśnie powo-

du uwaga badaczy skierowała się na peptydy opioidowe. Udowodniono, że endogenne krótkołańcuchowe peptydy zwane enkefalinami [13] wykazują bardzo silne działanie przeciwbólowe, gdyż reagują z wieloma receptorami opioidowymi [14]. Niestety okazało się, iż związki te cechuje bardzo krótki okres półtrwania, ponieważ szybko ulegają one rozkładowi pod wpływem enzymów zwanych enkefalinazami. Nowym kierunkiem w walce z bólem stało się więc poszukiwanie i projektowanie takich związków, które blokowałyby te enzymy, wskutek czego naturalne enkefaliny byłyby chronione przed rozkładem. Obiecującymi związkami tego typu okazały się rozmaite inhibitory enkefalinaz [47].

5. Inhibitory enkefalinaz

Inhibitory enkefalinaz można podzielić na trzy główne grupy – inhibitory specyficzne względem jednego z przedstawicieli enkefalinaz, multiinhibitory oraz inhibitory podwójne, wykazujące aktywność inhibicyjną względem dwóch lub więcej enzymów. Największą efektywnością cechują się inhibitory podwójne i multiinhibitory, dlatego właśnie w nich pokładane są największe nadzieje na stworzenie grupy leków przeciwbólowych nowej generacji.

Inhibitorem podwójnym znalezionym w organizmie człowieka jest ludzka opiorfina, która blokuje działalność takich enzymów, jak neprylizyna (NEP) i aminopeptydaza N (APN). Peptyd ten składa się z pięciu aminokwasów o sekwencji Gln-Arg-Phe-Ser-Arg i wyizolowany został z ludzkiej śliny [16]. Opiorfina wykazuje potencjalną aktywność przeciwbólową w bólowych modelach chemicznych i mechanicznych [15]. Badania *in vitro* potwierdziły jej aktywność inhibicyjną względem ektopeptydaz NEP i APN, co z kolei potwierdza hipotezę, iż peptyd ten chroni endogenne enkefaliny przed rozkładem enzymatycznym [17, 18].

5.1. Spinorfina

Niezwykłe interesującym multiinhibitorem względem enkefalinaz jest spinorfina [15]. Peptyd ten składa się z siedmiu aminokwasów o sekwencji Leu-Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr i należy do rodziny hemorfin. Związki te są grupą endogennych peptydów opioidowych powstających wskutek hydrolizy enzymatycznej jednego z sześciu łańcuchów hemoglobiny (łańcucha β). Za opioidowy charakter hemorfin odpowiedzialny jest w sekwencji rdzeń Tyr-Pro-Trp-Thr [19]. Badania potwierdziły, iż ten

4-aminokwasowy fragment nie tylko stanowi pozycje 34.–37. łańcucha β hemoglobiny wołu, ale też występuje w niektórych pozostałych łańcuchach hemoglobiny [20].

Spinorfina jest peptydem dobrze rozpuszczalnym zarówno w wodzie, jak i rozpuszczalnikach organicznych [21]. Została wyizolowana po raz pierwszy z rdzenia kręgowego wołu za pomocą chromatografii kolumnowej [22]. Potwierdzono, iż związek ten wykazuje aktywność inhibicyjną względem enzymów APN i NEP, a także peptydazy dipeptydylowej III (DPP III) wyizolowanych z mózgu małpy [23]. Wartości IC₅₀ dla spinorfiny względem poszczególnych enzymów wynoszą odpowiednio: 3,3 $\mu\text{g/ml}$ dla APN, 10 $\mu\text{g/ml}$ dla NEP oraz 1,4 $\mu\text{g/ml}$ dla DPP III [22]. Peptyd ten, obok silnego działania przeciwbólowego, prawdopodobnie wykazuje także działanie przeciwzapalne, które polega na hamowaniu niektórych funkcji wielojądrzastych granulocytów obojętnochłonnych (PMNs) biorących udział w regulowaniu stanu zapalnego, co potwierdzono w badaniach zarówno *in vitro*, jak również *in vivo* w modelu zapalnym, przy stosunkowo wysokiej dawce efektywnej [21]. Badania te jednak były wykonywane, jak do tej pory, wyłącznie z wykorzystaniem tkanek zwierzęcych, zatem na chwilę obecną nie można określić dawki efektywnej dla ludzi.

6. Perspektywy

Ból może być definiowany w skrócie jako negatywne doznanie zmysłowe spowodowane rzeczywistym lub potencjalnym uszkodzeniem tkanek organizmu. Pełni niezastąpioną rolę alarmującą, jednak gdy po wypełnieniu tej funkcji występuje nadal, sam staje się problemem, który może prowadzić do wielu niekorzystnych następstw. Dlatego walka z bólem, szczególnie takim o dużym nasileniu, który utrudnia normalne funkcjonowanie, jest konieczna. Środki farmakologiczne spełniające to zadanie znane były już w starożytności, jednak do chwili obecnej nie znaleziono leku idealnego. Obecna medycyna zna wiele farmaceutyków z grupy opioidów potrafiących uśmierzać nawet najbardziej uciążliwe bóle (np. pooperacyjne czy nowotworowe), niestety stosowanie takich środków niesie z sobą wiele niekorzystnych efektów ubocznych, z których najpoważniejszymi są rozwój tolerancji oraz uzależnienia. Z tego względu celem wielu badań stało się poszukiwanie substancji, które jednocześnie charakteryzowałyby się równie silnym efektem analgetycznym, jak opioidy i brakiem działań niepożądanych. Związkami spełniającymi te kryteria okazały się występujące naturalnie w organizmie człowieka endogenne peptydy opioidowe – enkefaliny. Badania ukazały jednak, że związki

te są szybko degradowane *in vivo* przez enzymy zwane enkefalinazami. Powstała zatem hipoteza, zgodnie z którą inhibicja tych enzymów uchroniłaby endogenne enkefalininy przed rozkładem, a co za tym idzie – umożliwiłaby naturalne, fizjologiczne zniesienie bólu. Substancjami mającymi zdolność hamowania aktywności wspomnianych enzymów okazały się naturalnie występujące inhibitory enkefalinaz, takie jak np. spinorfina. Badania potwierdziły, iż siedmiopeptyd ten jest multiinhibitorem względem kilku enkefalinaz obecnych w mózgu małpy. Niestety, badania nad spinorfiną przeprowadzone były do tej pory jedynie na tkankach zwierzęcych, przez co na chwilę obecną nie jest możliwe określenie efektywności tego związku wobec organizmu człowieka. Nie mniej jednak peptyd ten jest interesującym i niezwykle obiecującym obiektem badań.

Literatura

- [1] Dahl J.B., Moïniche S. (2004) Pre-emptive analgesia, *Br. Med. Bull.* 71(1), 13–27.
- [2] Wade J.B., Dougherty L.M., Archer C.R., Price D.D. (1996) Assessing the stages of pain processing: a multivariate analytical approach, *Pain* 68(1), 157–167.
- [3] de Walden-Gałuszko K. (2007) Psychologiczne aspekty bólu i jego leczenia, *Medycyna Paliatywna w Praktyce* 1(2), 66–70.
- [4] Brody H. (red.) (2000) *The placebo response*, Harper, Lakewood.
- [5] Finniss D.G., Benedetti F. (2005) Mechanisms of the placebo response and their impact on clinical trials and clinical practice, *Pain* 114, 3–6.
- [6] Villemure C., Bushnell M.C. (2002) Cognitive modulation of pain: how do attention and emotion influence pain processing?, *Pain* 95, 195–199.
- [7] Benedetti F., Arduino C., Costa S., Vighetti S., Tarenzi L., Rainero I., Asteggiano G. (2006) Loss of expectation-related mechanisms in Alzheimer's disease makes analgesic therapies less effective, *Pain* 121(1–2), 133–144.
- [8] Amanzio M., Benedetti F. (1999) Neuropharmacological dissection of placebo analgesia: expectation-activated opioid systems versus conditioning-activated specific subsystems, *J. Neurosci.* 19(1), 484–494.
- [9] Bendetti F., Amanzio M., Vighetti S., Asteggiano G. (2006) The biochemical and neuroendocrine bases of the hyperalgesic nocebo effect, *J. Neurosci.* 26(46), 12014–12022.
- [10] Kostowski W., Herman Z. (2004) *Farmakologia. Podstawy farmakoterapii*, PZWL, 194–226.
- [11] Danysz A., Gryglewski R. (1982) *Farmakologia*, PZWL, Warszawa, 232–241.
- [12] Goerig M., Schulte am Esch J. (1991) Friedrich Wilhelm Adam Sertürner-the discoverer of morphine, *Anesthesiol. Intensivmed. Notfallmed. Schmerzther.* 26(8), 492–498.
- [13] Hughes J., Smith T.W., Kosterlitz H.W. (1977) The distribution of methionine-enkephalin and leucine-enkephalin in the brain and peripheral tissues, *Br. J. Pharmacol.* 61(4), 639–647.
- [14] Lord J.A.H., Waterfield A.A., Hughes I., Kosterlitz H.W. (1977) Endogenous opioid peptides: multiple agonists and receptors, *Nature* 267, 495–499.

- [15] Thanawala V., Kadam V.J., Ghosh R. (2008) Enkephalinase inhibitors: potential agents for the management of pain, *Current Drug Targets* 9(10), 887–894.
- [16] Wisner A., Dufour E., Messaoudi M., Nejdi A., Marcel A., Ungeheuer M.N., Rougeot C. (2006) Human opiorphin, a natural antinociceptive modulator of opioid-dependent pathways, *PNAS* 103(47), 17979–17984.
- [17] Popik P., Kamysz E., Kreczko J., Wróbel M. (2010) Human opiorphin: the lack of physiological dependence, tolerance to antinociceptive effects and abuse liability in laboratory mice, *Behav. Brain Res.* 213(1), 88–93.
- [18] Stanović S., Boranić M., Petrovečki M., Batinić D., Skodlar J., Nemet D., Labar B. (2000) Thiorphan, an inhibitor of neutral endopeptidase/enkephalinase (CD10/CALLA) enhances cell proliferation in bone marrow cultures of patients with acute leukemia in remission, *Haematologia* 30(1), 1–10.
- [19] Nyberg F., Sanderson K., Glämsta E.L. (1997) The hemorphins: a new class of opioid peptides derived from the blood protein hemoglobin, *Biopolymers* 43(2), 147–56.
- [20] Brantl V., Gramsch Ch., Lottspeich F., Mertz R., Jaeger K.H., Herz A. (1986) Novel opioid peptides derived from hemoglobin: hemorphins, *Eur. J. Pharmacol.* 125(2), 309–310.
- [21] Yamamoto Y., Ono H., Ueda A., Shimamura M., Nishimura K., Hazato T. (2002) Spinorphin as an endogenous inhibitor of enkephalin-degrading enzymes: roles in pain and inflammation, *Curr. Protein Pept. Sci.* 3(6), 587–599.
- [22] Nishimura K., Hazato T. (1993) Isolation and identification of an endogenous inhibitor of enkephalin-degrading enzymes from bovine spinal cord, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 194(2), 713–719.
- [23] Polosa R., Santonocito G., Magri S., Paolino G., Armato F., Pagano C., Crimi N. (1997) Neutral endopeptidase inhibition with inhaled phosphoramidon: no effect on bronchial responsiveness to adenosine 5'-monophosphate (AMP) in asthma, *Eur. Respir. J.* 10(11), 2460–2464.

SYNTHESIS OF ANTIFREEZE GLYCOPEPTIDES (AFGP)

MAŁGORZATA URBAŃCZYK¹, JOANNA KRZCIUK-GULA¹,
NORBERT SEWALD², RAFAŁ LATAJKA¹

¹ Department of Organic and Pharmaceutical Technology,
Wrocław University of Technology

ul. Wybrzeże Wyspiańskiego 27, 50-370 Wrocław, Poland

² Organic and Bioorganic Chemistry, Department of Chemistry,
Bielefeld University, Bielefeld, Germany

e-mail: malgorzata.urbanczyk@pwr.edu.pl

Keywords: antifreeze glycopeptides, antifreeze protein, solid-phase peptide synthesis, Kelvin effect

Abbreviations:

AFGP – antifreeze glycopeptides

AFP – antifreeze protein

Hyp – Hydroxyproline

MV – microwave irradiation

PPII – Polyproline-II helix

SPPS – solid-phase peptide synthesis

1. Introduction

Nature is able to find the way to create life even in the very harsh and hostile conditions. Ectoterm species of animals inhabiting Arctica and Antarctica have developed very interesting strategies against freezing.

Water temperature in polar and subpolar regions is about -1.9°C . The analysis of sera of fish living in these regions have shown the presence of more salts, carbohydrates and amino acids as well as some special molecules which are able to depress the freezing temperature and cause the thermal hysteresis. These molecules are divided into two main groups – the antifreeze glycoproteins or glycopeptides (AFGPs) and the

antifreeze proteins (AFPs). The fish is protected against cryoinjury due to presence of AFP and AFGP in the body fluids [1].

The structure – activity relationship of these compounds have been investigated for many years. During that time many reports and reviews were published. Some of them concerning the physical and chemical properties of these compounds [1–4] and others dedicated to the mechanisms of action of AFGP.

1.1. AFGP

Antifreeze Glycopeptides are a class of biological antifreezers which can be found in Arctic and Antarctic species of fish which enable living at temperatures below the freezing point of the body fluids. This fact intrigued many scientists and in 1953 Scholander and co-workers published a series of articles describing unusually low freezing point of the blood serum from arctic fish revealing that this phenomena was not caused due to the presence of salts or other substances acting in non-colligative manner. DeVries at al. proved the presence of a glycoprotein in the sera of Antarctic fish that was responsible for lowering the freezing temperature without observing an increase of osmotic pressure [5].

Antifreeze glycopeptides are composed of 4 to 55 tripeptide units alanine-alanine-threonine, glycosylated at the threonine side chains with the disaccharide β -D-galactosyl-(1 \rightarrow 3)- α -N-acetyl-D-galactosamine (Fig. 1). The molecular mass of these unique materials ranges from 2.6 to 33.7 kDa.

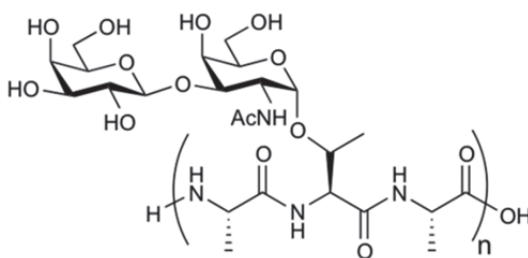


Fig. 1. AFGP structure

The exact mechanism of action of AFGPs remains unclear due to their heterogeneity of these compounds. It is believed that AFGPs interact directly with the surface of ice, induce the thermal hysteresis, inhibit ice recrystallization and heterogeneous nucleation as well as change the

ice crystal shape from spherical to hexagonal-bipyramidal. Moreover AFGPs are non-cytotoxic to humans in some range of concentrations [6].

Average concentration of AFGPs in the blood sera ranges from 5 to 35 mg/mL depending on species of Antarctic notothenioid fish [7]. In vitro the inhibition of ice recrystallization can be observed at very low concentrations (10^{-4} mg/mL) [8].

AFGPs are capable of suppressing the freezing point of water below the melting point and so called thermal hysteresis phenomena can be observed [9]. One of the explanations of the mechanism by which AFGPs inhibit ice crystal growth is Kelvin effect. There are two models of action. In the mattress model the growth of ice is blocked perpendicular to the surface (Fig. 2a). In case of the second model (step-pinning) a prevention of the forming of the next step occurs (Fig. 2b) [10].

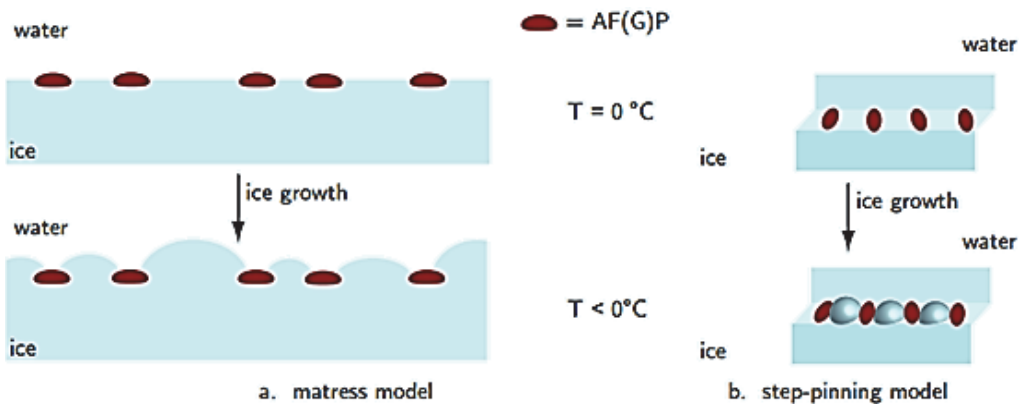


Fig. 2. Ice growth inhibition process based on a) 2 dimensional b) 3 dimensional Kelvin effect [10]

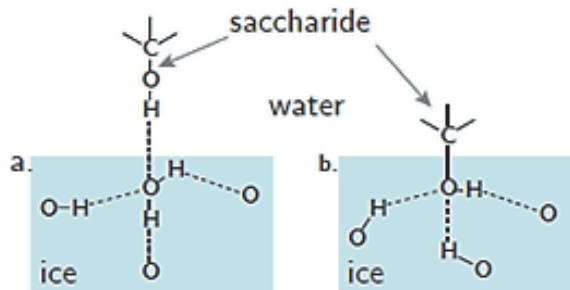


Fig. 3. Hydrogen bonding between AFGP and ice surface [10]

Model explaining adsorption of AFGPs on the ice surface involves hydrogen bonds between hydroxyl groups present in the disaccharide and water molecules on the ice surface. First model (Fig. 3a) implies that in the best situation only two hydroxyl group from the disaccharide are able to form hydrogen bonds. An enhanced model suggest that hydroxyl groups of the sugar are incorporated into ice lattice. In this case each hydroxyl group can form three hydrogen bonding which could explain the tight binding of the molecules to the ice surface (Fig. 3b) [10].

Due to their interesting properties AFGPs have many potential applications:

- Pumping of ice-water mixtures (ice slurries);
- Improvement of cold hardiness in plants and animals;
- Food industry:
 - Ice cream,
 - Frozen food products,
 - Freeze storage of berries and fruits;
- Biomedical purposes:
 - Long-term cryopreservation of induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells,
 - Long-term cryopreservation of various organs and tissues,
 - Cryosurgery.

Therefore it is crucial to find an efficient strategy of obtaining these materials.

2. The synthesis of AFGP

The first synthesis of a natural AFGP tripeptide unit was performed by Tsuda and Nishimura, then the building block was polymerized using solution-phase method [11]. Tachibana et al. enhanced the solution-phase synthesis by changing the tripeptide building block from Ala-Ala-Thr to Ala-Thr-Ala to avoid steric hindrance [12].

Solid Phase Peptide Synthesis (SPPS) was used for the first time to obtain AFGP analogues by Filira et al. [13]. Unfortunately these were just simplified versions of natural AFGPs. After 11 years Tseng et al. managed to prepare a native AFGP using SPPS approach [14].

Nowadays SPPS protocol is commonly used for obtaining antifreeze glycopeptides. This method provides better control over the peptide sequence and length in comparison to the solution-phase approach. Moreover liquid-phase reagents and byproducts are flushed away during the process.

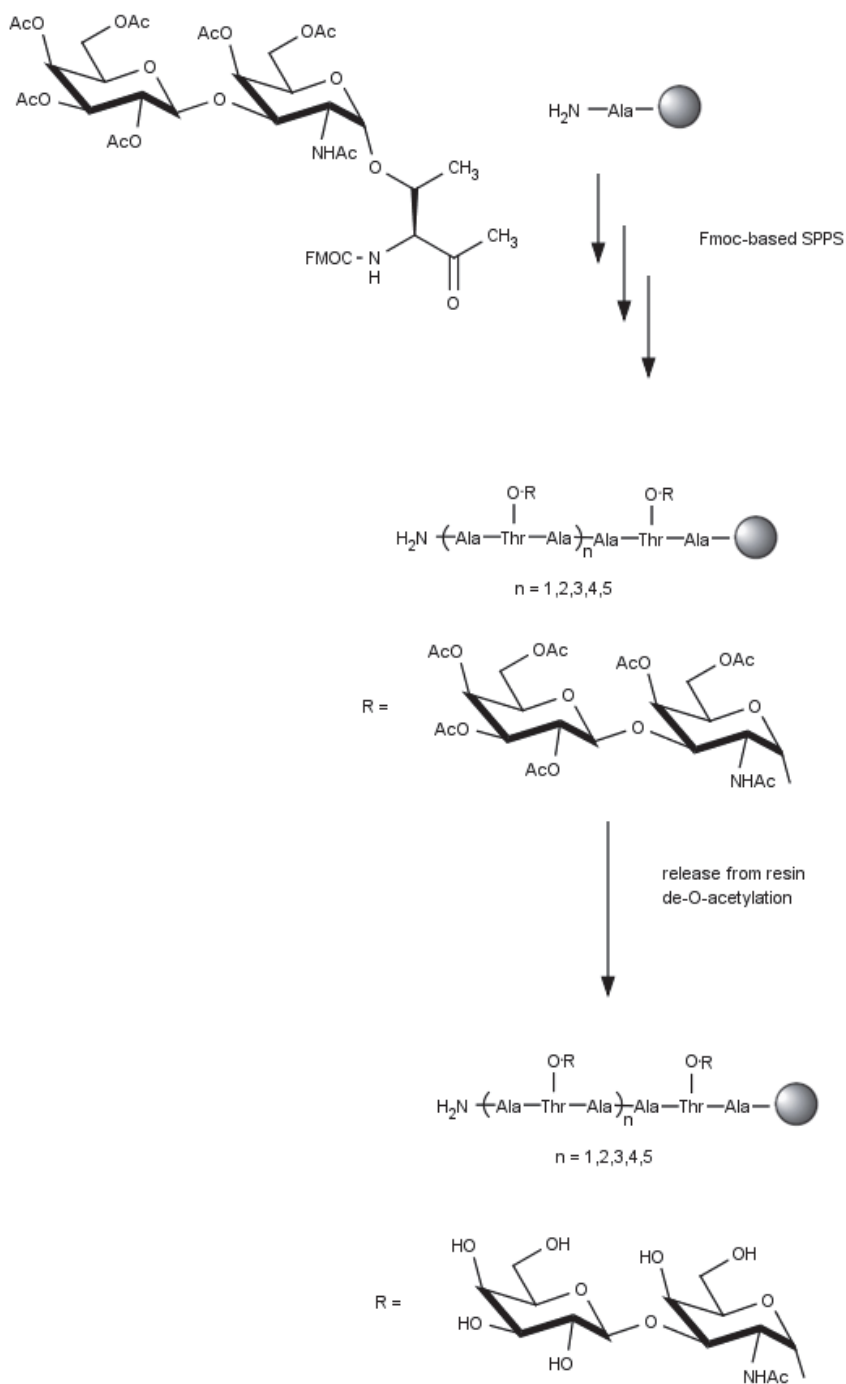


Fig. 4. SPPS of antifreeze glycopeptides [16]

The synthesis of AFGPs is divided into two steps. The first one involves preparing suitable glycosylated building block (in this case glycosylated threonine) and then via solid phase peptide synthesis the building blocks and amino acids are incorporated into peptide sequence. The most popular is standard Fmoc-based strategy.

Regrettably SPPS is not so convenient in case of AFGP because of the steric hindrance of the disaccharide in the threonine building block. To improve the yields of these coupling reactions microwave radiation can be used.

Applying the MV radiation can reduce the time of one coupling from 3 h to 45 min [15] and works perfectly in case of heavily glycosylated peptides. MV enhanced SPPS also offers the improvement of the yields and purity of the crude products.

On the other hand the usage of MV radiation may cause racemization and necessity to ensure optimal synthesis conditions (to avoid the decomposition and deglycosylation of the peptides). Next disadvantage of this procedure is the excessive usage of expensive reagents.

3. Discussion

The solid phase peptide synthesis is an excellent tool for preparation of antifreeze glycopeptides. Usage of microwave irradiation enhances the process of coupling, resulting higher yields of the crude products. Unfortunately this method has few limitations, e.g. maximum length of the sequence reaching 10 repeating tripeptide units.

Nowadays, a lot of new synthetic strategies is involved to elongate sequences of natural AFGPs. For example the synthesis of homogeneous AFGP oligomers sized from 1.2 to 19.5 kDa can be achieved using convergent native chemical ligation-desulfurization strategy [17].

A lot of researches is focused on AFGP analogues containing Ser or Hyp [18] residues, triazole-linked AFGP [18, 19] or even designing C-linked Xaa-Gly-Gly AFGP mimics [9]. The main goal of these modifications is to achieve better properties and stability of the compounds as well as to determine the secondary structure and to develop novel PPII helical assemblies with antifreeze activity [9].

4. Perspectives

Antifreeze glycopeptides will still arouse the interests of many scientists due to their unique properties and potential applications. Despite many years of research devoted to AFGPs there are still some ques-

tions to be answered. The main problems relate to cytotoxicity and stability of the compounds. Another issue is the development of efficient synthetic method with the possibility to scale up the process before utilizing these materials for some commercial and industrial purposes.

Literature

- [1] Yin Yeh Y., Feeney R.E. (1996) Antifreeze Proteins: Structures and Mechanisms of Function, *Chem. Rev.* 96, 601–618.
- [2] Eastman J.T., DeVries A.L. (1989) Ultrastructure of the Lipid Sac Wall in the Antarctic Notothenioid Fish *Pleuragramma antarcticum*, *Polar Biol.* 9, 333–3335.
- [3] Chen L., DeVries A.L., Cheng C.-H.C. (1997) Evolution of antifreeze glycoprotein gene from a trypsinogen gene in Antarctic notothenioid fish, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 3811–3816.
- [4] DeVries A.L., Komatsu S.K., Feeney R.E. (1970) Chemical and physical properties of freezing point-depressing glycoproteins from Antarctic fishes, *J. Biol. Chem.* 245, 2901–2908.
- [5] Liu S., Wang W., von Moos E., Jackman J., Mealing G., Monette R., Ben R.N. (2007) In Vitro Studies of Antifreeze Glycoprotein (AFGP) and a C-Linked AFGP Analogue, *Biomacromolecules* 8, 1456–1462.
- [6] Jina Y., DeVries A.L. (2006) Antifreeze glycoprotein levels in Antarctic notothenioid fishes inhabiting different thermal environments and the effect of warm acclimation, *Compar. Biochem. Physiol. Part B: Biochem. Mol. Biol.* 144, 209–300.
- [7] Tomczak M.M., Marshall C.B., Gilbert J.A., Davies P.L. (2003) A facile method for determining ice recrystallization inhibition by antifreeze proteins, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 311, 1041–1046.
- [8] Bang J.K., Lee J.H., Murugan R.N., Lee S.G., Do H., Koh H.Y., Shim H.-E., Kim H.-C., Ki H.J. (2013) Antifreeze Peptides and Glycopeptides, and Their Derivatives: Potential Uses in Biotechnology, *Marine Drugs* 11, 2013–2041.
- [9] Plattner C. (2009) Synthesis, Conformational, and Functional Characterization of Antifreeze Glycopeptides, PhD Thesis, Bielefeld University.
- [10] Tsuda T., Nishimura S.-I. (1996) Synthesis of an antifreeze glycoprotein analogue: efficient preparation of sequential glycopeptide polymers, *Chem. Commun.* 24, 2779–2780.
- [11] Tachibana Y., Matsubara N., Nakajima F., Tsuda T., Tsuda S., Monde K., Nishimura S.-I. (2002) Efficient and versatile synthesis of mucin-like glycoprotein mimics, *Tetrahedron* 58, 10213–10224.
- [12] Filira R., Biondi L., Scolaro B., Foffani M.T., Mammi S., Peggion E., Rocchi R (1990) Solid phase synthesis and conformation of sequential glycosylated polytripeptide sequences related to antifreeze glycoproteins, *Int. J. Biol. Macromol.* 12, 41–49.
- [13] Ping-Hui Tseng P.-H., Jiaang W.-T., Chang M.-Y., Chen S.-T. (2001) Facile Solid-Phase Synthesis of an Antifreeze Glycoprotein, *Chem. Eur. J.* 3, 585–590.
- [14] Heggemann C., Budke C., Schomburg B., Majer Z., Wißbrock M., Koop T., Sewald N. (2009) Antifreeze glycopeptide analogues: microwave-enhanced synthesis and functional studies, *Amino Acids* 38, 213–222.

- [15] Iumi R., Matsushita T., Fujitani N., Naruchi K., Shimizu H., Tsuda S., Hinou H., Nishimura S.-I. (2013) Microwave-Assisted Solid-Phase Synthesis of Antifreeze Glycopeptides, *Chem. Eur. J.* 19, 3913–3920.
- [16] Wilkinson B.L., Stone R.S., Capicciotti C.J., Thaysen-Andersen M., Matthews J.M., Packer N.H., Ben R.N., Payne R.J. (2012) Total Synthesis of Homogeneous Antifreeze Glycopeptides and Glycoproteins, *Angew. Chem. Intern. Ed.* 51, 3606–3610.
- [17] Corcilus L., Santhakumar G., Stone R.S., Capicciotti C.J., Joseph S., Matthews J.M., Ben R.N., Payne R.J. (2013) Synthesis of peptides and glycopeptides with polyproline II helical topology as potential antifreeze molecules, *Bioorg. & Med. Chem.* 21, 3569–3581.
- [18] Miller N., Williams G.M., Brimble M.A. (2009) Synthesis of fish antifreeze neoglycopeptides using microwave-assisted “click chemistry”, *Org. Lett.* 11, 2409–2412.

BADANIA STRUKTURALNE POLISACHARYDÓW WYIZOLOWANYCH Z GRZYBÓW WIELKOOWOCNIKOWYCH (*BASIDIOMYCETES*)^{*}

MATEUSZ PALLACH¹, NATALIA NOWACKA²,
MAŁGORZATA CZERWICKA¹, KAROLINA OSSOWSKA¹,
SYLWIA SZULTA¹, RENATA NOWAK², ZBIGNIEW KACZYŃSKI¹

¹ Pracownia Biochemii Strukturalnej, Wydział Chemii, Uniwersytet Gdański
ul. Wita Stwosza 63, 80-308 Gdańsk

² Katedra i Zakład Botaniki Farmaceutycznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie
ul. W. Chodźki 1, 20-093 Lublin
e-mail: mateusz.pallach@phdstud.ug.edu.pl

Hasła do zapamiętania: polisacharydy grzybowe, β -glukany, *Basidiomycetes*

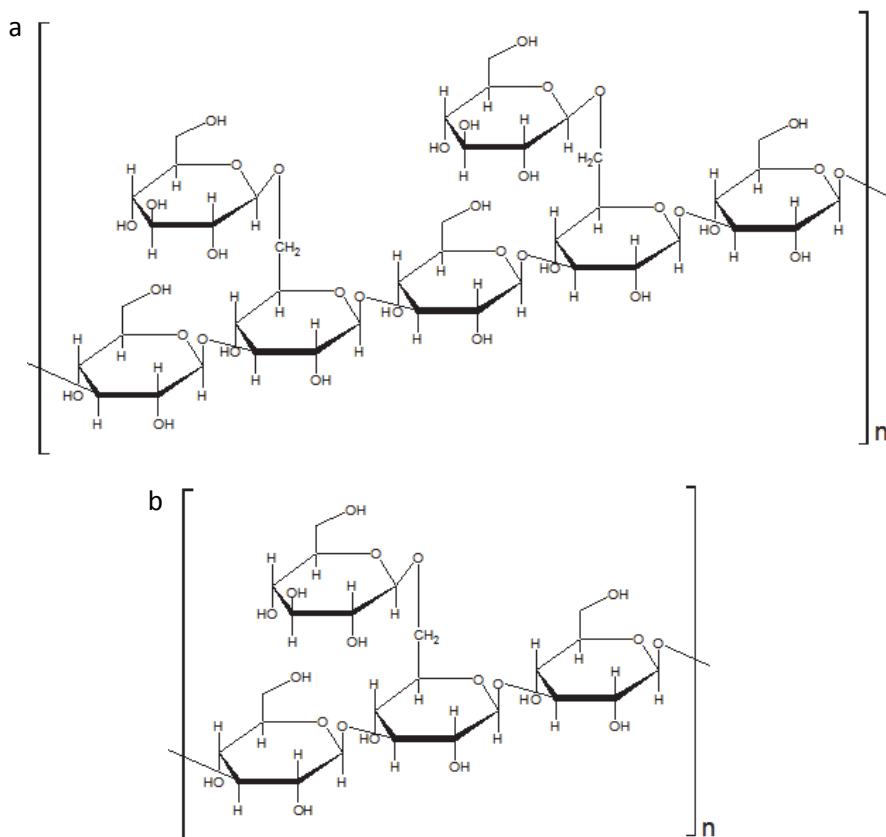
Wykaz skrótów:

- BRM – modyfikatory odpowiedzi biologicznej
(*biological response modifiers*)
- GC – chromatografia gazowa (*gas chromatography*)
- GC-MS – chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas
(*gas chromatography – mass spectrometry*)
- NMR – spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego
(*nuclear magnetic resonance*)

* Badania sfinansowane z projektu w ramach Badań Naukowych Służących Rozwojowi Młodych Naukowców oraz Uczestników Studiów Doktoranckich w 2015 roku, nr 538-8455-B702-14/15.

1. Wstęp

Prozdrowotne właściwości grzybów są znane ludzkości od wielu lat. W krajach Dalekiego Wschodu już przed wiekami stosowano rozpuszczone w wodzie ekstrakty takich gatunków grzybów, jak twardnik japoński (Shiitake) (*Lentinus edodes*), lakownica żółtawa (*Ganoderma lucidum*) czy grzyby chaga (*Inonotus obliquus*) [1]. Pomimo zastosowań w medycynie ludowej grzyby, a właściwie ich właściwości, stały się obiektem badań dopiero w drugiej połowie XX w. [2]. Obecnie znana jest aktywność biologiczna wielu gatunków spośród tej grupy grzybów. Wykazano, że odpowiedzialne za te właściwości są m.in. niektóre polisacharydy w nich występujące. Związki te zalicza się do grupy BRM (*biological response modifiers*), czyli modyfikatorów odpowiedzi biologicznej. Są to związki wykazujące możliwość aktywowania niespecyficznych reakcji sys-



Rys. 1. Wzory strukturalne lentinanu (a) oraz schizofylyanu (b)

temu odpornościowego przeciw komórkom nowotworowym oraz infekcjom wirusowym i bakteryjnym. Mogą one indukować syntezę hormonów i komórek układu odpornościowego [3]. To właśnie dzięki swoim właściwościom immunostymulującym oraz przeciwnowotworowym polisacharydy zyskały obecnie zainteresowanie badaczy na całym świecie. Pierwszy raz dowiedziano ich aktywności przeciwko komórkom nowotworowym mięsaka u myszy w latach 50. ubiegłego wieku [2, 4]. Kolejne badania wykazały ich aktywność w stosunku do wielu innych nowotworów, m.in. czerniaka złośliwego [5], raka płuc [6], piersi [7], prostaty [7–9] czy szyjki macicy [10].

Najlepiej poznaną grupą biologicznie aktywnych polisacharydów w materiale grzybowym są β -glukany, czyli takie polisacharydy, które składają się z połączonych z sobą jednostek β -glukozy. Do tej grupy należą stosowane komercyjnie polimery, takie jak lentinan (rys. 1a) czy schizofylian (rys. 1b), izolowane odpowiednio z grzyba *Lentinus edodes* oraz *Schizophyllum commune* [3].

2. Struktury biologicznie czynnych polisacharydów grzybowych

Wykazano, iż właściwości biologiczne polisacharydów są ściśle związane ze strukturą chemiczną (liczba i rodzaj reszt cukrowych oraz sposób ich powiązania, długość łańcuchów bocznych, struktura trzeciorzędowa czy rozpuszczalność) [2]. Zauważalny jest wzrost efektu biologicznego wraz ze zwiększeniem masy cząsteczkowej związku [3]. Niemniej jednak wspomniane polisacharydy, lentinan i schizofylian o relatywnie niskiej masie cząsteczkowej (na poziomie 100–200 kDa) wykazują podobne działanie przeciwko mięsakom jak te z wyższą masą cząsteczkową [11].

Polisacharydy grzybowe mogą być homopolimerami (najczęściej glukananami) lub tworzyć różnego rodzaju kopolimery glukozy, galaktozy, mannozy, ksylozy, arabinozy, fukozy, rybozy czy kwasu glukuronowego [2, 3]. Polisacharydy grzybowe niekiedy tworzą również kompleksy z peptydami. Takim przykładem jest krestin izolowany z grzyba *Trametes versicolor* – komercyjnie wykorzystywany środek wspomagający terapię przeciwnowotworową, będący β -glukanem połączonym z peptydem [2].

Aktywność biologiczna zauważana jest dla sacharydów rozpuszczalnych w wodzie. Właściwość ta jest związana ze stopniem rozgałęzienia polisacharydu. Dla polimerów o wysokim stopniu rozgałęzienia zauważane jest zmniejszenie efektów biologicznych [3].

Zauważalne jest również występowanie większego efektu biologicznego w wypadku polisacharydów wykazujących konformację helikalną, potwierdzoną m.in. dla polisacharydów, w których łańcuch składa się z jednostek połączonych wiązaniami 1 → 3 β-glikozydowymi [2].

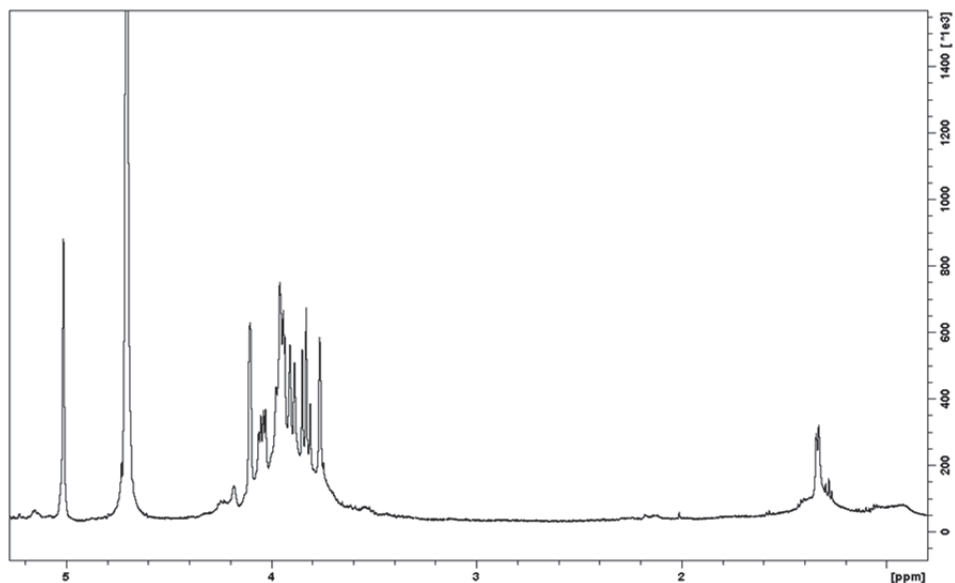
3. Metodyka badań

Grzyby, będące materiałem do badań, zostały poddane ekstrakcji w celu izolacji rozpuszczalnej w wodzie frakcji polisacharydowej. Otrzymane próbki zostały rozdzielone w wyniku sączenia molekularnego na złożu Bio-Gel P-100. Wyodrębnione frakcje monitorowano za pomocą ^1H NMR. Dla frakcji zawierających sygnały wskazujące na występowanie w niej polisacharydów zarejestrowano widma 2D ^1H NMR.

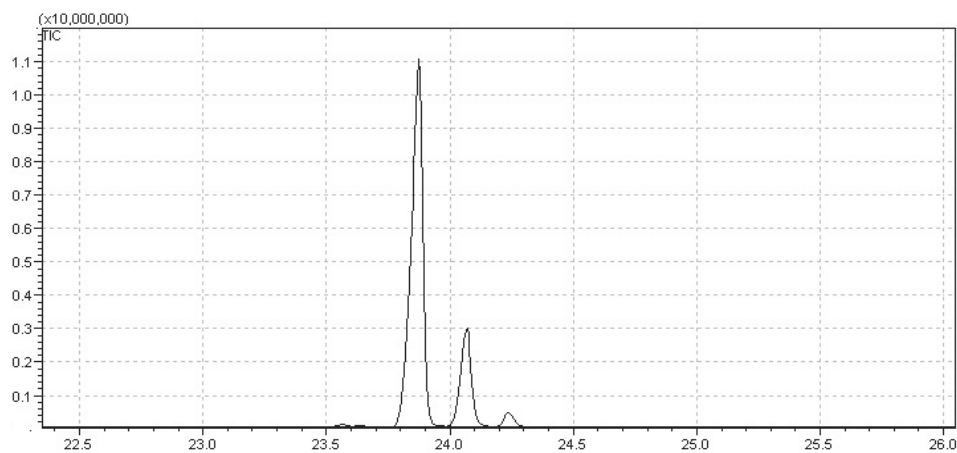
Po zarejestrowaniu zestawu widm przeprowadzono tzw. analizę cukrową, mającą na celu zidentyfikowanie monosacharydów wchodzących w skład badanego polisacharydu. Aby tego dokonać, wyizolowany polisacharyd został poddany hydrolizie w środowisku kwasu trifluorooctowego, następnie przeprowadzono redukcję produktów do alditoli za pomocą tetrahydroboranu sodu (NaBH_4), po czym powstałe alditole poddano acetylacji z bezwodnikiem octowym. Powstałe pochodne analizowano, wykorzystując chromatografię gazową sprzężoną ze spektrometrem mas. Do badań zastosowano zestaw Shimadzu GC-MS QP2010SE wyposażony w kolumnę Restek Rtx-5MS (30 m; 0,25 mm; 0,25 μm). Temperatura kolumny na początku analizy wynosiła 120°C, narost 2°C/min do 260°C z izotermą 20 min. Jako gaz nośny użyty został hel. Zastosowano jonizację strumieniem elektronów o energii 70 eV. Temperatura źródła jonów wynosiła 220°C. Rejestrowany zakres mas to 30–650 m/z.

4. Wyniki i dyskusja

Dla wyizolowanej frakcji polisacharydowej zarejestrowane zostało widmo ^1H NMR (rys. 2). Sygnały z zakresu 3,6–4,2 ppm są charakterystycznymi sygnałami protonów związanych z atomami węgla pierścienia cukrowego. Na widmie widoczny jest jeden wyraźny sygnał o przesunięciu chemicznym ~ 5,0 ppm. Jest to zakres charakterystyczny dla atomów wodoru związanych z anomerycznym atomem węgla. Występowanie jednego sygnału w tym zakresie świadczy, że jednostka powtarzalna analizowanego polisacharydu zbudowana jest najprawdopodobniej tylko z jed-



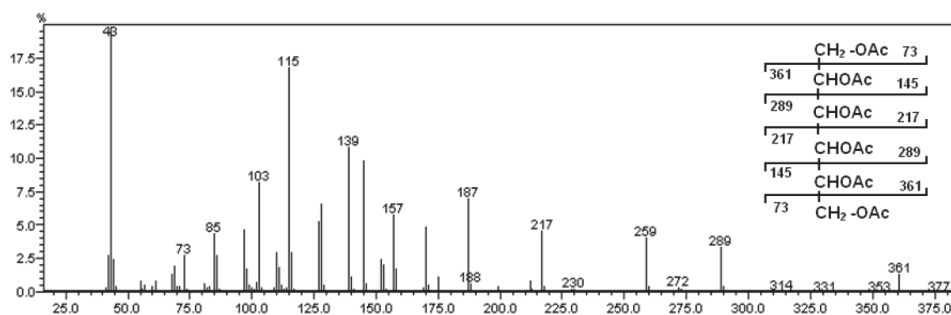
Rys. 2. Widmo 1H NMR frakcji polisacharydowej



Rys. 3. Fragment chromatogramu analizy acetylowych pochodnych produktów hydrolizy polisacharydu

nej reszty cukrowej. Z kolei przesunięcie $\sim 5,0$ ppm sugeruje konfigurację anomeryczną a tej reszty cukrowej.

W celu ustalenia składu cukrowego jednostki powtarzalnej wykonano analizę GC-MS pochodnych acetylowych produktów hydrolizy polisacharydu. Otrzymano chromatogram, w którym dominuje jeden sygnał (rys. 3). Dla dominującego sygnału uzyskano widmo mas przedstawione na rysunku 4.

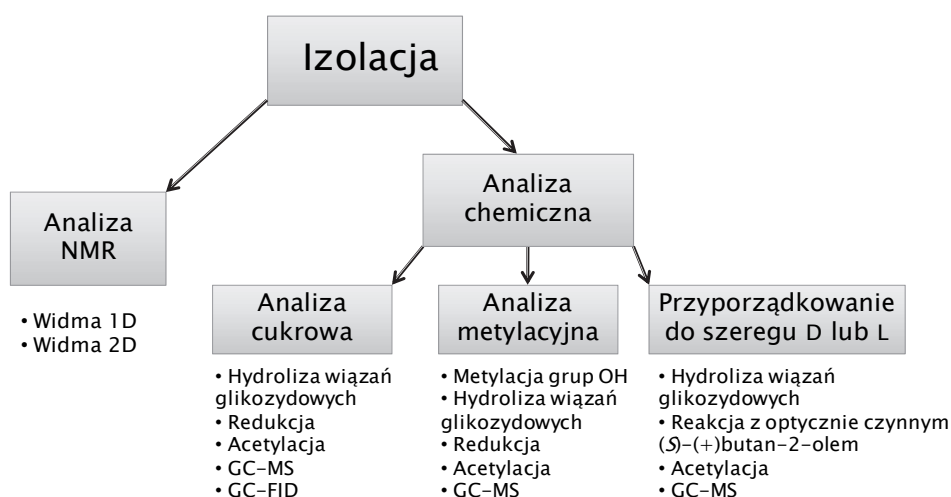


Rys. 4. Widmo mas 1,2,3,4,5,6-heksa-*O*-acetyl-heksitolu

Otrzymane widmo mas wskazuje jednoznacznie, iż badana pochodna to 1,2,3,4,5,6-heksa-*O*-acetyl-heksitol. Oznacza to, że badana jednostka cukrowa jest heksozą. Aby dokładniej ustalić rodzaj monosacharydu, konieczne będzie wykonanie analizy GC z acetylowymi pochodnymi heksoz jako wzorcami.

5. Perspektywy

Niezbędne są dalsze badania w celu określenia pełnej struktury analizowanego polisacharydu. Planowane jest wykonanie analizy metylacyjnej, analiza widm dwuwymiarowych NMR, przyporządkowanie reszt



Rys. 5. Schemat analizy polisacharydów

heksozy do szeregu konfiguracyjnego D lub L oraz oszacowanie masy cząsteczkowej analizowanego polisacharydu. Równolegle do badań strukturalnych prowadzone są testy, mające na celu wykazanie aktywności biologicznej frakcji polisacharydowej wyizolowanej z badanego grzyba. W dalszej perspektywie planowane jest określenie struktury chemicznej polisacharydów wyizolowanych z innych gatunków grzybów z gromady *Basidiomycetes* (rys. 5).

Literatura

- [1] Wasser S.P. (2002) Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides, *Appl. Microbiol. Biot.* 60, 258–274.
- [2] Zhang M., Cui S.W., Cheung P.C.K., Wang Q. (2007) Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and anti-tumor activity, *Trends. Food. Sci. Tech.* 18, 4–19.
- [3] Giavasis I. (2014) Bioactive fungal polysaccharides as potential functional ingredients in food and nutraceuticals, *Curr. Opin. Biotech.* 26, 162–173.
- [4] Lucas E.H. (1957). Tumor inhibition in *Boletus edulis* and other Holobasidiomycetes, *J. Antimicrob. Chemother.* 7, 1–15.
- [5] Shantsyan M., Konusova V., Maksimova Y., Goloshchev A., Panchenko A., Simbirtsev A., Petrishchev N., Denisova N. (2004) Immunomodulating and anti-tumor action of extracts of several mushrooms, *J. Biotech.* 113, 77–83.
- [6] Sang E.P., Hwa S.Y., Cheng-Yun J., Sang H.H., Yeon-Weol L., Byung W.K., Shin H.L., Wun-Jae K., Chong K.C., Yung H.C. (2009) Induction of apoptosis and inhibition of telomerase activity in human lung carcinoma cells by the water extract of *Cordyceps militaris*, *Food Chem. Toxicol.* 47, 1667–1675.
- [7] Silva D., Labarrere C., Slivova V., Sedlak M., Lloyd Jr. F.P., Ho N.W.Y. (2002) *Ganoderma lucidum* suppresses motility of highly invasive breast and prostate cancer cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 298, 603–612.
- [8] Stanley G., Harvey K., Slivova V., Jiang J., Sliva D. (2005) *Ganoderma lucidum* suppresses angiogenesis through the inhibition of secretion of VEGF and TGF- β 1 from prostate cancer cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 330, 46–52.
- [9] Yu C.-H., Kan S.-F., Shu C.-H., Lu T.-J., Sun-Hwang L., Wang P.S. (2009) Inhibitory mechanisms of *Agaricus blazei* Murillon the growth of prostate cancer in vitro and in vivo, *J. Nutr. Biochem.* 20, 753–764.
- [10] Cao W., Li X.-Q., Wang X., Fan H.-T., Zhang X.-N., Hou Y., Liu S.-B., Mei Q.-B. (2010) A novel polysaccharide, isolated from *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels induces the apoptosis of cervical cancer HeLa cells through an intrinsic apoptotic pathway, *Phytomedicine* 17, 598–605.
- [11] Ren L., Perera C., Hemar Y. (2012) Antitumor activity of mushroom polysaccharides: a review, *Food Funct.* 3, 1118–1130.

WPŁYW GRELINY NA DYSFUNKCJĘ ŚRÓDBŁONKA NACZYNIOWEGO WYWOŁANĄ PRZEZ CUKRZYCĘ

DAKMARA LUBOWIECKA¹, KAROLINA NISKA²,
EWELINA ZIELIŃSKA², URSZULA POPOWSKA²,
IWONA INKIELEWICZ-STĘPNIAK², ZBIGNIEW ŚLEDZINSKI¹,
MICHAŁ WOŹNIAK²

¹ Katedra i Klinika Chirurgii Ogólnej, Endokrynologicznej i Transplantacyjnej,
Gdański Uniwersytet Medyczny

ul. Smoluchowskiego 17, 80-211 Gdańsk

² Katedra i Zakład Chemii Medycznej, Gdański Uniwersytet Medyczny

ul. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk

e-mail: d.lubowiecka@gumed.edu.pl

Hasła do zapamiętania: grelina, cukrzyca, dysfunkcja śródbłonna naczyniowego

Wykaz skrótów:

AGEs – końcowe produkty glikacji białek

RFT – reaktywne formy tlenu

1. Wstęp

Cukrzyca jest szeroko rozpowszechnioną chorobą cywilizacyjną, którą cechuje podwyższony poziom cukru we krwi. Brak odpowiedniej diagnozy lub skutecznego leczenia jest przyczyną przedwczesnego inwalidztwa i zwiększonej umieralności. Długotrwała hiperglikemia jest uważana za jedną z głównych przyczyn chorób sercowo-naczyniowych [1, 2]. Powoduje ona nasilenie stresu oksydacyjnego, co prowadzi do dysfunkcji śródbłonna i przyspieszenia rozwoju miażdżycy. Pacjenci cierpiący na

cukrzycę są szczególnie narażeni na powikłania związane z funkcjonowaniem układu krążenia a dysfunkcja śródbłonka naczyniowego przez wielu uważana jest za pierwsze stadium rozwoju chorób naczyniowych [3, 4].

Mimo że dokładny mechanizm powikłań sercowo-naczyniowych wywołanych cukrzycą wciąż pozostaje nieznanym, doniesienia naukowe sugerują kilka istotnych przyczyn tych komplikacji, m.in. hiperglikemia oraz wzrost stężenia reaktywnych form tlenu (RFT) prowadzących do apoptozy komórek śródbłonka naczyniowego [5].

Grelina jest endogennym ligandem receptora uwalniającego hormon wzrostu (GHS-R), który działa poprzez swoiste receptory znajdujące się m.in. w: podwzgórzu, przysadce mózgowej, trzustce, nerkach, mięśni sercowym czy naczyniach krwionośnych [6, 7]. Grelina, działając zarówno endokrynnie, jak i parakrynnie, wykazuje wielokierunkową aktywność. Obecnie wiadomo, że stymuluje ona m.in. wydzielanie prolaktyny, adrenokortykotropiny, hormonu luteinizującego, wpływa na procesy steroidogenezy i na metabolizm węglowodanów. Grelina, wykazując działanie wazodylatacyjne, wpływa na czynność zewnątrz- i wewnątrzwydzielniczą trzustki oraz na układ sercowo-naczyniowy.

Liczne badania naukowe sugerują udział tego hormonu w hamowaniu apoptozy komórek śródbłonka naczyniowego, będącej przyczyną powikłań naczyniowych wywołanych hiperglikemią. Dowiedziono, iż grelina chroni komórki śródbłonka naczyniowego przed wpływem metabolitów glukozy, takich jak końcowe produkty glikacji białek (AGEs) oraz znacząco obniża stężenie wolnych rodników tlenowych wywołujących stres oksydacyjny [8]. Ponadto działa antyapoptotycznie w komórkach traktowanych wysokimi stężeniami glukozy, aktywując sygnał zewnątrzkomórkowy regulowany poprzez ERK 1/2 oraz PI3K-AKT. W świetle tych doniesień działanie greliny uwalnia nowe możliwości w leczeniu cukrzycy [9].

2. Grelina – powstawanie i budowa

Grelina została odkryta w roku 1999 r. jako endogenne ligand receptora hormonu uwalniającego hormon wzrostu (GHS-R). Jest to hormon peptydowy zbudowany z 28 aminokwasów i powstaje z 117-aminokwasowego prekursora – preprogrelin kodowanego przez gen *ghrl* [10, 11]. Gen ten znajduje się na chromosomie trzecim w rejonie 3p25-26. Proteoliza progreliny prowadzi do powstania 94-aminokwasowej progreliny, która jest modyfikowana przez O-acetylotransferazę greliny (GOAT), w wyniku czego do seryny-3 łańcucha peptydowego zostaje przyłączona grupa oktanylowa. Następnie dochodzi do enzymatycznego cięcia poprzez

proteazę PC1/3 w pozycji Arg²⁸/Ala²⁹ i tym samym powstania biologicznie aktywnej cząsteczki greliny [12, 13]. Wyróżnia się dwie postaci molekularne greliny: acylowaną (z grupą oktanylową przyłączoną do seryny w pozycji trzeciej łańcucha peptydowego) oraz grelinę desacylowaną. Zarówno jedna, jak i druga izoforma jest biologicznie aktywna [14].

Postać acylowana uwalniana jest głównie przez enterodenokrynne komórki okładzinowe w żołądku, a także m.in. z jelit, podwzgórza czy przysadki mózgowej. Grelina acylowana powoduje zwiększanie wydzielania kwasu solnego w żołądku oraz uwalnianie gastryny, reguluje także perystaltykę jelit [15]. Ponadto, jest odpowiedzialna za indukcję uwalniania hormonu wzrostu, homeostazę energetyczną poprzez pobudzenie apetytu czy regulację wydzielania insuliny przez komórki trzustki [16]. Zawiera n-oktaacylową modyfikację na serynie w pozycji trzeciej, która jest istotna dla wywołanej greliną stymulacji uwalniania GH, natomiast des-acylowana grelina w formie des-n-oktaacylowanej jest nieaktywna biologicznie.

Badania na szczurach dowiodły, iż desacylowana grelina *in vivo* pobudza adipogenezę bezpośrednio w szpiku kostnym, może wywoływać ujemny bilans energetyczny oraz redukcję masy ciała poprzez ograniczenie apetytu.

Udowodniono, iż obie izoformy są biologicznie aktywne w sposób podobny, jak również niezależny od GHS-R1a. Działają cytoprotekcyjnie na kardiomiocyty oraz komórki endotelium, hamują proliferację komórek raka piersi oraz prostaty [17]. Oprócz tego uczestniczą w homeostazie glukozy i wpływają na wydzielanie insuliny w komórkach trzustki, a podanie obu poznanych postaci greliny skutkuje wzrostem stężenia glukozy i wydzielanie insuliny zostaje znacząco zahamowany [18].

3. Funkcje greliny

Wydzielanie greliny następuje w głównej mierze z komórek okładzinowych trzonu i dna żołądka, a stamtąd jest ona uwalniana do krwiobiegu. Oprócz tego jest też w niewielkiej ilości uwalniana przez: przysadkę mózgową, jelita, komórki układu odpornościowego, płuca, nerki, gonady, łożysko, korę nadnerczy, trzustkę i kardiomiocyty. Miejscem występowania greliny i jej receptorów są hepatocyty, komórki Leydiga, limfocyty T i B oraz neutrofile. Ponadto, jej występowanie stwierdzono w trzustce, w komórkach C tarczycy, w komórkach cytotrofoblastu łożyska ludzkiego w pierwszym trymestrze ciąży oraz w komórkach nowo-

tworowych W surowicy dorosłego człowieka znajduje się 100–120 fmol/ml greliny. Na jej stężenie we krwi wpływ ma wiele czynników, takich jak: styl życia, stanu odżywienia, stan chorobowy, aktywność fizyczna czy nawet ilość zażywanego snu [19, 20].

Hormon ten jest istotnym regulatorem gospodarki energetycznej organizmu, a prowadzone od lat badania dowodzą kolejnych jego funkcji pełnionych w organizmie. Grelina uczestniczy w licznych procesach biologicznych, wpływając na prawidłowe funkcjonowanie układu pokarmowego, endokrynologicznego, immunologicznego, krwionośnego czy nerwowego. Ma także wpływ na procesy wzrastania i dojrzewania komórek. Uczestniczy w procesie zapamiętywania, trawienia, w kontroli równowagi energetycznej oraz w utrzymaniu prawidłowego stanu fizjologicznego snu i czuwania.

Grelina jest znana badaczom przede wszystkim jako czynnik regulujący łaknienie i regulator gospodarki energetycznej organizmu. Dowiedziono, iż wraz z innymi peptydami reguluje przyjmowanie pokarmów, inicjuje przyjmowanie posiłków, a także oszczędzanie nagromadzonej tkanki tłuszczowej [21]. Głód powoduje podwyższenie stężenia greliny, jej wysoką zawartość stwierdzono u osób chorych na anoreksję, bulimię czy choroby nowotworowe [22]. Oprócz tego stwierdzono wpływ greliny na tzw. ośrodek nagrody w mózgu – tym samym powodując dobre skojarzenie ze spożywanym pokarmem i znaczną poprawę nastroju. Dzieje się tak, ponieważ stymuluje ona wydzielanie kannabinoidów – grupy związków oddziałujących na receptory kannabinoidowe [22]. Grelina jest także odpowiedzialna za zwiększenie ilości wydzielanego w żołądku kwasu solnego, uwalnianie gastryny czy regulację perystaltyki jelit. Uczestniczy w metabolizmie kości, działając bezpośrednio na chondrocyty, indukując tym samym wydzielanie cAMP, a to skutkuje zwiększoną produkcją proteoglikanów i kwasu hialuronowego, jak również hamuje absorpcję kwasów tłuszczowych przez komórki chrzęstne. Kwasy tłuszczowe będące prekursorami eikozanoidów uczestniczą w powstawaniu stanów zapalnych. Grelina działając poprzez GSH-R w limfocytach T i monocytach, hamuje ekspresję cytokin prozapalnych: IL-1 β , IL6, TNF- α . Z tego powodu grelina zdaje się obiecującym lekiem o działaniu przeciwzapalnym w leczeniu reumatoidalnego zapalenia stawów i artretyzmu [23].

Dowiedziono również, iż grelina poprawia wydolność mięśnia sercowego poprzez wzrost stężenia hormonu wzrostu stymulującego wydzielanie insulinopodobnego czynnika wzrostu IGF-1, co skutkuje zwiększeniem frakcji wyrzutowej serca. Oprócz tego reguluje napięcie naczyń krwionośnych i ciśnienie tętnicze krwi oraz hamuje agregację płytek krwi

i leukocytów. Jej obecność została także stwierdzona w tkankach zmienionych nowotworowo, takich jak guzy neuroendokrynne, gruczolak przysadki czy w guzach płuc.

4. Stres oksydacyjny w patogenezie cukrzycy

Reaktywne formy tlenu (RFT) będące produktem przemian tlenu stanowią normalne produkty metabolizmu komórek. Ich obecność jest niezbędna do prawidłowego funkcjonowania organizmu [24]. Każdy żywy organizm dąży do utrzymywania redukcyjnego potencjału wewnątrzkomórkowego, jednak szybkość powstawania RFT powinna pozostać w równowadze z ich neutralizowaniem przez antyoksydanty. Zaburzenia w prawidłowym stanie redukcji mogą wywołać toksyczne działanie poprzez produkcję nadtlenu i wolnych rodników, powodujących oksydacyjne uszkodzenia wszystkich składników komórki, a szczególnie dotkliwe są uszkodzenia białek, lipidów i DNA [25].

Oprócz takich czynników, jak nadciśnienie tętnicze, otyłość czy hiperlipidemia stres oksydacyjny odgrywa kluczową rolę w rozwoju wielokierunkowych powikłań cukrzycowych, a w szczególności zaburzeń naczyniowych. Hiperглиkemia nasila produkcję wolnych rodników, zwłaszcza anionu ponadtlenkowego, w obrębie mitochondriów. Konsekwencją jest hamowanie aktywności dehydrogenazy gliceraldehydo-3-fosforanu (GAPDH) i dalsza kumulacja produktów pośrednich glikolizy. Anion ponadtlenkowy, reagując z NO, prowadzi do powstania nadtlenuazotynu (OONO⁻), związku toksycznego dla naczyń. Transport glukozy do endotelium i komórek mięśniówki gładkiej zachodzi na drodze dyfuzji i jest procesem zależnym od stężenia insuliny. Zatem wzrostowi stężenia glukozy we krwi towarzyszy wzrost stężenia jej metabolitów. Przewlekła hiperглиkemia w wyniku takich procesów, jak: autooksydacja glukozy, aktywacja przemian szlaku polioloowego i sorbitolu, nieenzymatyczna glikacja, stymulacja granulocytów obojętnochłonnych, indukuje wytwarzanie reaktywnych form tlenu. Podczas hiperглиkemii generowana jest nieproporcjonalnie duża ilość wolnych rodników poprzez utlenianie glukozy i nieenzymatycznej glikacji białek – grupa aldehydowa reagując z grupą aminową białka, tworzy pośrednio zasadę Shiffa, następnie Amadoriego i silnie stabilny kompleks Miliarda, który jest końcowym produktem glikacji białek (AGEs). Produkty glikacji białek ulegają utlenianiu i w konsekwencji stają się źródłem RFT [26].

5. Grelina a powikłania naczyniowe

Udowodniono, iż dysfunkcja śródbłonna naczyniowego jest jedną z głównych przyczyn powikłań cukrzycowych, dlatego pacjenci cierpiący na cukrzycę są narażeni w sposób szczególny na zawał mięśnia sercowego czy udar. AGEs zdają się odgrywać kluczową rolę w patogenezie tego procesu – ich długotrwałe podwyższone stężenie indukuje apoptozę w komórkach śródbłonna naczyniowego. Końcowe produkty glikacji (AGEs) są związkami, które powstają w wyniku nieenzymatycznej reakcji między grupą aldehydową glukozy a resztami aminowymi aminokwasów łańcuchów białkowych i lipidami (glikacja). Reagując ze swoistym receptorem na komórkach śródbłonna, komórkach mięśni gładkich i makrofagów, pobudzają proliferację komórek śródbłonna naczyń, zwiększa się ich przepuszczalność i aktywność prozakrzepową. AGEs powodują peroksydację lipidów – takie utlenione formy lipidów bezpośrednio uszkodzają śródbłonek, odkładając się w ścianie naczyń.

Komórki śródbłonna, traktowane uprzednio przez 48 h za pomocą AGEs, wchodzi na szlak apoptotyczny, jednakże wcześniejsza ich stymulacja za pomocą greliny skutecznie hamuje ten proces. Badania przeprowadzone przez Xiang i współpracowników dowiodły, iż komórki śródbłonna, traktowane wcześniej greliną, wykazały zdecydowany spadek komórek apoptotycznych w warunkach podwyższonej glukozy w stosunku do kontroli. Oprócz tego grelina działała hamująco na stężenie kaspazy 3 będącej elementem apoptotycznego szlaku sygnalizacyjnego. Zatrzymanie kaspazy następuje na drodze aktywacji szlaku sygnalizacyjnego ERK1/2 i PI3K. Udowodniono także, że wysokie stężenie glukozy jest przyczyną wzrostu wewnątrzkomórkowej produkcji RFT, a grelina skutecznie hamuje ten proces [27].

Z kolei w badaniach na szczurach indukowana acetylocholiną wazorelaksacja śródbłonna aorty została osłabiona przez niedobór hormonu wzrostu, a następnie podjęto próbę leczenia za pomocą greliny. Badania wykazały, iż grelina skutecznie indukuje wzrost poziomu syntazy tlenku azotu (NOS) w komórkach śródbłonna, przeciwdziałając dysfunkcji śródbłonna naczyniowego [28–31].

6. Perspektywy

Prawidłowe funkcjonowanie śródbłonna jest gwarancją homeostazy naczyń krwionośnych. Jego dysfunkcja w następstwie aktywacji sygnalizacyjnych szlaków apoptotycznych może prowadzić do bardzo po-

ważnych powikłań naczyniowych. W przypadku, gdy towarzyszy jej hiperglikemia, rozwijający się stres oksydacyjny uruchamia kolejne szlaki aktywujące kinazę białkową C czy procesy nieenzymatycznej glikacji, które doprowadzają do rozwoju zmian naczyniowych. Poznanie podłoża tych procesów jest niezbędne do wdrożenia terapii, które umożliwią zatrzymanie postępu niekorzystnych zmian. U osób chorych na cukrzycę ryzyko takich powikłań jest bardzo duże, a wciąż niezbadany został w pełni mechanizm ich patogenezy.

W świetle przedstawionych doniesień naukowych cząsteczka greliny zdaje się nie tylko hormonem peptydowym odpowiedzialnym za przeciwdziałanie stanom zapalnym, indukcję wydzielania hormonu wzrostu czy homeostazę energetyczną. Jej zdolność do hamowania procesu tworzenia się wolnych rodników oraz apoptozy spowodowanej hiperglikemią jest obiecująca w kontekście leczenia powikłań cukrzycowych wywołanych dysfunkcją śródbłonna naczyniowego. Dokładnie zbadanie mechanizmu działania greliny w prewencji uszkodzeń naczyniowych może otworzyć nowe możliwości w ich leczeniu.

Literatura

- [1] Brunner H., Cockcroft J.R., Deanfield J. (2005) Endothelial function and dysfunction. Part II: Association with cardiovascular risk factors and diseases: a statement by the Working Group on Endothelins and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension, *J. Hypertens* 23, 233–246.
- [2] Versari D., Daghini E., Virdis A., Ghiadoni L., Taddei S. (2009) Endothelial Dysfunction as a Target for Prevention of Cardiovascular Disease, *Diabetes Care* 32, 314–321.
- [3] Sank A., Wei D., Reid J., Ertl D., Nimni M., Weaver F. (1994) Human endothelial cells are defective in diabetic vascular disease, *J. Surg. Res.* 57, 647–653.
- [4] Simonescu M. (2007) Implications of early structural-functional changes in the endothelium for vascular disease, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27, 266–274.
- [5] Sheu M.L., Ho F.M., Yang R.S., Chao K.F. (2005), High glucose induced human endothelial cell apoptosis through a phosphoinositidine 3-kinase-regulated cyclooxygenase-2 pathway, *Arterioscler., Thomb. Vasc. Biol.* 25, 539–545.
- [6] Kojima M., Hosoda H., Date M., Nakazato H., Matsuo K., Kangawa K. (1999) Ghrelin is a growth-hormone-releasing acetylated peptide from stomach, *Nature* 402, 656–660.
- [7] Korbonsits M., Goldstone A.P., Guerguiev M., Grossman A.B. (2004) Ghrelin – a hormone with multiple functions, *Front Neuroendocrinol.* 25, 27–68.
- [8] Zhao H., Liu G., Wang Q., Ding L., Cai H., Jiang H., Xin Z., (2007) Effect of ghrelin on human endothelial cells apoptosis induced by high glucose, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 362, 677–681.
- [9] Xiang Y., Li Q., Li M., Wang W., Cui C., Zhang J. (2011) Ghrelin inhibits AGEs-induced apoptosis in human endothelial cells involving ERK1/2 and PI3K/Akt pathway, *Cell Biochem Funct* 29, 149–155.

- [10] Castaneda T.R., Tong J., Datta R., Culler M., TSchoep M.H. (2010) Ghrelin in the regulation of bodyweight and metabolism, *Front. Neuroendocrinol.* 31, 44–60.
- [11] Delzenne N., Blundell J., Brouns F., Cunningham K., De Graff K., Erkner A., Lluch A., Mars M., Peters H.P. (2010) Gastrointestinal targets of appetite regulations in humans, *Obes. Rev.* 11, 234–250.
- [12] Kojima M., Kanagawa K. (2010) Ghrelin: more than endogenous growth hormone secretagogue, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1200, 140–148.
- [13] Nikolopoulos D., Theocharis S., Kouraklis G. (2010) Ghrelin: a potential therapeutic target for cancer., *Reg. Pep.* 163, 7–17.
- [14] Adams C.E., Greenway F.L., Brantley P.J. (2011) Lifestyle factors and ghrelin: critical review and implications for weight loss maintenance, *Obes Rev.* 12(5), e211–e218.
- [15] Perboni S., Inui A. (2010) Appetite and gastrointestinal motility: Role of ghrelin-family peptides, *Clin. Nutr.* 29, 227–234.
- [16] Nakazato M., Murakami Y., Date Y., Kojima H., Matsuo K., Kanagawa S., Matsukura S. (2001) A role of ghrelin in the central regulation of feeding, *Nature* 409, 194–198.
- [17] Perboni S., Inui A. (2010) Appetite and gastrointestinal motility: Role of ghrelin-family peptides, *Clin. Nutr.*, 29, 227–234.
- [18] Granata R., Baragli A., Settanni F., Scarlatti F., Ghigo F. (2010) Unraveling the role of ghrelin gene peptides in the endocrine pancreas, *J. Mol. Endocrinol.* 55, 76–79.
- [19] Yang J., Zhao T., Goldstein J.L., Brown M.S. (2008) Inhibition of ghrelin O-acyltransferase (GOAT) by octanoylated pentapeptides, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 22, 10750–10755.
- [20] Toshinai K., Date Y., Murakami N., Shimada M., Mondal M.S., Shimbara T., Guan J.L., Wang Q.P., Funahashi H., Sakurai T., Shioda S., Matsukura T., Kanagawa N., Nakazato M. (2003) Ghrelin-induced food intake mediated via the orexin pathway, *Endocrinology* 144, 1505–1512.
- [21] Zizzari P., Longchamps R., Epelbaum J., Bluet-PAjot M.T. (2007) Obestatin partially affects ghrelin stimulation of food intake and growth hormone secretion in rodents, *Endocrinology* 148, 1648–1653.
- [22] Engeli S., Bohnke J., Feldpaush M., Gorelniak K., Janke J., Batkai S., Pacher P., Harvey-White J., Luft F.C., Sharma A.M., Jordan J. (2005) Activation of the peripheral endocannabinoid system in human obesity, *Diabetes* 54, 2838–2843.
- [23] Nikolopoulos D., Theocharis S., Kouraklis G. (2010) Ghrelin, another factor affecting bone metabolism, *Med. Sci. Monit.* 16, 147–163.
- [24] Fang Y.Z., Yang S., Wu G. (2002) Free radicals, antioxidants, and nutrition, *Nutrition.* 18, 872–879.
- [25] Schafer F.Q., Buettner G.R. (2001) Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple, *Free Radic. Biol. Med.* 1191–1212.
- [26] Maritim A.C., Sanders R.A., Watkins J.B. (2003) Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review, *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 17, 24–38.
- [27] Iantorno M., Chen H., Kim J. (2007) Ghrelin has a novel vascular actions that mimics PI 3-kinase dependent actions of insulin to stimulate production of NO from endothelial cells, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 292, 756–764.
- [28] Pinilla L., Tena-Sempere M., Aguilar E. (1999) Nitric oxide stimulates growth hormone secretion *in vitro* through a calcium- and cyclic guanosine monophosphate-independent mechanism, *Horm. Res.* 51, 242–247.

- [29] Uretsky A.D., Weiss B.L., Yunker W.K., Chang J.P. (2003) Nitric oxide produced by a novel nitric oxide synthase iso- form is necessary for gonadotropin-releasing hormone-induced growth hormone secretion via a cGMP-dependent mechanism, *J. Neuroendocrinol.* 15, 667–676.
- [30] Frohmann L.A., Jansson J.O. (1986) Growth hormone-releasing hormone, *Endocr. Rev.* 7, 223–253.

HYDROŻELE ZAWIERAJĄCE JEDNOSTKI CUKROWE JAKO POTENCJALNE NOŚNIKI LEKÓW

MAŁGORZATA BUREK¹, ILONA WANDZIK¹,
SYLWIA WAŚKIEWICZ²

Wydział Chemiczny, Politechnika Śląska

¹ Katedra Chemii Organicznej, Bioorganicznej i Biotechnologii

ul. B. Krzywoustego 4, 44-100 Gliwice

² Katedra Fizykochemii i Technologii Polimerów

ul. Strzody 9, 44-100 Gliwice

e-mail: malgorzata.burek@polsl.pl

Hasła do zapamiętania: systemy kontrolowanego uwalniania leków, hydrożele

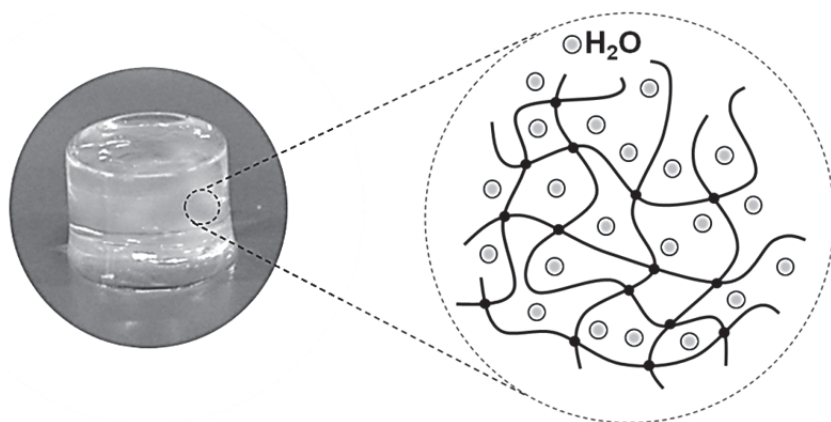
1. Wstęp

Substancje lecznicze wykazują oczekiwaną aktywność farmakologiczną, gdy ich stężenie w osoczu krwi mieści się w określonych granicach, tzw. zakresie terapeutycznym. Gdy jest ono za wysokie i wykracza poza ten zakres, lek może działać toksycznie. Z kolei gdy jest zbyt niskie, lek nie wykazuje efektów terapeutycznych. W przypadku konwencjonalnych postaci leku po ich przyjęciu stężenie substancji aktywnej zwykle gwałtownie wzrasta, osiągając często zakres zbliżony do stężeń toksycznych, a następnie szybko maleje poniżej zakresu stężeń terapeutycznych. Czas efektywnego działania leku jest zatem krótki, a uzyskanie pożądanego efektu terapeutycznego wymaga wielokrotnego dawkowania. Inną wadą tradycyjnych postaci leku jest spadek aktywności biologicznej, spowodowany częściową degradacją substancji aktywnej w wyniku hydrolizy chemicznej lub enzyma-

tycznej. W przypadku leków doustnych często występują także trudności w przenikaniu substancji leczniczych przez grube warstwy śluzu i warstwy nabłonkowe układu pokarmowego. W odpowiedzi na te problemy pojawiła się koncepcja systemów kontrolowanego uwalniania leków [1–3], w których substancja aktywna jest połączona w sposób chemiczny bądź fizyczny z nośnikiem. Podstawową rolą nośnika jest uwalnianie substancji aktywnej według założonego oraz powtarzalnego profilu, co ma na celu zapewnienie odpowiedniej farmakokinetyki leku. W ten sposób leczenie staje się efektywniejsze, a w rezultacie krótsze. Unika się również negatywnych skutków wywołanych fluktuacjami stężenia oraz wielokrotnym przekraczaniem stężenia toksycznego. Dodatkowo, zastosowanie nośnika zabezpiecza lek przed zbyt szybką utratą aktywności biologicznej, przez co możliwa jest redukcja podawanej dawki. Minimalizuje to akumulację leków oraz produktów ich rozkładu w organizmie, co jest szczególnie istotne w leczeniu chorób przewlekłych.

2. Hydrożelowe nośniki leków

Najczęściej badanymi nośnikami substancji leczniczych są polimery [4]. Różnorodność możliwych kombinacji składu oraz topologii: od liniowej poprzez hiperrozgałęzioną i dendrymeryczną do struktur usieciowanych, a także możliwość określonej funkcjonalizacji pozwala na szerokie operowanie ich właściwościami i dostosowanie ich do konkretnego zastosowania. Wśród nich bardzo dużą grupę biomateriałów



Rys. 1. Fotografia oraz schematyczne przedstawienie hydrożelu

proponowanych jako systemy kontrolowanego uwalniania leków stanowią hydrożele [5–7]. Są to chemicznie bądź fizycznie usieciowane materiały polimerowe, których zasadniczą masę stanowi woda zaabsorbowana w porowatej strukturze (rys. 1). W rezultacie mają one właściwości fizyczne bardzo zbliżone do tkanek żywych i zwykle charakteryzują się wysoką biokompatybilnością. Ponadto, w środowisku płynów fizjologicznych ich silnie hydrofilowa powierzchnia charakteryzuje się niską wartością swobodnej energii międzypowierzchniowej, przez co wykazuje małą tendencję do adsorbowania komórek i białek. Dodatkowo delikatna struktura nie powoduje podrażnienia tkanek podczas bezpośredniego kontaktu, a jej porowatość oraz możliwość dostosowywania wielkości porów przez zmianę stopnia usieciowania umożliwia inkluzję w ich wnętrze różnych cząsteczek chemicznych, od małych cząsteczkowych substancji leczniczych do terapeutycznych biomakromolekuł.

2.1. Hydrożele zawierające jednostki cukrowe jako potencjalne nośniki leków

Wbudowanie w strukturę polimerów związków naturalnych mających unikalne właściwości lub pełniących wyspecjalizowane funkcje biologiczne pozwala często na przeniesienie tych właściwości na materiały syntetyczne [8]. Efektywną biofunkcjonalizację przeprowadzono, wykorzystując takie związki, jak: białka, peptydy, kwasy nukleinowe, glikoproteiny czy węglowodany [9, 10]. Liczne badania wykazały wysoką użyteczność takich materiałów w wielu zastosowaniach, m.in. w diagnostyce, inżynierii tkankowej oraz procesach separacyjnych [9–11]. Szeroko badane jest również wykorzystanie ich jako nośników leków [12]. Występowanie specyficznych oddziaływań pomiędzy określonymi biomolekułami, charakterystyczne dla procesów rozpoznawania biologicznego, stwarza ogromne możliwości dla systemów o zlokalizowanym działaniu bądź wykazujących wrażliwość na bodźce biologiczne – uwalniające substancję aktywną w odpowiedzi na obecność określonych biomolekuł. W tym aspekcie szczególnie interesujące są węglowodany, gdyż ich oddziaływania z pewną grupą protein, tzw. lektyn leżą u podłoża wielu procesów biologicznych, takich jak: embriogeneza, obrona immunologiczna, stany zapalne czy przerzuty komórek rakowych [13]. Materiały funkcjonalizowane związkami cukrowymi są również obiecujące jako nośniki, które poza spełnianiem podstawowych funkcji wpływają na efektywność działania

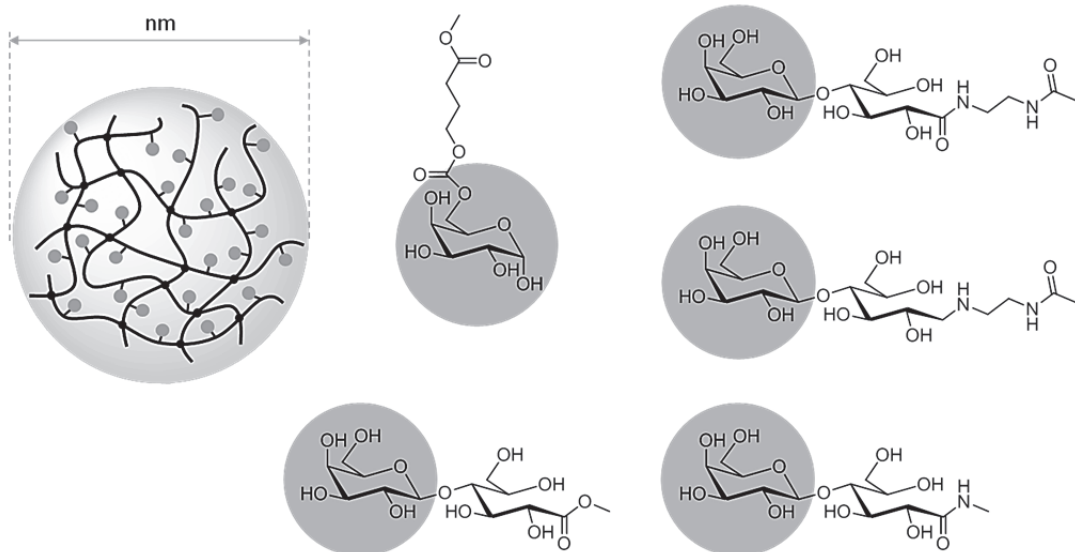
substancji leczniczej. Wiele cukrów oraz ich pochodnych odznacza się unikalnymi właściwościami, co daje możliwość uzyskania układów o rozmaitej bioaktywności. Pomijając wykorzystanie właściwości biologicznych węglowodanów, wbudowywanie ich w sieć polimerową może również zapewnić (bio)degradowalność nośnika. Fragmenty takie mogą ulegać rozpadowi w następstwie hydrolizy enzymatycznej wiązań glikozydowych pomiędzy jednostkami cukrowymi [14] lub hydrolizy chemicznej wiązań, za pomocą których zostały połączone z łańcuchem polimerowym [15]. W wypadku niektórych typów nośników (bio)degradowalność jest wymagana dla umożliwienia usunięcia ich z organizmu po spełnieniu przewidzianej funkcji. Bywa również, że własność ta determinuje szybkość uwalniania substancji aktywnej.

2.1.1. Nośniki hydrożelowe zawierające jednostki galaktozy

Nieselektywne działanie leków i ich aktywność względem zdrowych komórek może wywoływać poważne skutki uboczne. Znamiennym przykładem jest chemioterapia nowotworów wykorzystująca leki cytostatyczne. Ich działanie skierowane jest przeciwko komórkom charakteryzującym się szybkimi podziałami, jakimi są komórki rakowe [16]. Jednakże cytostatyki uszkadzają również zdrowe szybko proliferujące komórki, takie jak: komórki szpiku kostnego, mieszków włosowych czy nabłonka wyściełającego drogi oddechowe oraz przewód pokarmowy. Powoduje to występowanie takich powikłań, jak: anemia, łysienie czy nudności i wymioty. Wiele leków wykazuje ponadto inne działania niepożądane, jak znana z kardiotoksyczności doxorubicyna [17] czy *cis*-platyna powodująca uszkodzenia nerek [18]. Badania dotyczące ograniczenia toksycznego działania cytostatyków koncentrują się głównie na dwóch strategiach: poszukiwaniu nowych, bardziej selektywnych leków lub zapewnieniu selektywności działania leków już znanych przez zastosowanie nośników. Jednym z badanych typów nośników są układy bazujące na procesach rozpoznawania biologicznego, które zawierają molekuly pełniące rolę ligandów kierujących do komórek nowotworowych [19].

Dla ukierunkowania działania leku względem komórek raka wątroby kilka grup badawczych [20–24] zaproponowało nośniki hydrożelowe o wymiarach rzędu nanometrów, funkcjonalizowane różnymi pochodnymi galaktozy (rys. 2).

Wykazano, że takie leki, jak: oridonin [21], doxorubicyna [22, 23] czy arabinofuranozyd jodomycyny [24] immobilizowane w zapropono-



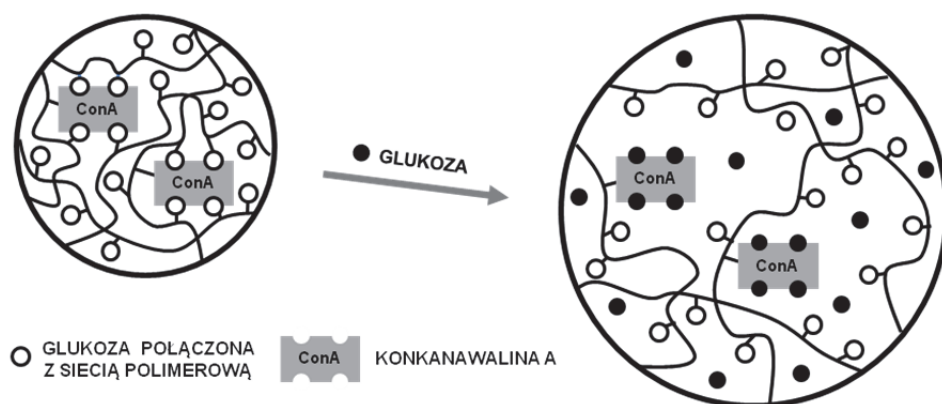
Rys. 2. Nanożel funkcjonalizowany różnymi pochodnymi galaktozy

wanych nośnikach wykazują istotnie większą aktywność przeciwnowotworową w porównaniu do nośników niemodyfikowanych. Co więcej, aktywność ta wzrasta ze wzrostem stopnia funkcjonalizacji [21]. Powierzchnia hepatocytów charakteryzuje się wysoką ekspresją receptorów asialoglikoprotein, selektywnie wiążących cząsteczki zawierające terminalne reszty galaktopiranozyłowe. Wprowadzenie do struktury hydrożelu jednostek zakończonych resztami galaktozy powoduje więc, że są one rozpoznawane przez wspomniane receptory, co z kolei intensyfikuje ich endocytozę i skutkuje podwyższoną wchłanianością [20–24]. Potwierdzają to badania przeprowadzone na komórkach innych niż komórki nowotworu wątroby, w przypadku których efekty te nie są obserwowane [23, 24].

2.1.2. Nośniki hydrożelowe zawierające jednostki glukozy

Dużym wyzwaniem w obszarze kontrolowanego uwalniania leków są nośniki samoregulujące, które dostosowywałyby ilość wydzielanej substancji aktywnej do zapotrzebowania organizmu [25]. Przedmiotem wielu badań są systemy dla diabetyków, uwalniające określoną ilość insuliny w odpowiedzi na wzrost stężenia glukozy we krwi [25, 26]. Stężenie to zmienia się bardzo dynamicznie i poza dietą

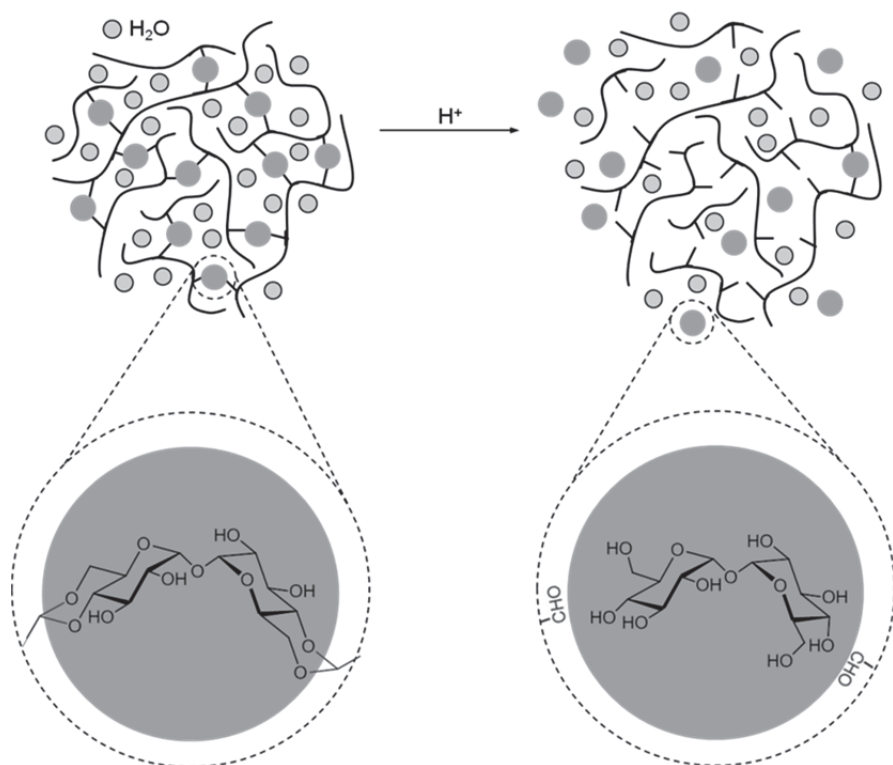
zależy od wielu czynników (np. aktywność fizyczna czy stres). W wypadku tradycyjnej formy leczenia cukrzycy ustalona dawka insuliny może być więc w danej chwili za niska lub zbyt wysoka, co prowadzi do występowania wielu powikłań. Jako potencjalne samoregulujące nośniki insuliny Miyata i współpracownicy zaproponowali hydrożele zawierające kowalencyjnie przyłączoną glukozę oraz wykazującą powinowactwo do reszt glukozytowych lektynę konkanawalinę A [27, 28]. Tworzą one z sobą kompleks, który pełni rolę dodatkowego, odwracalnego czynnika sieciującego. Wykazano jednak, że konkanawalina A chętniej wiąże wolną glukozę niż tę związaną z łańcuchem polimerowym. Dlatego, gdy w roztworze otaczającym nośnik pojawi się glukoza, dochodzi do wymiany w obrębie kompleksu, w konsekwencji czego zmniejsza się usieciowanie sieci polimerowej, a hydrożel pęcznieje (rys. 3). Dochodzi tym samym do zwiększenia wielkości porów, co z kolei przyspiesza dyfuzję do roztworu zawartości nośnika.



Rys. 3. Hydrożel zawierający kowalencyjnie przyłączoną glukozę oraz konkanawalinę A

2.1.3. Nośniki hydrożelowe zawierające jednostki trehalozy

Poza wspomnianą insuliną, białka oraz polipeptydy terapeutyczne są powszechnie stosowane w leczeniu takich chorób, jak reumatyzm, hemofilia czy anemia. Rosnąca jest również ich rola w nowoczesnej terapii przeciwnowotworowej. Niestety, w środowisku płynów ustrojowych ich delikatna struktura jest bardzo podatna na degradację chemiczną i proteolityczną oraz denaturację spowodowaną czynnikami fizycznymi [29]. Poza stosunkowo szybką utratą aktywności bio-



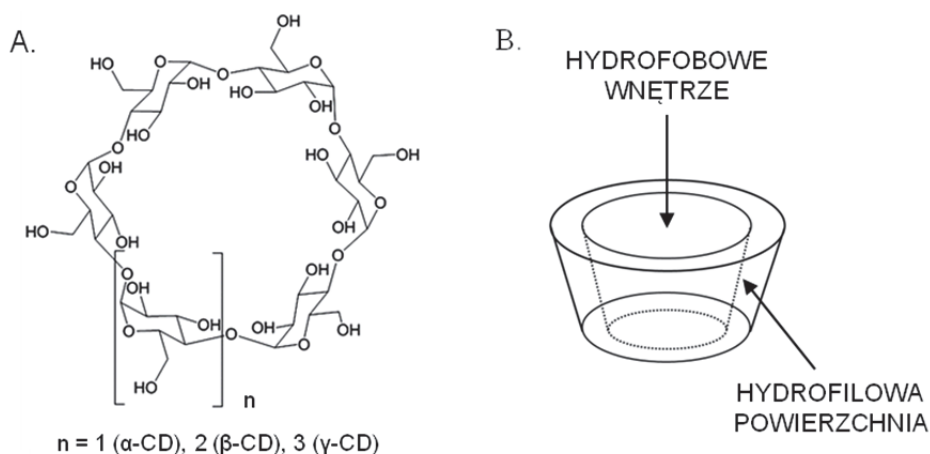
Rys. 4. Hydrożel sieciowany diacetalowymi pochodnymi trehalozy

logicznej dezaktywacja białek egzogennych wywołuje często nasiloną odpowiedź immunologiczną, której działanie może zostać skierowane także na białka endogenne [30]. W organizmach żywych, gdy biomakromolekuły znajdują się w warunkach stresu środowiskowego, syntezowane i kumulowane są związki o właściwościach bioprotekcyjnych. Jednym z takich związków jest trehaloza – naturalny disacharyd, zbudowany z dwóch jednostek glukozy. Dowiedziono, że ma ona zdolność ochrony białek oraz hamuje ich agregację [31]. Biorąc pod uwagę te właściwości, dla poprawy stabilności białek terapeutycznych zaproponowane zostały nośniki hydrożelowe otrzymane z wykorzystaniem jako czynnika sieciującego diacetalowych pochodnych trehalozy (rys. 4) [32].

Wobec wrażliwości ugrupowań acetalowych na hydrolizę kwasową uzyskane materiały ulegają degradacji w środowisku kwaśnym, której towarzyszy uwolnienie cząsteczek trehalozy. Z uwagi na bioprotekcyjne właściwości, oczekuje się, że będzie ona zdolna tworzyć ochronne mikrośrodowisko zapobiegające dezaktywacji uwalnianych równocześnie białek.

2.1.4. Nośniki hydrożelowe zawierające jednostki cyklodekstryn

Jednym z najważniejszych czynników wpływających na biodostępność leku jest jego rozpuszczalność w płynach ustrojowych, do których jest uwalniany. Z tego względu leki hydrofobowe wymagają zastosowania substancji pomocniczych zwiększających ich rozpuszczalność w roztworach wodnych [33]. Ciekawym przykładem takiego dodatku są cyklodekstryny – cykliczne oligomery cukrowe zbudowane z jednostek D-glukopiranozy połączonych wiązaniami α -(1,4)-O-glikozydowymi. Do najpopularniejszych należą α -, β - oraz γ -cyklodekstryny składające się odpowiednio z 6, 7 oraz 8 jednostek cukrowych (rys. 5A).



Rys. 5. Struktura chemiczna α -, β - oraz γ -cyklodekstryn (A). Toroid (B)

Fenomen cyklodekstryn polega na ich amfifilowej budowie. Połączenie między sobą cząsteczek glukozy z udziałem węgla C1 i C4 warunkuje utworzenie sztywnej struktury, w której wszystkie pierwszorzędowe grupy hydroksylowe znajdują się po jednej stronie płaszczyzny wyznaczonej przez układ cykliczny, natomiast drugorzędowe po stronie przeciwnej. W konsekwencji cząsteczka przyjmuje kształt ściętego stożka typu toroidu, którego powierzchnia zewnętrzna ma charakter hydrofilowy, natomiast wewnątrz jest hydrofobowe (rys. 5B). Dzięki tej właściwości cyklodekstryny mogą tworzyć kompleksy inkluzyjne ze związkami hydrofobowymi, które jako całość są rozpuszczalne w roztworach wodnych [34]. Właściwości te są wykorzystywane do inkludowania leków hydrofobowych w nośnikach hydrożelowych [35–37].

Pozwala to na znaczne rozszerzenie użyteczności hydrożeli, która ze względu na ich hydrofilowość ogranicza się do leków rozpuszczalnych w środowiskach wodnych.

3. Perspektywy

Hydrożele funkcjonalizowane węglowodanami są nie tylko ciekawym połączeniem chemii cukrów oraz chemii polimerów, ale również przykładem praktycznego wykorzystania wiedzy biologicznej w syntezie chemicznej biomateriałów. Dzięki coraz większej interdyscyplinarności rezultatem prowadzonych w ostatnich latach badań są układy, które coraz lepiej odwzorowują procesy zachodzące w organizmie człowieka. Wiele aspektów wymaga wciąż dopracowania, jednak taki kierunek niesie z sobą realne szanse uzyskania efektywnych systemów kontrolowanego uwalniania leków.

Literatura

- [1] Kim S., Kim J.H., Jeon O., Kwon I.C., Park K. (2009) Engineered polymers for advanced drug delivery, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 71, 420–430.
- [2] Hariharasudhan D., Chirra H.D., Desai T.A. (2012) Emerging microtechnologies for the development of oral delivery devices, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64, 1569–1578.
- [3] Allen T.M., Cullis P.R. (2004) Drug Delivery Systems: Entering the Mainstream, *Science* 303, 1818–1822.
- [4] Qiu L.Y., Bae Y.H. (2006) Polymer Architecture and Drug Delivery, *Pharm. Res.* 23, 1–30.
- [5] Qiu Y., Park K. (2012) Environment-sensitive hydrogels for drug delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64, 49–60.
- [6] Gupta P., Vermani K., Garg S. (2002) Hydrogels: from controlled release to pH-responsive drug delivery, *Drug Discovery Today* 7, 569–579.
- [7] Hoare T.R., Kohane D.S. (2008) Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges, *Polymer* 49, 1993–2007.
- [8] Nyanhongo G.S., Steiner W., Gübitz G.M. (2011) *Biofunctionalization of Polymers and their Applications*, Springer, Heidelberg.
- [9] Lutz J.F., Börner H.G. (2008) Modern trends in polymer bioconjugates design, *Prog. Polym. Sci.* 33, 1–39.
- [10] Narain R. (2014) *Chemistry of Bioconjugates: Synthesis, Characterization, and Biomedical Applications*, Wiley, New Jersey.
- [11] Ahadian S., Sadeghian R., Salehi S., Ostrovidov S., Bae H., Ramalingam M., Khademhosseini A. (2015) Bioconjugated Hydrogels for Tissue Engineering and Regenerative Medicine, *Bioconjugate Chem.* 26, 1984–2001.
- [12] Vaidya A., Agarwal A., Jain A., Agrawal R.K., Jain S.K. (2011) Bioconjugation of polymers: a novel platform for targeted drug delivery, *Curr. Pharm. Des.* 17, 1108–1125.

- [13] Ladmiral V., Melia E., Haddleton D.M. (2004) Synthetic glycopolymers: an overview, *Eur. Polym. J.* 40, 431–449.
- [14] Kumashiro Y., Ooya T., Yui N. (2004) Dextran Hydrogels Containing Poly(N-isopropylacrylamide) as Grafts and Cross-Linkers Exhibiting Enzymatic Regulation in a Specific Temperature Range, *Macromol. Rapid Commun.* 25, 867–872.
- [15] Patil N.S., Li Y., D. Rethwisch G., Dordick J.S. (1997) Sucrose Diacrylate: A Unique Chemically and Biologically Degradable Crosslinker for Polymeric Hydrogels, *J. Polym. Sci. A Polym. Chem.* 35, 2221–2229.
- [16] Alison M.R. (2007) *The Cancer Handbook*, Wiley, New York.
- [17] Shi Y., Moon M., Dawood S., McManus B., Liu P.P. (2011) Mechanisms and management of doxorubicin cardiotoxicity, *Herz* 36, 296–305.
- [18] Pabla N., Dong Z. (2008) Cisplatin nephrotoxicity: Mechanisms and renoprotective strategies, *Kidney Int.* 73, 994–1007.
- [19] Vasir J.K., Labhassetwar V. (2005) Targeted drug delivery in cancer therapy *Technol. Cancer Res. Treat.* 4, 363–374.
- [20] Choi S.H., Yoon J.J., Park T.G. (2002) Galactosylated poly(N-isopropylacrylamide) hydrogel submicrometer particles for specific cellular uptake within hepatocytes, *J. Colloid. Interface Sci.* 251, 57–63.
- [21] Duan C., Gao J., Zhang D., Jia L., Liu Y., Zheng D., Liu G., Tian X., Wang F., Zhang Q. (2011) Galactose-decorated pH-responsive nanogels for hepatoma-targeted delivery of oridonin, *Biomacromolecules* 12, 4335–4343.
- [22] Wu J., Sun T.M., Yan X.Z., Zhu J., Du X.J., Yao Y.D., Xiong M.H., Wang H.X., Wang Y.C., Wang J. (2013) Enhanced drug delivery to hepatocellular carcinoma with a galactosylated core-shell polyphosphoester nanogel, *Biomater. Sci.* 1, 1143–1150.
- [23] Lou S., Gao S., Wang W., Zhang M., Zhang J., Wang C., Li C., Kong D., Zhao Q. (2015) Galactose-functionalized multi-responsive nanogels for hepatoma-targeted drug delivery, *Nanoscale* 21, 3137–3146.
- [24] Quan S., Wang Y., Zhou A., Kumar P., Narain R. (2015) Galactose-based Thermosensitive Nanogels for Targeted Drug Delivery of Iodoazomycin Arabinofuranoside (IAZA) for Theranostic Management of Hypoxic Hepatocellular Carcinoma, *Biomacromolecules* 16, 1978–1986.
- [25] Siegel R.A. (2014) Stimuli sensitive polymers and self regulated drug delivery systems: a very partial review, *J. Control. Release* 190, 337–351.
- [26] Wu W., Zhou S. (2013) Responsive materials for self-regulated insulin delivery, *Macromol. Biosci.* 64, 1464–1477.
- [27] Miyata T., Jikihara A., Nakamae K., Hoffman A.S. (2004) Preparation of reversibly glucose-responsive hydrogels by covalent immobilization of lectin in polymer networks having pendant glucose, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 15, 1085–1098.
- [28] Kawamura A., Hata Y., Miyata T., Uragami T. (2012) Synthesis of glucose-responsive bioconjugated gel particles using surfactant-free emulsion polymerization, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 99, 74–81.
- [29] Manning M., Chou D., Murphy B., Payne R., Katayama D. (2010) Stability of protein pharmaceuticals: an update, *Pharm. Res.* 27, 544–575.
- [30] Wang W., Singh S.K., Li N., Toler M.R., King K.R., Nema S. (2012) Immunogenicity of protein aggregates-Concerns and realities, *Int. J. Pharm.* 431, 1–11.
- [31] Jain N.K., Roy I. (2009) Effect of trehalose on protein structure, *Protein Sci.* 18, 24–36.

-
- [32] Burek M., Czuba Z.P., Waśkiewicz S. (2014) Novel acid-degradable and thermosensitive poly(N-isopropylacrylamide) hydrogels cross-linked by α,α -trehalose diacetals, *Polymer* 55, 6460–6470.
- [33] Savjani K.T., Gajjar A.K., Savjani J.K. (2012) Drug solubility: importance and enhancement techniques. *ISRN Pharm.* 195727, 1–10.
- [34] Kołodziejczyk A. (2006) *Naturalne związki organiczne*, Wyd. Nauk. PWN, Warszawa.
- [35] Hamcerencu M., Desbrieres J., Popa M., Riess G. (2009) Stimuli-Sensitive Xanthan Derivatives/N-isopropylacrylamide Hydrogels: Influence of Cross-Linking Agent on Interpenetrating Polymer Network Properties, *Biomacromolecules* 10, 1911–1922.
- [36] Peng K., Tomatsu I., Korobko A.V., Kros A. (2010) Cyclodextrin-dextran based in situ hydrogel formation: a carrier for hydrophobic drugs, *Soft Matter* 6, 85–88.
- [37] Mateen R., Hoare T. (2014) Injectable, in situ gelling, cyclodextrin-dextran hydrogels for the partitioning-driven release of hydrophobic drugs, *J. Mater. Chem. B* 2, 5157–5167.

Część druga



CHEMIA ORGANICZNA

IZOLACJA I OKREŚLENIE STRUKTURY CHEMICZNEJ O-ANTYGENU BAKTERII *DICKEYA SOLANI**

KAROLINA OSSOWSKA, EWA KUPFERSCHMIED,
MAŁGORZATA CZERWICKA, SYLWIA SZULTA,
MATEUSZ PALLACH, ZBIGNIEW KACZYŃSKI

Pracownia Biochemii Strukturalnej, Uniwersytet Gdański
ul. Wita Stwosza 63, 80-308 Gdańsk
e-mail: karolina.ossowska@phdstud.ug.edu.pl

Hasła do zapamiętania: O-antygen, lipopolisacharyd, bakterie fitopatogenne, *Dickeya solani*, analiza cukrowa, analiza metylacyjna

Wykaz skrótów:

- GLC-MS – chromatografia gazowo-cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas
NMR – spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego
LPS – lipopolisacharyd
OPS – O-polisacharyd, O-antygen

1. Wstęp

Bakterie są jednymi z najstarszych i jednocześnie najpowszechniej występujących organizmów na Ziemi. Ich niewielkie rozmiary sprawiają, iż odznaczają się one wysokim poziomem adaptacyjnym, zasiedlając niemal wszystkie dostępne nisze ekologiczne. Bakterie występują w wodzie, glebie, powietrzu, innych organizmach, a dzięki ich bardzo sze-

* Badania finansowane z projektu w ramach Badań Naukowych Służących Rozwojowi Młodych Naukowców oraz Uczestników Studiów Doktoranckich w 2015 roku: BMN 538-8727-B700-14/15.

rokiej tolerancji ekologicznej także w tak ekstremalnych warunkach środowiska, jak oceaniczne kominy hydrotermalne, lodowce Antarktydy czy tereny radioaktywne [1].

Należy również wspomnieć o ogromnej roli, jaką bakterie pełnią w przyrodzie. Między innymi są one zarówno pierwszym, jak i ostatnim ogniwem łańcuchów pokarmowych. Pełniąc rolę destruentów, przyczyniają się do nieustannego krążenia materii w środowisku. Ponadto zdolność bakterii do rozkładu, ale także syntezy wielu związków organicznych i nieorganicznych jest wykorzystywana przez człowieka w wielu gałęziach przemysłu i gospodarki [1].

Jednakże bakterie w życiu człowieka, jak i szeroko rozumianego pojęcia środowiska to nie tylko pozytywne aspekty. Wśród tej niezliczonej grupy mikroorganizmów występują także takie, które są patogenne, wywołując różnego rodzaju choroby u ludzi, zwierząt czy roślin.

1.1. Bakterie gatunku *Dickeya solani*

Bakterie gatunku *Dickeya solani* to fitopatogeny należące do rodziny *Enterobacteriaceae*. Są to Gram-ujemne fakultatywne beztlenowce niewytwarzające form przetrwalnikowych. Podczas infekcji mikroorganizmy te produkują charakterystyczne enzymy pektynolityczne. Cechami typowymi dla opisywanych drobnoustrojów są także wysoka przeżywalność w szerokim zakresie temperatur oraz duża odporność na zmiany temperatury i wilgotności [2–5].

Do roślin infekowanych przez *D. solani* należą ziemniaki. Bakterie te wywołują choroby zarówno bulw sadzeniaków, jak i całej rośliny na dowolnym etapie jej wzrostu ze względu na zdolność do przemieszczania się w tkance przewodzącej z korzeni do łodygi, liści i bulw potomnych. Jednostki chorobowe, jakie wywołują *D. solani* to tzw. mokra zgnilizna, gdy proces gnicia dotyczy bulw oraz tzw. czarna nóżka, gdy więdnieniu ulegają nadziemne części rośliny. Zakażenie ziemniaków bakteriami *D. solani* prowadzi do strat w ich uprawie, jak również podczas przechowywania i transportu. Obecność *D. solani* w uprawach ziemniaka stwierdzono w wielu krajach Europy, w tym w Polsce, ale również w wielu innych regionach świata [2–5].

1.2. O-antygen

O-antygen, zwany także O-polisacharydem (OPS) lub łańcuchem O-swoistym, jest najbardziej wyeksponowanym na zewnątrz komórki bakteryjnej fragmentem cząsteczki lipopolisacharydu (LPS) – integralne-

go składnika ściany komórkowej bakterii Gram-ujemnych [6]. W swojej strukturze chemicznej charakteryzuje się obecnością oligosacharydowej jednostki powtarzalnej, w skład której wchodzi od 1 do 8 reszt monosacharydowych. Dotychczas w strukturach tych zidentyfikowano kilkadziesiąt różnych monosacharydów oraz zaobserwowano, że częstymi składnikami O-antygenów są aminocukry lub związki niecukrowe, takie jak: aminokwasy, fosforany, glicerol czy kwas sjałowy [6–8].

O-polisacharyd wykazuje dużą zmienność pod względem budowy, która występuje nie tylko pomiędzy różnymi rodzajami czy gatunkami bakterii, ale może także wykazywać odmienną strukturę chemiczną pomiędzy szczepami w obrębie tego samego gatunku. Zmienność ta jest zależna od składu budujących OPS reszt cukrowych, ich konfiguracji, sekwencji, typu wiązań pomiędzy nimi (rozgałęzienia lub ich brak) czy obecności podstawników niecukrowych [8, 9].

OPS jest elementem silnie immunogennym. W obrębie jednej jednostki powtarzalnej może znajdować się nawet kilka determinant antygenowych. Ponadto rolę O-polisacharydu jako antygeny powierzchniowego bakterii odzwierciedla fakt, że mikroorganizmy pozbawione łańcucha O-swoistego wykazują zmniejszoną odporność w stosunku do odpowiedzi immunologicznej infekowanego gospodarza niż mikroorganizmy z długim łańcuchem O-polisacharydowym [8, 10].

2. Cel i metodyka badań

Celem przeprowadzonych badań była izolacja O-antygeny bakterii *Dickeya solani*, a następnie określenie jego struktury chemicznej. Badania te składały się z trzech głównych etapów, do których należały: izolacja lipopolisacharydu ze ściany komórkowej bakterii, hydroliza LPS-u w celu wyodrębnienia O-polisacharydu oraz właściwe badania strukturalne.

2.1. Izolacja lipopolisacharydu ze ściany komórkowej bakterii

Suchą masę bakteryjną poddano ekstrakcji fenolowo-wodnej zgodnie z metodą opisaną przez Westphala i Janna [11]. Metoda ta wykorzystuje fakt, iż płynny fenol jest dobrym rozpuszczalnikiem dla białek, natomiast takie składniki, jak kwasy nukleinowe i lipopolisacharydy są lepiej rozpuszczalne w wodzie. Dlatego przed wytrąceniem LPS-u z uzys-

kanej po ekstrakcji warstwy wodnej należało usunąć kwasy nukleinowe. Zarówno kwasy nukleinowe, jaki i lipopolisacharyd wytrącono za pomocą alkoholu etylowego (warunki odpowiednio: dla kwasów nukleinowych $\text{pH} = 4,5$ $C_{\text{końcowe EtOH}} = 40\%$; dla LPS $\text{pH} = 7$ $C_{\text{końcowe EtOH}} = 80\%$).

2.2. Izolacja O-antygeny

Wyizolowany lipopolisacharyd poddano łagodnej hydrolizie w środowisku 1% kwasu octowego [13]. Z mieszaniny poreakcyjnej poprzez odwirowanie usunięto osad lipidu A, natomiast supernatant zawierający mieszaninę O-antygeny oraz pozostałych frakcji sacharydowych po hydrolizie LPS-u rozdzielono za pomocą chromatografii wykluczania (SEC). Zestaw SEC zawierał kolumnę szklaną (120 cm, $\varnothing = 1$ cm) podłączoną do detektora refraktometrycznego RI Detector 2031 plus (JASCO) oraz kolektora frakcji FCC 60 (czas kolekcji 20 min/probówkę). Jako fazę stacjonarną użyto żel akrylowy (Bio-Gel P-100), natomiast fazą ruchomą była woda (przepływ: 5,4 ml/h). Następnie dla zebranych frakcji zarejestrowano widma protonowe techniką spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) i na ich podstawie do dalszych badań strukturalnych wybrano frakcję zawierającą czysty O-polisacharyd.

2.3. Badania strukturalne O-antygeny

Badania strukturalne rozpoczęto od zarejestrowania zestawu jedno- i dwuwymiarowych widm NMR w temperaturze 303 K przy użyciu spektrometru Bruker Avance III 700 MHz. Jako rozpuszczalnika użyto 99,9% wody deuterowanej (D_2O), natomiast jako wzorzec do wyznaczenia wartości przesunięć chemicznych wykorzystano aceton.

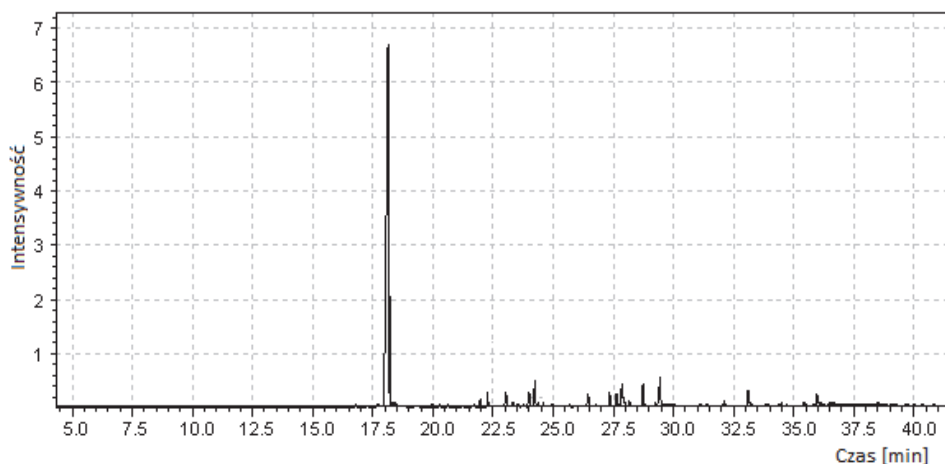
Ponadto badany OPS został poddany modyfikacjom chemicznym, takim jak analiza cukrowa oraz analiza metylacyjna.

Podczas analizy cukrowej badany OPS został poddany hydrolizie w środowisku 2 M kwasu trifluoroctowego (TFA). Otrzymane w wyniku hydrolizy monosacharydy zostały poddane redukcji przy użyciu tetrahydroboranu sodu (NaBH_4), a następnie uzyskane alditole zacetylowane za pomocą bezwodnika kwasu octowego. Jako katalizator tej reakcji wykorzystano octan sodu [12, 13]. Otrzymane produkty w postaci acetylowych pochodnych alditoli analizowano techniką chromatografii gazowo-cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas (GLC-MS).

Analiza metylacyjna na pierwszym etapie polegała na zmetylowaniu wszystkich wolnych grup hydroksylowych badanego O-polisacharydu. W tym celu wykorzystano metodę opisaną przez Ciucanu i Kereka [14]. Zmetylowany OPS oczyszczono za pomocą ekstrakcji rozpuszczalnikowej woda–chloroform, a następnie poddano hydrolizie, redukcji i acetylacji w sposób analogiczny jak opisano dla analizy cukrowej. Otrzymane częściowo zmetylowane octany alditoli analizowano techniką GLC-MS.

3. Wyniki i wnioski

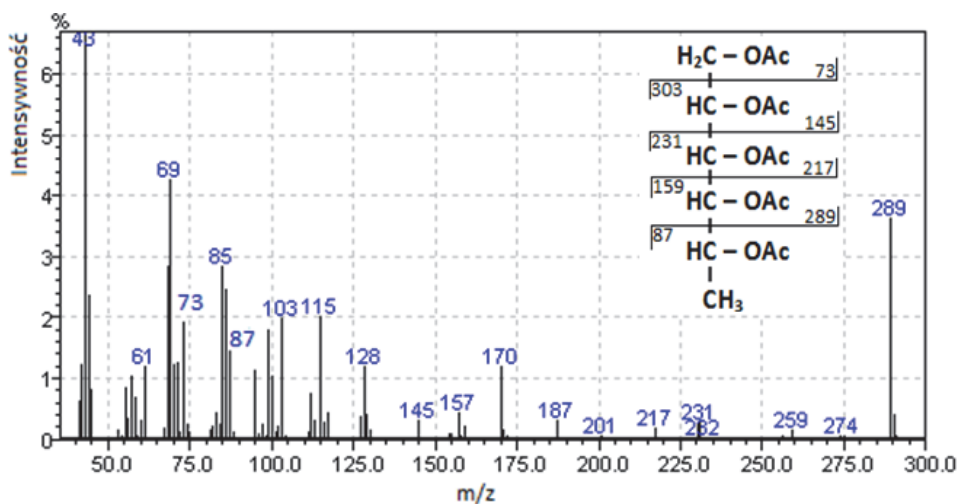
Podstawowym założeniem wykonanej analizy cukrowej było ustalenie liczby reszt cukrowych jednostki powtarzalnej badanego OPS-u, a także ich identyfikacja. Zarejestrowany chromatogram przedstawiono na rysunku 1.



Rys. 1. Fragment chromatogramu pochodnych otrzymanych z analizy cukrowej OPS-u bakterii *D. solani* CH 99

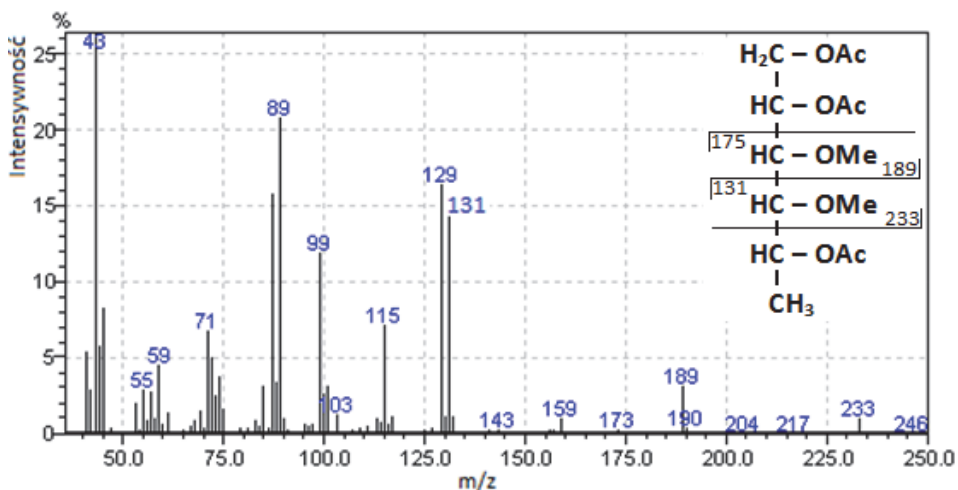
Warunki analizy: chromatograf sprzężony ze spektrometrem mas Shimadzu GC-MS-QP2010SE, kolumna Rtx-5: długość 30 m, średnica 0,25 mm, grubość filmu 0,25 μm (Restek); gaz nośny: hel (1 ml/min); temp. dozownika 260°C; program temperaturowy: 120–260°C, 2°C/min, 260°C 20min; jonizacja strumieniem elektronów (70 eV), temp. źródła jonów 220°C, rejestrowany zakres mas 43–650 m/z

Na otrzymanym chromatogramie zaobserwowano jeden główny sygnał, który na podstawie widma mas (rys. 2) zidentyfikowano jako 1,2,3,4,5-penta-*O*-acetylo-6-deoksy-heksitol.



Rys. 2. Widmo mas 1,2,3,4,5-penta-*O*-acetylo-6-deoksy-heksitolu (sygnał 1 na rys. 1)

Podjęto próbę zidentyfikowania 6-deoksy-heksozy budującej badany *O*-polisacharyd, wykonując analizy GLC-MS z dodatkiem wzorców acetylowych pochodnych fukozy i ramnozy. Jednakże otrzymane wyniki jednoznacznie wykazały, iż *O*-antygen bakterii *Dickeya solani* jest homopolimerem zbudowanym z reszt innej 6-deoksy-heksozy, dotychczas nie zidentyfikowanej ze względu na brak odpowiedniego wzorca.

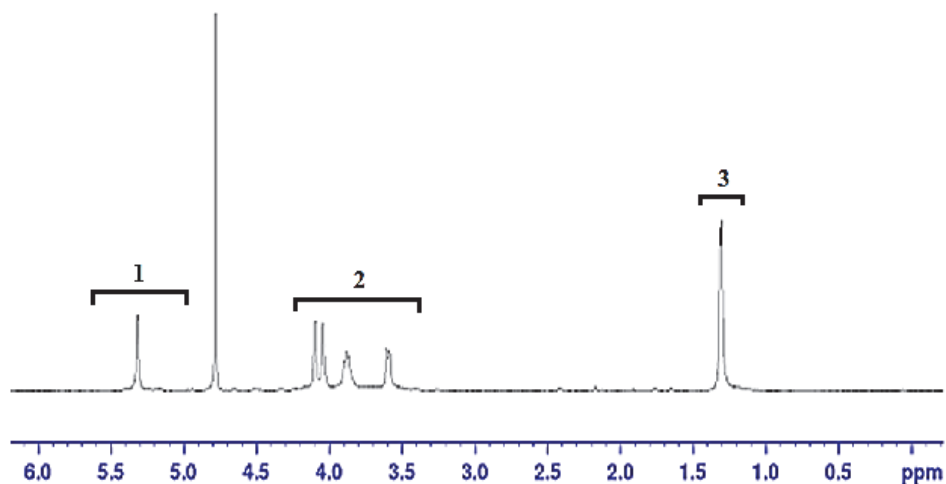


Rys. 3. Widmo mas 1,2,5-tri-*O*-acetylo-3,4-di-*O*-metylo-6-deoksy-heksitolu (warunki analizy rys. 1)

Analiza metylacyjna miała na celu wyznaczenie miejsc glikozylowania reszt cukrowych badanego OPS-u. Na zarejestrowanym chromatogramie zaobserwowano obecność jednego głównego sygnału, który na podstawie widma mas zidentyfikowano jako 1,2,5-tri-*O*-acetylo-3,4-di-*O*-metylo-6-deoksy-heksitol (rys. 3).

Miejsca glikozylowania wyznaczono na podstawie pozycji grup *O*-acetylowych. W badanym O-antygenie reszty 6-deoksy-heksozy połączone są wiązaniem 1 → 2 glikozydowym.

Interpretacja zarejestrowanych widm NMR potwierdziła uzyskane wyniki analiz z wykorzystaniem modyfikacji chemicznych dla badanego O-polisacharydu. Analiza charakterystycznych zakresów (oznaczonych 1, 2, 3 na rys. 4) widma protonowego (rys. 4) jednoznacznie wykazała, iż jednostka powtarzalna O-antygeny bakterii *D. solani* zbudowana jest z jednej jednostki cukrowej, którą jest 6-deoksy-heksoza.



Rys. 4. Widmo ^1H NMR 700 MHz OPS-u bakterii *D. solani* CH 99

Oznaczenia: 1 – zakres anomeryczny, 2 – zakres sygnałów protonów pierścieni cukrowych, 3 – zakres sygnałów protonów z grupy CH_3 6-deoksy-heksozy

Podsumowując wszystkie dotychczas otrzymane wyniki dla badanego O-antygeny bakterii *Dickeya solani*, ustalono, iż jest to homopolimer zbudowany z reszt niezidentyfikowanej 6-deoksy-heksozy, które są połączone wiązaniem 1 → 2 glikozydowym.

4. Perspektywy

Zaproponowana struktura chemiczna O-antygeny bakterii *Dickeya solani* jest niekompletna i wymaga dalszych badań, które będą obejmowały identyfikację jednostki cukrowej, przyporządkowanie jej do szeregu konfiguracyjnego D lub L oraz wyznaczenie konfiguracji α lub β anomeicznych atomów węgla. W dalszych badaniach zaplanowano także określenie struktur chemicznych O-antygenów trzech kolejnych szczepów bakterii *Dickeya solani*. Znajomość tych struktur może w przyszłości posłużyć do stworzenia testów szybkiej identyfikacji tych mikroorganizmów.

Literatura

- [1] Kunicki-Goldfinger W.J.H. (2005) *Życie bakterii*, Wyd. Nauk. PWN, Warszawa, 139–183, 405–439.
- [2] van der Wolf J.M., Nijhuis E.H., Kowalewska M.J., Saddler G.S., Parkinson N., Elphinstone J.G., Pritchard L., Toth I.K., Lojkowska E., Potrykus M., Waleron M., de Vos P., Cleenwerck I., Pirhonen M., Garlant L., Hélias V., Pothier J.F., Pflüger V., Duffy B., Tsror L., Manulis S. (2014) *Dickeya solani* sp. nov., a pectinolytic plant pathogenic bacterium isolated from potato (*Solanum tuberosum*), *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64, 768–774.
- [3] Toth I.K., van der Wolf J.M., Saddler G., Lojkowska E., Hélias V., Pirhonen M., Tsror (Lahkim) L., Elphinstone J.G. (2011) *Dickeya* species: an emerging problem for potato production in Europe, *Plant Pathol.* 60(3), 385–399.
- [4] Czajkowski R., de Boer W.J., van der Zouwen P.S., Kastelein P., Jafra S., de Haan E.G., van den Bovenkamp G.W., van der Wolf J.M. (2013) Virulence of ‘*Dickeya solani*’ and *Dickeya dianthicola* biovar-1 and -7 strains on potato (*Solanum tuberosum*), *Plant Pathol.* 62(3), 597–610.
- [5] Adriaenssens E.M., Van Vaerenbergh J., Vandenheuvel D., Dunon V., Ceysens P.J., De Proft M., Kropinski A.M., Noben J.P., Maes M., Lavigne R. (2012) T4-Related Bacteriophage LIMEstone Isolates for the Control of Soft Rot on Potato Caused by ‘*Dickeya solani*’, *PLoS ONE* 7(3), 1–10.
- [6] Beveridge T.J. (1999) Structures of Gram-Negative Cell Walls and Their Derived Membrane Vesicles, *J. Bacteriol.* 181(16), 4725–4733.
- [7] Kaszowska M. (2004) Budowa chemiczna i biosynteza lipopolisacharydu – ważnego składnika osłony komórkowej bakterii Gram-ujemnych, *Post. Hig. i Med. Dośw.* 58, 333–342.
- [8] Rietschel E.T., Kirikae T., Schade U., Mamat U., Schmidt G., Loppnow H., Ulmer A.J., Zähringer U., Seydel U., Di Padova F., Schreier M., Brade H. (1994) Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function, *FASEB J.* 8(2), 217–225.
- [9] Caroff M., Karibian D. (2003) Structure of bacterial lipopolysaccharides, *Carbohydr. Res.* 338, 2431–2447.
- [10] Bugla-Płoskońska G. (2008) Organizacja struktur zewnętrznych bakterii Gram-ujemnych a proces aktywacji układu immunologicznego, *Post. Mikrobiol.* 47(3), 191–197.

- [11] Westphal O., Jann K. (1965) Bacterial lipopolysaccharides, extraction with phenol-water and further applications of the procedure, *Methods Carbohydr.* 5, 83–91.
- [12] Lodowska J., Zięba A., Wolny D., Węglarz L., Dzierżewicz Z. (2006) Metody destrywacji komponentów lipopolisacharydów w ocenie ich struktury chemicznej technikami chromatograficznymi, *Post. Hig. i Med. Dośw.* 60, 113–128.
- [13] Cumpstay I. (2013) Chemical Modification of Polysaccharides, *ISRN Org. Chem.* 2013, <<http://www.hindawi.com/journals/isrn/2013/417672/>>, [dostęp: 12.11.2015].
- [14] Ciucanu I., Kerek F. (1984) A simple rapid method for the permethylation of carbohydrates, *Carbohydr. Res.* 131, 209–217.

OTRZYMYWANIE I AKTYWNOŚĆ FARMAKOLOGICZNA MODYFIKOWANYCH GLICEROFOSFOLIPIDÓW

MAREK KŁOBUCKI, ALEKSANDRA GRUDNIEWSKA,
CZESŁAW WAWRZEŃCZYK

Katedra Chemii, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
ul. C.K. Norwida 25, 50-375 Wrocław
e-mail: marek.klobucki@gmail.com

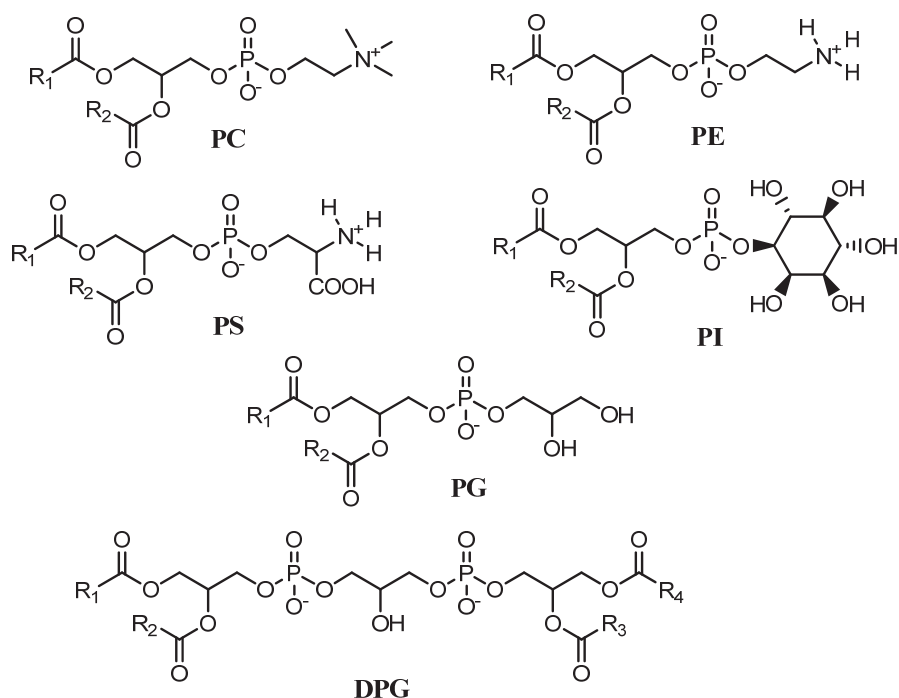
Hasła do zapamiętania: glicerofosfolipidy, fosfatydylocholina, aktywność farmakologiczna, nośniki związków

1. Wstęp

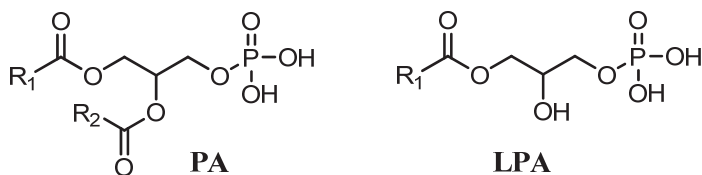
W 1846 r. Theodore Nicolas Gobley pracował nad składem chemicznym żółtka jaja kurzego. Po jego odwodnieniu, a następnie ekstrakcji eterem oraz alkoholem i odparowaniu ekstraktu otrzymał oleistą, lepką ciecz. Końcowy produkt poddał filtracji, otrzymując związek obojętny wobec lakmusu, lecz popiół po spaleniu ekstraktu wykazywał odczyn kwaśny. W ten sposób autor zidentyfikował zawartość kwasu fosforowego w badanej mieszaninie. Dowiódł także obecności glicerolu, amoniaku oraz kwasu oleinowego w żółtku jaja kurzego. Jako pierwszy człowiek w historii użył nazwy „lecytyna” (od greckiego *lekhitos* – żółtko jaja), a przy pomocy innego badacza – Adolfa Streckera – ustalona została struktura fosfatydylocholiny (PC). Część jego wyników była oczywiście błędna, ale postęp w tej dziedzinie ogromny [1].

Dalsze lata przyniosły kolejne odkrycia. Oprócz sfingolipidów ustalono strukturę fosfatydyloetanoloaminy (PE) oraz fosfatydyloseryny (PS). Wydzielono fosfolipidy inozytolowe (PI) oraz inne fosfolipidy glicerolowe, takie jak fosfatydyloglicerol (PG) i kardiolipiny (difosfatydyloglicerol –

DPG) (rys. 1). Następne lata wnikliwych analiz przyniosły odkrycie najprostszego fosfolipidu, jakim jest kwas fosfatydowy (PA) oraz lizofosfatydowy (LPA) (rys. 2), które są prekursorami wszystkich klas fosfolipidów, w tym również di- oraz triacylogliceroli [2].



Rys. 1. Wzory fosfolipidów, R₁, R₂, R₃, R₄ = reszty kwasów tłuszczowych

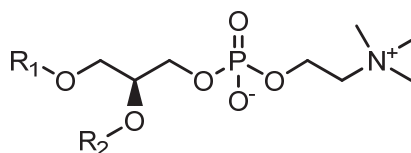


Rys. 2. Wzór kwasu fosfatydowego, R₁, R₂ = reszty kwasów tłuszczowych

Glicerofosfolipidy są podstawowym elementem budulcowym błon biologicznych wszystkich organizmów żywych. Dla oznakowania pozycji kwasów tłuszczowych przy asymetrycznym węglu we wszystkich acyloglicerolach stosuje się system stereospecyficznej numeracji (*sn*). Fosfolipidy

mają w pozycjach *sn*-1 oraz *sn*-2, kwasy tłuszczowe przyłączone wiązaniem estrowym, natomiast w pozycji *sn*-3 znajduje się kwas fosforowy bądź reszta tego kwasu zestryfikowana odpowiednim ugrupowaniem z grupą hydroksylową: choliną, 2-aminoetanolem, seryną lub inozytolem. Podstawniki te tworzą region hydrofilowy oraz określają typ fosfolipidu. Reszty kwasów tłuszczowych stanowią część hydrofobową cząsteczki. Wielkość, kształt, ładunek oraz skład chemiczny poszczególnych klas glicerofosfolipidów odgrywa znaczącą rolę w tworzeniu oraz prawidłowym funkcjonowaniu błony komórkowej. Różnorodne rozmieszczenie fosfolipidów w błonie nadaje jej specyficzne właściwości funkcjonalne, ułatwiające transport związków pomiędzy jej wewnętrzną a zewnętrzną częścią. Glicerofosfolipidy odpowiadają za zachowanie prawidłowej konformacji białek błonowych. Ponadto, pełnią funkcje kofaktorów w reakcjach enzymatycznych oraz przekaźników międzykomórkowych. Fosfolipidy są niezbędne do wchłaniania, transportowania i magazynowania lipidów. Wydzielane z żółcią mają na celu wspomaganie trawienia i wchłaniania tłuszczu. Glicerofosfolipidy służą jako źródło cząsteczek sygnałowych takich, jak: kwas arachidonowy, kwas fosfatydowy, diacyloglicerol czy trifosforan inozytolu.

Fosfolipidy występują w dużych ilościach nie tylko u zwierząt, ale również u roślin, gdzie przyczyniają się do prawidłowego funkcjonowania fotosyntezy. W komórkach eukariotycznych najbardziej rozpowszechnione są fosfatydylocholiny. U bakterii natomiast w największych ilościach występuje fosfatydyloetanolamina. Interesującym jest, że archebakterie mają błony komórkowe zbudowane z fosfolipidów eterowych (rys. 3), zawierających długie i rozgałęzione łańcuchy alkilowe, w tym izoprenoidowe oraz odmienny niż w pozostałych organizmach izomer glicerolu (*S*) [3]. W zależności od gatunku glicerofosfolipidy mają zróżnicowane kwasy tłuszczowe w pozycjach *sn*-1 oraz *sn*-2. Pozycja *sn*-2 zestryfikowana jest najczęściej nienasyconym kwasem tłuszczowym. W zależności od źródła fosfolipidów w pozycji *sn*-1 występują nasycone lub nienasycone kwasy tłuszczowe [4–6].

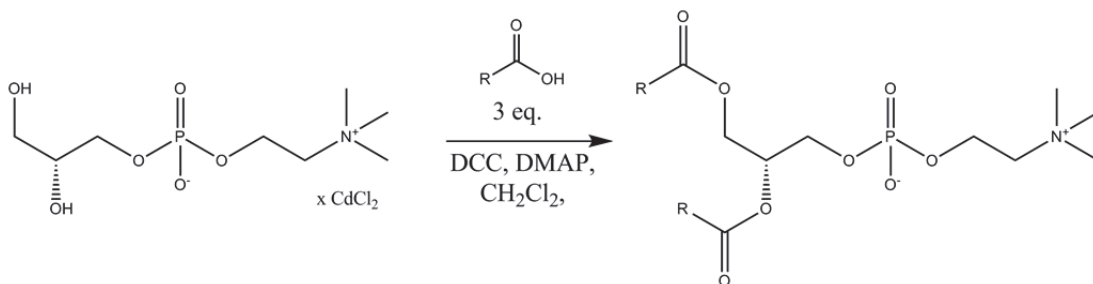


Rys. 3. Wzór fosfolipidu eterowego, gdzie R_1 , R_2 = reszty kwasów tłuszczowych lub łańcuchy izoprenowe

2. Otrzymywanie glicerofosfolipidów

W literaturze zostało opisanych wiele metod otrzymywania fosfolipidów z rdzeniem glicerolowym. Początkowo związki te pozyskiwano z naturalnych źródeł, metodami ekstrakcji za pomocą roztworów wodnych, alkoholu oraz eteru. Wraz z postępem w nauce i technice w latach 60. XX w. otrzymano pierwsze syntetyczne glicerofosfolipidy [7, 8].

Fosfatydylocholina jest najbardziej rozpowszechnionym fosfolipidem i to ona została zsyntezowana jako pierwsza [9]. Najprostszą metodą otrzymywania diacyloglicerofosfocholiny jest wykorzystanie jako substratu *sn*-glicero-3-fosfocholiny, która ma dwie wolne grupy hydroksylowe w pozycjach *sn*-1 oraz *sn*-2. Z uwagi na ogromną polarność tego związku, aby zwiększyć jego rozpuszczalność w rozpuszczalnikach organicznych, w syntezach stosowane są głównie kompleksy z chlorkiem kadmu, chlorkiem tetrametyloamoniowym lub eteratem trifluorku boru [10, 11]. Najpopularniejszą i najbardziej wydajną ścieżką syntezy jest zastosowanie estryfikacji Steglicha, w której wykorzystuje się *N,N'*-dicykloheksylokarbodiimid (DCC) jako odczynnik sprzęgający oraz 4-(*N,N*-dimetyloamino)pirydynę (DMAP) jako katalizator (rys. 4) [12].

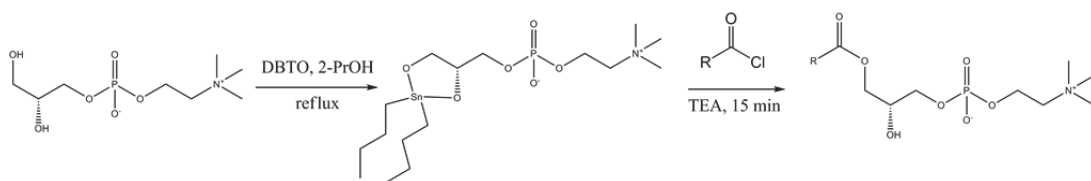


Rys. 4. Schemat syntezy diacylofosfatydylocholiny, gdzie związkiem wyjściowym jest kompleks (*R*)-*sn*-glicero-3-fosfocholiny z chlorkiem kadmu

Istnieje wiele modyfikacji tej metody, które sprowadzają się do wykorzystania innych odczynników sprzęgających, rozpuszczalników, różnych temperatur czy zastosowania ultradźwięków [9, 13]. We wszystkich przypadkach osiągnięto wysokie wydajności reakcji, przekraczające 70%.

Kolejną metodą jest synteza glicerofosfocholiny mających różne kwasy tłuszczowe w pozycjach *sn*-1 oraz *sn*-2. Może być ona oparta na dwóch schematach. Pierwszy polega na zablokowaniu grup hydroksylowych glicerofosfocholiny za pomocą tlenku dibutylocyny (DBTO), a następnie selektywnym przyłączeniu kwasu tłuszczowego, stosując jego chlorek

w pozycji *sn*-1 (rys. 5). Pozycja *sn*-2 może być zestryfikowana odpowiednim kwasem [12]. Druga metoda opiera się na zablokowaniu pozycji *sn*-1 chlorkiem trytylu oraz wbudowaniu wybranego kwasu w pozycję *sn*-2. Na kolejnym etapie prowadzi się odblokowanie grupy –OH w pozycji *sn*-1 oraz jej estryfikację odpowiednim kwasem karboksylowym. Reakcję tę przeprowadza się w temperaturze 0°C, aby ograniczyć wewnątrzcząsteczkową migrację kwasu tłuszczowego pomiędzy grupami hydroksylowymi przy C-1 i C-2 (pozycje *sn*-1 i *sn*-2) [10].



Rys. 5. Schemat syntezy 2-lizofosfatydylocholin z wykorzystaniem chlorku kwasu tłuszczowego

Oprócz standardowych syntez fosfocholin istnieje wiele modyfikacji, w których wiązania estrowe pomiędzy glicerolem a kwasem tłuszczowym zostały zmienione na połączenia eterowe, tiolowe bądź amidowe. W większości tych reakcji związkiem wyjściowym jest glycidol oraz 1- lub 2-aminopropandiol [14–17].

Otrzymanie glicerofosfatydyloetanolamin oraz fosfatydyloseryn jest bardziej skomplikowane. Na pierwszym etapie należy zablokować grupy aminowe w 2-aminoetanolu czy serynie. Kolejne etapy polegają na włączeniu odpowiednich kwasów w pozycję *sn*-1 oraz *sn*-2. Bardziej wydajną metodą otrzymywania tego typu glicerofosfolipidów wydaje się wykorzystanie fosfolipazy D w reakcji transfosfatydylacji z odpowiednimi glicerofosfocholinami [18].

Opisane zostały również syntezy totalne glicerofosfolipidów, gdzie związkiem wyjściowym jest najczęściej mannitol lub solketal (zablokowany glicerol) [17]. Reakcje te są złożone z wielu etapów, a ich całkowite wydajności nie są satysfakcjonujące.

3. Farmakologicznie aktywne glicerofosfolipidy

Prozdrowotne właściwości glicerofosfolipidów wynikają z ich budowy. Naturalne połączenia tej grupy zawierają np. cholinę i serynę. Ze względu na obecność w większości z nich nienasyconych kwasów tłuszcz-

czowych mogą działać jako antyoksydanty. Ponadto fosfolipidy chronią przewód pokarmowy oraz układ nerwowy przed toksycznością niektórych leków. Znane są preparaty i suplementy diety oparte na lecytynie sojowej oraz z nasion rzepaku, które zalecane są w chorobie Parkinsona czy Alzheimerera. Fosfatydylocholina jest źródłem choliny, która bierze udział w syntezie neuroprzekaźnika – acetylocholin. Pobudza ona komórki układu nerwowego, a tym samym poprawia pamięć oraz łagodzi stany depresyjne. Fosfolipidy bogate w wielonienasycone kwasy tłuszczowe wspomagają leczenie chorób wątroby oraz zaburzeń czynnościowych dróg żółciowych.

Fosfolipidy znajdują wiele zastosowań, szczególnie w przemyśle kosmetycznym, spożywczym oraz farmaceutycznym. Stosowane są jako emulgatory, biosurfaktanty, nośniki substancji aktywnych oraz przy produkcji liposomów [19].

Fakt wykorzystania glicerofosfolipidów jako nośnika substancji biologicznie aktywnych skłonił wielu badaczy do poszukiwania nowych preparatów o znaczeniu prozdrowotnym. Fosfolipidy o określonych właściwościach fizycznych lub aktywności farmakologicznej najczęściej otrzymuje się w wyniku syntezy chemoenzymatycznej [20].

Naukowcy z San Francisco otrzymali w 2008 r. glicerofosfocholiny mające cząsteczkę cholesterolu. W swojej pracy wykorzystali połączenia estrowe oraz eterowe, a także specyficzne linkery, za pomocą których przyłączyli wspomniany sterol do struktury fosfocholiny. Badaniami na myszach autorzy wykazali, iż modyfikowana cząsteczką glicerofosfolipidu nie zakłóca prawidłowego funkcjonowania naturalnych membran biologicznych. Ponadto fosfolipidy te mogą być z powodzeniem wykorzystywane jako liposomalne nośniki leków [17].

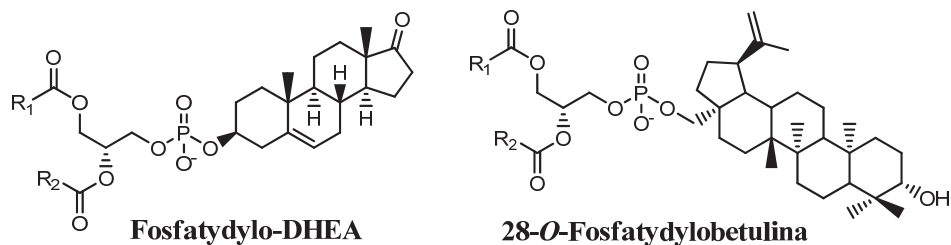
W 2000 r. otrzymano fosfatydylocholinę zawierającą ibuprofen w różnych konfiguracjach pozycyjnych [21], ale nie przedstawiono wyników badań aktywności farmakologicznej. Potwierdzona została natomiast teza o zachowaniu właściwości agregacyjnych i amfifilowych modyfikowanych fosfolipidów. Badania potwierdziły również brak aktywności hydrolitycznej fosfolipazy A₂ w stosunku do syntetycznych glicerofosfolipidów.

Synteza totalna, półsynteza czy syntezy z wykorzystaniem enzymów to metody, jakie wykorzystano do otrzymania glicerofosfolipidów mających w swojej budowie witaminę A [22], kwas liponowy [23] czy leki przeciwwirusowe [24].

Ostatnio opisano syntezy glicerofosfolipidów ze sprzężonymi kwasami linolowymi (CLA) w pozycjach *sn*-1 i *sn*-2 [25]. Badania testowe na aktywność antyproliferacyjną w stosunku do linii komórkowych niektórych

nowotworów (HL-60 i MCF-7) wykazały, że połączenia te były aktywne w stosunku do komórek ludzkiej białaczki promielocytowej i nieaktywne w stosunku do komórek zdrowych.

Otrzymano również wiele połączeń z bioaktywnymi cząsteczkami: betuliną oraz dehydroepiandrosteronem w pozycji *sn*-3 (rys. 6) [26, 27].



Rys. 6. Fosfolipidy zawierające betulinę i dehydroepiandrosteron w pozycji *sn*-3, R₁, R₂ = reszty kwasów tłuszczowych

Wiele farmaceutyków odznacza się niską rozpuszczalnością w wodzie oraz słabą przenikalnością przez błony. Proste i bardzo efektywne jest stosowanie kompleksów fosfolipid-lek. W metodzie tej wykorzystuje się najczęściej naturalne fosfolipidy izolowane z soi oraz aktywną substancję. Udowodniono, że kompleksy te charakteryzują się zwiększoną przepuszczalnością przez błony biologiczne, a przede wszystkim zmniejszają toksyczność leków oraz ułatwiają ich transport do komórek. Znane są takie połączenia z polifenolami, szczególnie flawonoidami czy niesteroidowymi lekami przeciwzapalnymi [19]. Wykazano, że kompleksy fosfolipid-resweratrol oraz fosfolipid-doksorubicyna mają aż o połowę zwiększoną aktywność w porównaniu do czystego leku [28].

4. Perspektywy

Zmieniając profil kwasów tłuszczowych w pozycjach *sn*-1 oraz *sn*-2, jesteśmy w stanie stworzyć zupełnie nową cząsteczkę o unikalnych właściwościach. Dotychczasowe badania potwierdzają skuteczność farmakologiczną niektórych preparatów. Modyfikacje pozycji *sn*-1 i/lub *sn*-2 oraz wbudowanie określonych związków biologicznie aktywnych nie zmienia amfifilowych właściwości glicerofosfolipidów i może poprawić transport do wnętrza komórek. Dzięki temu modyfikowane fosfolipidy mogą znaleźć zastosowanie w leczeniu nowotworów czy chorób neurode-

generacyjnych. Ponadto związki te nie kumulują się w organizmie, nie wchodzą w interakcje z innymi lekami i w zasadzie nie wykazują skutków ubocznych [29].

Fosfolipidy są substancjami endogennymi i zrozumienie ich przemian *in vivo* z pewnością pozwoli na dokładniejsze projektowanie oraz szersze ich stosowanie w leczeniu wielu schorzeń.

Literatura

- [1] Sourkes T.L. (2004) The discovery of lecithin, the first phospholipid, *Bull. Hist. Chem.* 29, 9–13.
- [2] Athenstaedt K., Daum G. (1999) Phosphatidic acid, a key intermediate in lipid metabolism, *Eur. J. Biochem.* 266, 1–16.
- [3] Paltauf F. (1994) Ether lipids in biomembranes, *Chem. Phys. Lipids* 74, 101–139.
- [4] Amate L., Ramirez M., Gil A. (1999) Positional analysis of triglycerides and phospholipids rich in long-chain polyunsaturated fatty acids, *Lipids* 34, 865–871.
- [5] Pacetti D., Hulan H.W., Schreiner M., Boselli E., Frega N.G. (2005) Positional analysis of egg triacylglycerols and phospholipids from hens fed diets enriched with refined seal blubber oil, *J. Sci. Food Agric.* 85, 1703–1714.
- [6] Van Hoogevest P., Wendel A. (2014) The use of natural and synthetic phospholipids as pharmaceutical excipients, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 116, 1088–1107.
- [7] Aneja R., Chadha J.S., Knaggs J.A. (1969) The use of *N*-tritylation in the partial synthesis of *O*-(1,2-diacyl-*sn*-glycero-3-phosphoryl) ethanolamines, *Biochim. Biophys. Acta* 187, 579–580.
- [8] Baer E. (1965) From the trioses to the synthesis of natural phospholipids: A research trail of forty years, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 42, 257–266.
- [9] Cubero Robles E., Van Den Berg D. (1969) Synthesis of lecithins by acylation of *O*-(*sn*-glycero-3-phosphoryl) choline with fatty acid anhydrides, *Biochim. Biophys. Acta* 187, 520–526.
- [10] Hermetter A., Stütz H., Franzmair R., Paltauf F. (1989) 1-*O*-Trityl-*sn*-glycero-3-phosphocholine: a new intermediate for the facile preparation of mixed-acid 1,2-diacylglycerophosphocholines, *Chem. Phys. Lipids* 50, 57–62.
- [11] Gupta C.M., Radhakrishnan R., Khorana H.G. (1977) Glycerophospholipid synthesis: improved general method and new analogs containing photoactivable groups, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 74, 4315–4319.
- [12] D'Arrigo P., Fasoli E., Pedrocchi-Fantoni G., Rossi C., Saraceno C., Tessaro D., Servi S. (2007) A practical selective synthesis of mixed short/long chains glycerophosphocholines, *Chem. Phys. Lipids* 147, 113–118.
- [13] Singh A. (1990) An efficient synthesis of phosphatidylcholines, *J. Lipid Res.* 31, 1522–1525.
- [14] Hendrickson H.S., Hendrickson E.K., Dybvig R.H. (1983) Chiral synthesis of a dithioester analog of phosphatidylcholine as a substrate for the assay of phospholipase A₂, *J. Lipid Res.* 24, 1532–1537.
- [15] Hendrickson H.S., Hendrickson E.K. (1990) A facile asymmetric synthesis of glycerol phospholipids via tritylglycidol prepared by the asymmetric epoxidation of allyl alco-

- hol. Thiolester and thioether analogs of phosphatidylcholine, *Chem. Phys. Lipids* 53, 115–120.
- [16] Dijkman R., Dekker N., De Haas G.H. (1990) Competitive inhibition of lipolytic enzymes. II. Preparation of ‘monoacylamino’ phospholipids, *Biochem. Biophys. Acta* 1043, 67–74.
- [17] Huang Z., Szoka F.C. Jr. (2008) Sterol-modified phospholipids: cholesterol and phospholipid chimeras with improved biomembrane properties, *J. Am. Chem. Soc.* 130, 15702–15712.
- [18] Draus A.W., Wawrzęńczyk C. (2014) Fosfatydyloseryna – występowanie, otrzymywanie i właściwości biologiczne, [w:] *Na pograniczu chemii i biologii*, red. H. Koroniak, J. Barciszewski, Wyd. Nauk. UAM, Poznań, t. XXIX, 33–41.
- [19] Li J., Wang X., Zhang T., Wang Ch., Huang Z., Luo X, Deng Y. (2015) A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems, *Asian J. Pharm. Sci.* 10, 81–98.
- [20] Eibl H. (1980) Synthesis of glycerophospholipids, *Chem. Phys. Lipids* 26, 405–429.
- [21] Kurz M., Scriba G.K.E. (2000) Drug-phospholipid conjugates as potential prodrugs: synthesis, characterization and degradation by pancreatic phospholipase A2, *Chem. Phys. Lipids* 107, 143–157.
- [22] Watson D.S., Huang Z., Szoka F.C. Jr. (2009) All-trans retinoic acid potentiates the antibody response in mice to a lipopeptide antigen adjuvanted with liposomal lipid A, *Immunol. Cell Biol.* 87, 630–633.
- [23] Shanker Kaki S., Balakrishna M., Prasad R.B.N. (2014) Enzymatic synthesis and characterization of 1-lipoyl-2-palmitoyl phosphatidylcholine: A novel phospholipid containing lipoic acid, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 116, 1347–1353.
- [24] Hostetler K.Y., Parkert S., Sridhart C.N., Martins M.J., Li J., Stuhmiller L.M., Van Wijk G.M.T., Van Den Bosch H., Gardner M.F., Aldern K.A., Richman D.D. (1993) Acyclovir diphosphate dimyristoylglycerol: a phospholipid prodrug with activity against acyclovir-resistant Herpes simplex virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 11835–11839.
- [25] Niezgoda N., Mituła P., Kempńska K., Wietrzyk J., Wawrzęńczyk C. (2013) Synthesis of phosphatidylcholine with conjugated linoleic acid and studies on its cytotoxic activity, *Aust. J. Chem.* 66, 354–361.
- [26] Smuga D.A., Smuga M., Świzdor A., Panek A., Wawrzęńczyk C. (2010) Synthesis of dehydroepiandrosterone analogues modified with phosphatidic acid moiety, *Steroids* 75, 1146–1152.
- [27] Tubek B., Smuga D., Smuga M., Wawrzęńczyk C. (2012) Synthesis of 28-O-(1,2-diacyl-sn-glycero-3-phospho)-betulin, *Synth. Commun.* 42, 3648–3654.
- [28] Mukherjee K., Venkatesh M., Venkatesh P., Saha B.P., Mukherjee P.K. (2011) Effect of soy phosphatidylcholine on the bioavailability and nutritional health benefits of resveratrol, *Food Res. Int.* 44, 1088–1093.
- [29] Küllenberg D., Taylor L. A., Schneider M., Massing U. (2012) Health effects of dietary phospholipids, *Lipids Health Dis.* 11(3), 1–16.

BADANIA KONFORMACYJNE KWASU TREONUKLEINOWEGO Z WYKORZYSTANIEM METOD CHEMII TEORETYCZNEJ

JUSTYNA BEDNARKO, JUSTYNA WIELIŃSKA, BEATA LIBEREK,
ANDRZEJ NOWACKI

Wydział Chemii, Uniwersytet Gdański
ul. Wita Stwosza 63, 80-308 Gdańsk
e-mail: justyna.bednarko@phdstud.ug.edu.pl

Hasła do zapamiętania: THF, TNA, DNA, RNA, konformacja

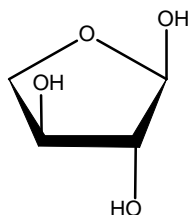
Wykaz skrótów:

THF – tetrahydrofuran
TNA – kwas treonukleinowy
DNA – kwas deoksyrybonukleinowy
RNA – kwas rybonukleinowy
ZPE – energia punktu zerowego

1. Wprowadzenie

Biogeneza jest nauką o powstaniu życia na Ziemi. Jest jednym z bardziej interesujących zagadnień nurtujących naukowców w ostatnich latach. Wiadomo, iż kwas deoksyrybonukleinowy (DNA), kwas rybonukleinowy (RNA) i białka są molekułami, które zapewniają przekazywanie informacji genetycznej pokoleniom. Nasuwa się jednak pytanie, czy te złożone cząsteczki organiczne mogły powstać samorzutnie? Obecnie zakłada się, że zarówno DNA, jak i RNA są cząsteczkami zbyt złożonymi, aby mogły powstać spontanicznie, w warunkach prymitywnych, jakie panowały na „młodej” Ziemi. Istnieje hipoteza, iż przodkiem DNA i RNA był TNA, czyli kwas treonukleinowy. Twórcą tej hipotezy jest Albert Eschenmoser [1].

Elementem strukturalnym TNA, do którego zakotwiczone są zasady nukleinowe i reszty fosforanowe, jest L-treoza (rys. 1), cukier o budowie prostszej niż deoksyryboza i ryboza, ponieważ jego szkielet składa się z czterech atomów węgla. W TNA jednostki cukrowe połączone są, za pośrednictwem reszty kwasu fosforowego, poprzez grupę hydroksylową na węglu C2 jednego pierścienia i grupę hydroksylową na węglu C3' drugiego pierścienia. W DNA i RNA analogiczne połączenie ma miejsce pomiędzy grupami hydroksylowymi na atomach węgla C3 i C5'. Istotne jest to, że grupy OH L-treozy są w położeniu *trans*, podobnie jak grupy 3'-OH i 4'-CH₂OH w deoksyrybozie i rybozie, dzięki czemu nić TNA może wykazywać duże podobieństwo strukturalne do DNA i RNA, a co za tym idzie – dobre dopasowanie tych struktur.



Rys. 1. α -L-Treofuranoza

W toku wieloletnich badań wypracowane zostały kryteria, które pozwalają zaklasyfikować biomolekuły jako hipotetyczne cząsteczki mające zdolność przekazywania informacji genetycznej [1]. Kryteria te są następujące:

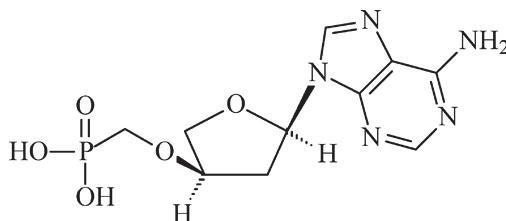
- zdolność do parowania zasad,
- zdolność do samodzielnej replikacji,
- zapis fenotypowy,
- właściwości katalityczne,
- potencjał do rozwoju.

Uważa się, że cząsteczka TNA odznacza się niektórymi z wymienionych właściwości i dlatego można ją uznać za potencjalną formę życia na Ziemi. Na przykład, istnieją doniesienia literaturowe, że kwas treonukleinowy może tworzyć komplementarne wiązania pomiędzy zasadami swojej nici, jak również z cząsteczkami DNA i RNA [2]. Przypuszcza się również, że TNA może mieć zdolność do samoreplikacji i samoorganizacji [1]. Są jednak badacze, którzy negują przypisywaną TNA rolę prekursora DNA i RNA [3].

W ostatnich latach naukowcy starają się dowieść, że kwas treonukleinowy, oprócz roli jaką przypuszczalnie odegrał w rozwoju życia na Ziemi,

ma właściwości, które można wykorzystać praktycznie. Naukowcy z Instytutu Biodesign ASU wykazali, iż w syntetycznych analogach tej „małej formy życia” istnieje wielki potencjał farmaceutyczny i leczniczy. TNA odznacza się wysoką odpornością na degradację nukleazami w porównaniu z naturalnie występującymi cząsteczkami DNA i RNA. Replikacja tej cząsteczki odbywa się zarówno z dużą wydajnością, jak i dokładnością. Warto w tym miejscu wspomnieć, iż TNA zastosowano jako aptamer nukleinowy do wiązania ze ściśle określonymi molekułami biologicznymi [4].

Grupa naukowców z Instytutu Chemii Medycznej i Laboratorium Wirusologii w Leuven w Belgii zajmowała się badaniem ośmiu fosforylowanych nukleotydów opartych na szkielecie treozy i deoksytreozy pod kątem aktywności antywirusowej. Wykazali oni, iż fosfonian treozyłowy nukleozydu adeniny (PMDTA) wykazuje działanie przeciwwirusowe wobec wirusa HIV (rys. 2) [5].



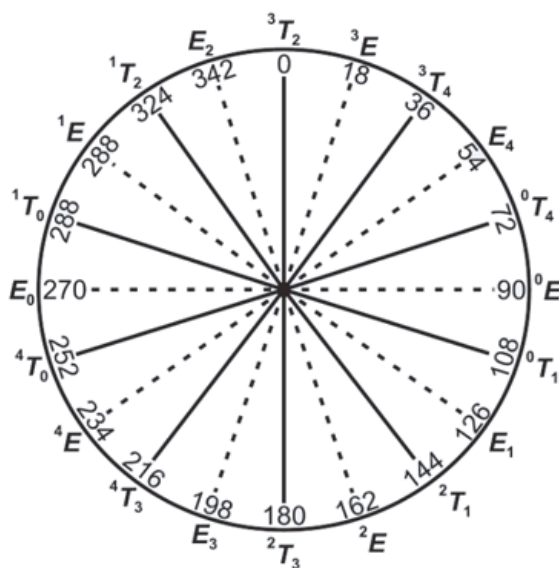
Rys. 2. Fosfonian treozyłowy nukleozydu adeniny (PMDTA) [5]

Z przedstawionych informacji, jak również coraz liczniejszych publikacji zamieszczonych w poczytnych periodykach naukowych, wynika, że tematyka ta jest aktualna i bardzo interesująca, dlatego postanowiliśmy włączyć się w nurt tych badań.

1.1. Konformacja pierścienia furanozowego

Pierścień THF (tetrahydrofuranu) może występować w dwóch odmianach konformacyjnych – kopertowej i skręconej. Jeśli pierścień THF nie jest podstawiony żadnymi grupami, możemy wyróżnić pięć nieidentycznych konformacji kopertowych oraz pięć nieidentycznych konformacji skręconych. Wprowadzenia do pierścienia furanozowego jednego lub więcej podstawników skutkuje podwojeniem liczby możliwych konformacji. Możemy więc wtedy wyróżnić 10 konformacji kopertowych i 10 konformacji skręconych. Opis wzajemnych przemian konformerów furanozy

przedstawiony został w postaci koła pseudorotacji (rys. 3). Nazwę konformeru tworzy się w sposób następujący: do symbolu określającego typ konformacji (E , T) dopisuje się indeksy cyfrowe wskazujące, który(e) z atomów znajduje(ją) się poza płaszczyzną pierścienia [6].



Rys. 3. Koło pseudorotacji pierścienia furanozowego

Konformacje pierścienia furanoidowego opisuje się za pomocą dwóch parametrów:

- 1) kąta fazowego pseudorotacji (P),
- 2) amplitudy pseudorotacji (maksymalny kąt torsyjny) (φ_m).

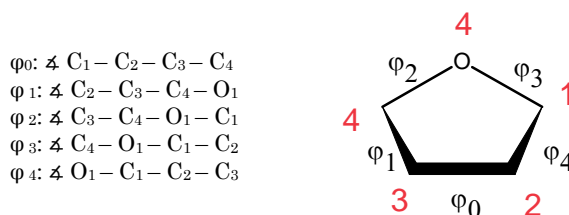
Aby wyznaczyć wartości kąta fazowego pseudorotacji, można skorzystać z następującego równania [7]:

$$\tan P = \frac{[(\varphi_4 + \varphi_2) - (\varphi_1 + \varphi_3)]}{2\varphi_0(\sin 36^\circ + \sin 72^\circ)}$$

kąty φ_0 , φ_1 , φ_2 , φ_3 , φ_4 , φ_5 są endocyklicznymi kątami torsyjnymi pierścienia THF (rys. 4).

Maksymalny kąt torsyjny możemy obliczyć z następującego równania [7]:

$$\varphi_m = \frac{\varphi_0}{\cos P}$$



φ_0 : \sphericalangle C₁-C₂-C₃-C₄
 φ_1 : \sphericalangle C₂-C₃-C₄-O₁
 φ_2 : \sphericalangle C₃-C₄-O₁-C₁
 φ_3 : \sphericalangle C₄-O₁-C₁-C₂
 φ_4 : \sphericalangle O₁-C₁-C₂-C₃

Rys. 4. Pierścień THF i jego kąty torsyjne

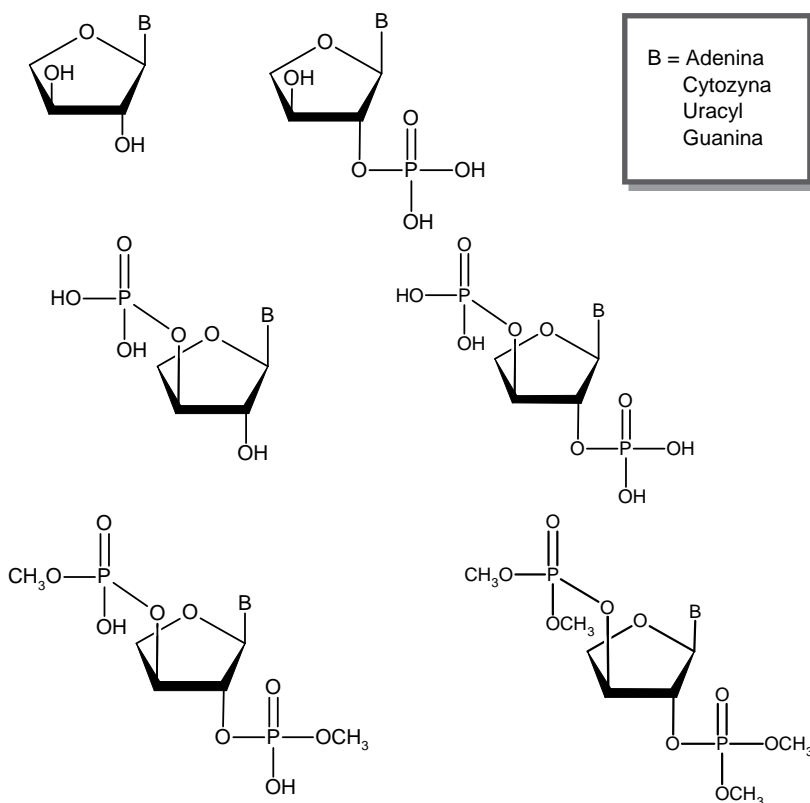
Wartość fazowego kąta pseudorotacji zawiera się w przedziale wartości od 0 do 360°. W wypadku kątów odpowiadających wartości 0° i 360° mamy do czynienia z tą samą konformacją. Wartość maksymalnego kąta torsyjnego jest równa promieniowi koła. Na środku okręgu wartość φ_m wynosi 0° (pierścień płaski).

Konformacja ma bardzo duży wpływ na właściwości fizyczne, biologiczne i chemiczne związków chemicznych. W systemach biologicznych konformacja przyjmowana przez białka i DNA ma decydujący wpływ na aktywność biologiczną. Niewielkie przypadkowe błędy konformacji DNA i białek prowadzą często do wielu chorób genetycznych.

2. Cel badań i realizacja

Strategicznym celem pracy jest zbadanie dopasowania strukturalnego nici TNA do komplementarnej nici DNA i RNA na podstawie metod obliczeniowych. Pierwszym etapem realizacji głównego celu jest przeprowadzenie pełnej analizy konformacyjnej sześciu struktur budulcowych nici TNA (rys. 4). Monomeryczne układy (cukier, zasada) również mogą wykazywać aktywność biologiczną, dlatego struktury te będą cennym obiektem moich początkowych badań. Elementy budulcowe nici TNA są związkami charakteryzującymi się znaczną swobodą konformacyjną, obejmującą zarówno ruchy wewnętrzne pierścienia furanozowego (pseudorotacja), jak i różne położenia przestrzenne podstawników dołączonych do tego pierścienia. Punktem wyjścia do realizacji założonego celu będzie zbudowanie czterech pierścieni furanozowych, różniących się między sobą wartością kąta pseudorotacji (o 90°). Ze wstępnych badań wiem, że takie podejście jest w zupełności wystarczające. Wybór jedynie czterech konformacji spośród możliwych 20 zapewnia pełen obraz preferencji konformacyjnych pierścienia THF badanych struktur.

Do tak przygotowanych struktur bazowych zostaną dołączone odpowiednie podstawniki. Następnie struktury te zostaną poddane optymalizacji w celu znalezienia formy pierścienia o najniższej energii. Dla każdej z form przeprowadzona zostanie analiza konformacyjna, uwzględniająca położenie przestrzenne grup względem pierścienia. Istotne jest, aby sprawdzić, jakie konformacje przyjmuje pierścień treofuranozy i jakie jest preferowane przestrzenne rozmieszczenie grup wokół pierścienia treozy.

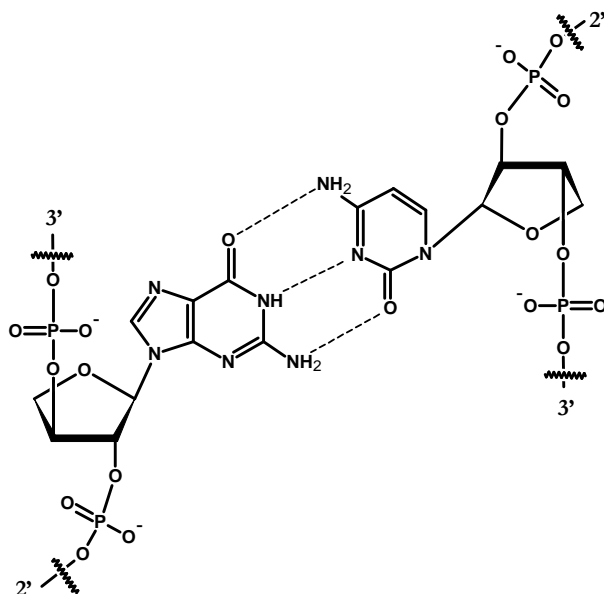


Rys. 5. Modelowe struktury pochodnych podjednostek TNA

Wstępne obliczenia pokazały skłonność układów do tworzenia wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych. Obecność tych wiązań w znacznym stopniu wpływała na konformacje pierścienia THF, jak i na orientację przestrzenną grup dołączonych do pierścienia (zasada, grupy hydroksylowe i reszty fosforanowe). Postanowiliśmy zbadać również układy, w których tworzenie tego typu wiązań nie jest możliwe. W tym celu dwie struk-

tury zostały zmodyfikowane poprzez dołączenie do cząsteczki dwóch lub czterech grup metylowych. Dodatkowo atom węgla grup $-OCH_3$ imituje węgle kolejnych podjednostek cukrowych w niciach.

Następnym krokiem będzie utworzenie i optymalizacja struktur zawierających zasadę nici TNA oraz komplementarną zasadę nici TNA, DNA i RNA. Dla przykładu zaprezentowano układ, który znajduje się poniżej.



Rys. 6. Fragment nici TNA o orientacji antyrównoległej z zasadami komplementarnymi guanina i cytozyna

Ostatni etap to zbadanie dopasowania struktur nici macierzystej złożonej z dwóch par zasad do nici komplementarnej.

3. Metodyka badań

Program Molden wykorzystano do przygotowania żądanych struktur TNA [8]. Struktury poddam optymalizacji z wykorzystaniem funkcjonału B3LYP [9] i dwóch baz: 6-31+G** oraz 6-311++G**. Funkcjonał

B3LYP jest funkcjonałem bardzo popularnym, o szerokim spektrum wykorzystania w obliczeniach większości układów, w szczególności cząsteczek organicznych. Obliczenia przeprowadzono w fazie gazowej, używając programu *Gaussian 03*.

Po przeprowadzeniu optymalizacji geometrii badanych struktur w fazie gazowej uzyskano energię całkowitą E_{tot} badanego układu. W celu otrzymania *ZPE* (wartości energii punktu zerowego) oraz $E_{(0-298)}$ (termicznej poprawki do energii) przeprowadzono analizę termochemiczną, opartą na przybliżeniu harmonicznym. Wynikiem sumy energii całkowitej E_{tot} oraz energii punktu zerowego *ZPE* jest skorygowana o wartość energii punktu zerowego energia E_0 . Wartości entalpii obliczono na podstawie równania: $H_{298} = E_{298} + RT$, gdzie: E_{298} to suma energii elektronowej i termicznej poprawki energii ($E_0 + E_{(0-298)}$). Na podstawie równania: $G_{298} = H_{298} - TS_{298}$ obliczono wartość energii swobodnej Gibbsa (suma termicznej energii swobodnej i energii elektronowej).

4. Spodziewane wyniki

W rezultacie początkowych obliczeń dla struktur budulcowych TNA, zawierających różne podstawniki, będzie można wskazać preferowane konformacje pierścienia cukrowego. Zestaw struktur o najkorzystniejszych ułożeniach pierścienia cukrowego i dołączonych grup będzie można wykorzystać na kolejnych etapach badań do określenia preferowanego ułożeniem nici macierzystej w stosunku do nici komplementarnej.

Literatura

- [1] Herdewijn P. (2001) TNA as a Potential Alternative to Natural Nucleic Acids, *Angew. Chem. Int. Ed.* 40, 2249–2251.
- [2] Pallan P.S., Wilds C.J., Wawrzak Z., Krishnamurthy R., Eschenmoser A., Egli M. (2003) Why Does TNA Cross-Pair More Strongly with RNA Than with DNA? An Answer From X-ray Analysis, *Angew. Chem. Int. Ed.* 42, 5893–589.
- [3] Yang Y.W., Zhang S., McCullum E.O., Chaput J.C. (2007) Experimental Evidence That GNA and TNA Were Not Sequential Polymers in the Prebiotic Evolution of RNA, *J. Mol. Evol.* 65, 289–295.
- [4] Chaput J.C., Hanyang Y., Zhang S. (2012) The Emerging World of Synthetic Genetics, *Chem. Biol.* 21, 1360–1371
- [5] Wu T., Froeyen M., Kempeneers V., Pannecouque Ch., Wang J., Busson R. Clercq E., Herdewijn P. (2005) Deoxythreosyl Phosphonate Nucleosides as Selective Anti-HIV Agents, *J. Am. Chem. Soc.* 127, 5056–5065.

-
- [6] Altona C., Sundaralingam M. (1972) Conformational Analysis of the Sugar Ring in Nucleosides and Nucleotides. A New Description Using the Concept of Pseudorotation, *J. Am. Chem. Soc.* 94, 8205–8212.
- [7] Taha H.A., Richards M.R., Lowary T.L. (2013) Conformational Analysis of Furanoside-Containing Mono- and Oligosaccharides, *Chem. Rev.* 113, 1851–1876.
- [8] Schaftenaar G., Noordik J.H. (2000) Molden: a pre- and post-processing program for molecular and electronic structures, *J. Comp.-Aided Mol. Design* 14, 123–134.
- [9] Becke A.D. (1993) Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange, *J. Chem. Phys.* 98, 5648–5652.

miast używane były częściej w medycynie ludowej niż jako produkty spożywcze [1]. W wielu placówkach państwowych i prywatnych instytutach badawczych na całym świecie prowadzone są obecnie badania nad składem chemicznym grzybów, ich właściwościami odżywczymi i prozdrowotnymi. Wzrost wiedzy na temat wpływu składników pokarmowych grzybów jadalnych na fizjologię organizmu człowieka pozwala na określenie ich mianem żywności funkcjonalnej [2–4].

2. Skład chemiczny grzybów

Grzyby składają się głównie z wody (ok. 90%) i suchej masy, która waha się w zależności od gatunku w granicach 6–14%. Ze względu na dużą zawartość wody wartość energetyczna grzybów jest niska i oscyluje w granicach 34–70 kcal/100 g świeżego produktu. Głównymi składnikami pokarmowymi występującymi w częściach jadalnych grzybów są: węglowodany, białka, tłuszcze (w tym nienasycone kwasy tłuszczowe), witaminy i minerały [1, 3–5].

Zakres zawartości białek w suchej masie owocnika jest szeroki, plasuje się w granicach 16,5–59% i zależy od gatunku [5]. Białka zawarte w grzybach są wysoce przyswajalne, a w ich skład wchodzi wszystkie aminokwasy egzogenne [3].

Węglowodany są dominującym składnikiem suchej masy owocników grzybów. Ich zawartość dochodzi do 74,3% dla maślaka ziarnistego (*Suillus granulatus*). Obecność chityny w ścianach komórkowych grzybów, której ludzki organizm nie trawi, zmniejsza dostęp do innych składników pokarmowych [3, 5].

W skład grzybów, jak wspomniano, wchodzi tłuszcze. Ich zawartość jest mniejsza niż w przypadku białek czy węglowodanów i wynosi 2–6% suchej masy, w zależności od gatunku. W skład tłuszczów spotykanych w grzybach wchodzi kwasy tłuszczowe, glicerydy, sterole i fosfolipidy [1, 3, 5].

Grzyby są bogatym źródłem składników mineralnych, stanowiących 56–70% popiołu. Zawartość składników mineralnych różni się nie tylko między gatunkami grzybów, ale również rozkłada się nierównomiernie w poszczególnych częściach owocników i zależy od poziomu zawartości pierwiastka w glebie [1, 5]. Głównymi składnikami mineralnymi oznaczonymi w grzybach są: sód (Na), potas (K), wapń (Ca), magnez (Mg), fosfor (P) i siarka (S). Dodatkowo pierwiastki występujące w ilościach śladowych to: Ag, Al, Ba, Cd, Co, Cr, Cs, Cu, Fe, Ga, Hg, Mn, Mo, Ni, Pb,

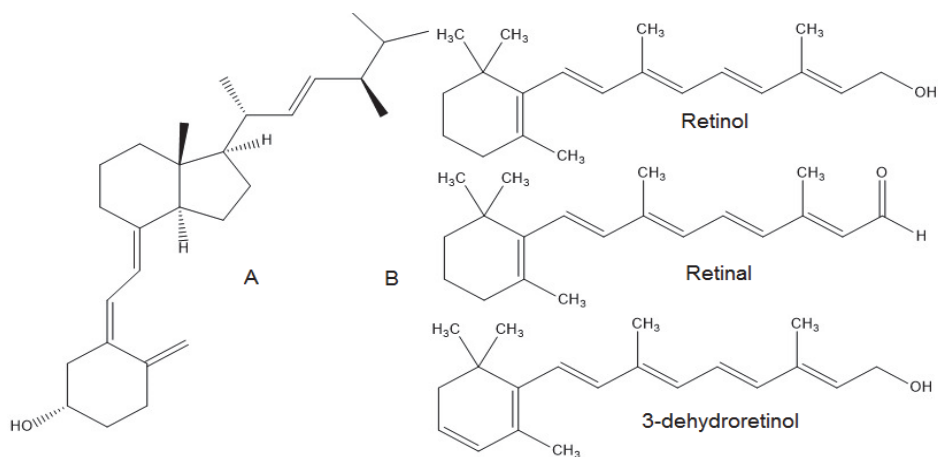
Rb, Sb, Se, Sr, Tl, V, Zn [6, 7]. Niektóre z nich to metale ciężkie, które grzyby dzięki enzymom, głównie oksydoreduktazom, pobierają z gleby i magazynują w owocnikach [1].

3. Witaminy w grzybach

W ostatnich latach pojawia się wiele nowych badań dotyczących zawartości witamin w grzybach, jednak dane dotychczasowo publikowane wciąż są niekompletne [4]. Owocniki grzybów są źródłem wszystkich witamin z grupy B, w szczególności kwasu foliowego, ryboflawiny i niacyny, dodatkowo kwasu askorbinowego, witaminy K i D, retinolu oraz tokoferolu [8]. Witaminy są związkami chemicznymi, w większości niestabilnymi pod wpływem działania podwyższonej temperatury, światła czy tlenu z powietrza [9]. Najwięcej wartości odżywczych znajduje się w grzybach świeżych, dlatego zalecane jest ich spożywanie wkrótce po zebraniu [10].

3.1. Witamina D

Niedobór witaminy D stanowi ogólnospołeczny problem dotyczący nie tylko osoby zamieszkujące części globu z niedużym rocznym dostępem do promieni słonecznych [11]. Wśród pacjentów badanych w szpitalach aż 57% przebadanych cierpi na niedobór witaminy D, a 27% ma znaczące jej braki [12]. Zapotrzebowanie na witaminę D wynosi 5 $\mu\text{g}/\text{d}$ dla osób dorosłych i 10 $\mu\text{g}/\text{d}$ dla osób starszych, dzieci poniżej 3. roku życia i kobiet w ciąży. W przeciągu ostatniej dekady prowadzone są badania nad wpływem ergokalcysterolu i cholekalcysterolu na optymalne zdrowie człowieka [11]. Zawartość witaminy D w grzybach zależy głównie od dostępu promieni słonecznych do rosnących osobników [10]. Najnowsze badania prowadzone na grzybach uprawnych dowodzą wzrostu zawartości witaminy D₂ (rys. 1A) po naświetlaniu zebranych okazów promieniowaniem UV-C o długości fali 254 nm. Promieniowanie UV-A o długości fali 366 nm nie ma już tak dużego wpływu na zawartość ergokalcysterolu. Naświetlanie promieniowaniem UV-C trwające 2 h prowadzi do wzrostu zawartości witaminy D₂ u *Agaricus bisporus* z 1,55 $\mu\text{g}/\text{g}$ s.m. do 14,03 $\mu\text{g}/\text{g}$ s.m. [13]. Badania Mattila na dwóch gatunkach grzybów, pieprznika jadalnego (*Cantharellus cibarius*) i trąbkowego (*Cantharellus tubaeformis*), dotyczące wpływu gotowania i mrożenia na zawartość ergokalcysterolu wykazują nieznaczny wpływ obu procesów na zawartość witaminy D₂, której ubytek wynosił 11,7 μg D₂/100 g s.m. i 1,9 μg D₂/100 g s.m. odpowiednio dla pieprznika jadalnego i trąbkowego [14].



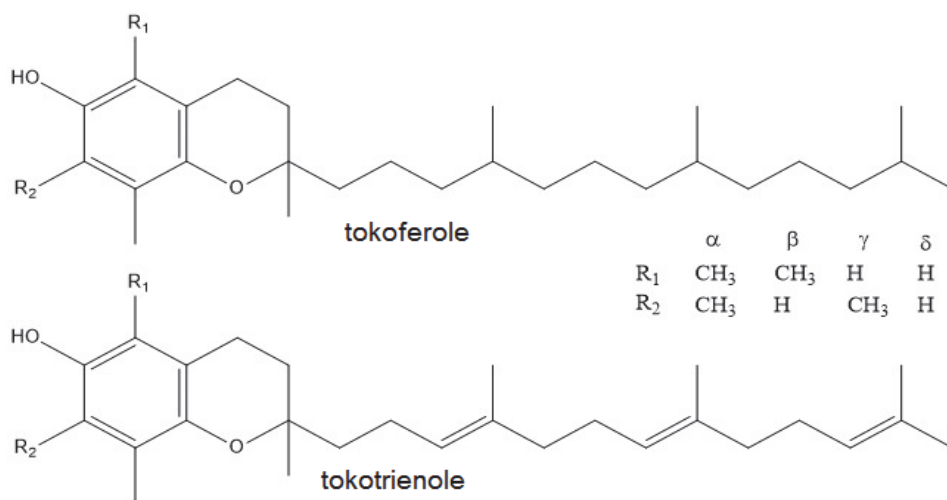
Rys. 1. A. Wzór strukturalny ergokalcysterolu. B. Wzory strukturalne witamin z grupy A

3.2. Witamina A

W skład witamin z grupy A (rys. 1B) wchodzi związki chemiczne rozpuszczalne w tłuszczach, zwane retinoidami [12]. Można je znaleźć w produktach pochodzenia zwierzęcego, żółtkach jaj, mięsie, rybach i grzybach [3, 12]. Odpowiedni poziom retinoli jest niezbędny do prawidłowych podziałów komórkowych, syntezy hormonów steroidowych, właściwego stanu nabłonka (różnicowanie, wzrost, rogowacenie), działa też przeciwnowotworowo [12, 15]. Niedobór witaminy A prowadzi do osłabienia układu immunologicznego, z czym wiąże się wzrost podatności na infekcje i zwiększona śmiertelność u osób chorych [16]. Hipowitaminoza A przyczynia się do kseroftalmii, ślepoty zmierzchowej i keratomolacji [12, 15]. Informacje na temat zawartości witaminy A w grzybach są niepełne. Jedyne dostępne dane dotyczą pieprznika jadalnego (*Cantharellus cibarius*), w którym oznaczona zawartość retinoli wynosiła 0,217 mg/100 g części jadalnej [3].

3.3. Witamina E

Tokoferole i tokotrienole (rys. 2) wykazują silne właściwości antyoksydacyjne, chroniąc przed wpływem wolnych rodników [12, 17]. Zapobiegają utlenianiu lipidowych błon komórkowych i lipoprotein niskiej gęstości (LDL) [12, 18]. Obecność witaminy E w grzybach, jak w przypadku witaminy A, jest nie do końca poznana. Z dostępnych danych wynika, że



Rys. 2. Wzory strukturalne tokoferoli i tokotrienoli

zawartość tej witaminy w grzybach w porównaniu z warzywami i olejami roślinnymi jest nieznaczna i wynosi 0,6 mg/100 g części jadalnej dla borowika szlachetnego (*B. edulis*) i 0,1 mg/100 g części jadalnej dla pieprznika jadalnego (*C. cibarius*) [3].

4. Oznaczanie witamin w grzybach przy użyciu wysokosprawnej chromatografii ciekowej (HPLC)

Oznaczanie ilościowe witamin sprawia wiele trudności ze względu na ich niestabilność pod wpływem czynników fizykochemicznych, jak również zawartość niewielkich ilości analitów w badanych próbkach. Grzyby stanowią skomplikowaną matrycę, dodatkowo witaminy w nich zawarte występują głównie w postaci związanej. W celu wydzielenia witamin rozpuszczalnych w tłuszczach z próbki przeprowadzone będzie zmydlenie i ekstrakcja w różnych warunkach (tab.).

Oznaczenie wyekstrachowanych analitów przeprowadzone będzie przy użyciu wysokosprawnej chromatografii ciekowej z detekcją spektrofotometryczną (UV/VIS) w odwróconym układzie faz, z zastosowaniem kolumny RP-C18. Przetestowane zostaną trzy rodzaje fazy ruchomej: metanol, układ woda (z dodatkiem kwasu trifluorooctowego – TFA) oraz metanol lub woda (z dodatkiem TFA) i acetonitryl. W wypadku dwóch ostat-

Tabela. Proponowane warunki zmydlania i ekstrakcji wykorzystywane przy oznaczaniu witamin rozpuszczalnych w tłuszczach zawartych w grzybach

Zmydlanie	Ekstrakcja	Literatura
8 g zhomogenizowanej próbki grzyba, 100 cm ³ etanolu, 1 g askorbinianu sodu, 0,04 g siarczku sodu, 12 g KOH, 50 cm ³ wody, 80°C przez 30 min	<i>n</i> -heksan 3 × 100 cm ³ , przemywanie wodą 4 × 100 cm ³	[19]
12 g zhomogenizowanej próbki grzyba, 30 cm ³ etanolu, 30 cm ³ metanolu, 0,1 g kwasu askorbinowego, 30 cm ³ 50% KOH, 100°C przez 30 min	Eter dietylowy 2 × 100 cm ³ , przemywanie wodą 4 × 50 cm ³	[19]
8 g zhomogenizowanej próbki grzyba, 100 cm ³ etanolu, 1 g kwasu askorbinowego, 50 cm ³ 50% KOH, 20°C przez 2 h	Mieszanina eteru naftowego i dietylowego (1 : 1), 2 × 200 cm ³ , przemywanie wodą 4 × 50 cm ³	[19]
24 g zhomogenizowanej próbki grzyba, 90 cm ³ etanolu, 0,5 g askorbinianu sodu, 30 cm ³ 60% KOH, 100°C przez 45 min pod chłodnicą zwrotną	Eter dietylowy 1 × 150 cm ³ , 3 × 75 cm ³ , przemywanie wodą 4 × 200 cm ³	[19]
0,2–2 g zhomogenizowanej próbki grzyba, 50 cm ³ metanolu, 0,03 g BHT, 50 cm ³ 30% KOH, 70°C przez 40 min	<i>n</i> -heksan 100 cm ³ , 60 cm ³ , 40 cm ³ , przemywanie wodą 4 × 100 cm ³	[20]
10 g zhomogenizowanej próbki grzyba, 70 cm ³ etanolu, 1 kwasu askorbinowego, 30 cm ³ 50% KOH, 50°C przez 40 min	Eter dietylowy 50 cm ³ , 30 cm ³ , 20 cm ³ , przemywanie wodą 2 × 200 cm ³	[20]

nich sprawdzone będą różne stosunki objętościowe eluentów. Detekcja spektrofotometryczna przeprowadzona będzie przy długości fali dla witaminy A $\lambda = 325$ nm, witaminy D₃ $\lambda = 254/265$ nm i witaminy E $\lambda = 280/290$ nm. Analiza ilościowa witamin zawartych w badanych próbkach wybranych gatunków grzybów przeprowadzona będzie przy użyciu metody wzorca wewnętrznego [19–21].

5. Perspektywy

Wiele placówek naukowych prowadzi obecnie badania dotyczące ilościowej i jakościowej zawartości witamin w różnych rodzajach grzybów jadalnych, jednak informacje na ten temat są wciąż niepełne. Brakuje również informacji na temat procedur analiz witamin w grzybach [4, 8]. Celem niniejszych badań jest opracowanie powtarzalnej metodyki analizy witamin A, D i E w próbkach grzybów.

Literatura

- [1] Rajewska J., Bałasińska B. (2004) Związki biologicznie aktywne zawarte w grzybach jadalnych i ich korzystny wpływ na zdrowie, *Post. Hig. Med. Dośw.* 58, 352–357.
- [2] Caglarirmak N. (2007) The nutrients of exotic mushrooms (*Lentinula edodes* and *Pleurotes* species) and an estimated approach to the volatile compounds, *Food Chem.* 105, 1188–1194.
- [3] Sas-Golak I., Sobieralski K., Siwulski M., Lisiecka J. (2011) Skład, wartość odżywcza oraz właściwości zdrowotne grzybów pozyskiwanych ze stanowisk naturalnych, *Problem Nauk Biol.* 60, 483–490.
- [4] Sanchez C. (2004) Modern aspects of mushroom culture technology, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64, 756–762.
- [5] Kalac P. (2009) Chemical composition and nutritional value of European species of wild growing mushrooms: A review, *Food Chem.* 113, 9–16.
- [6] Falandysz J., Kunito T., Kubota R., Bielawski L., Mazur A., Falandysz J.J., Tanabe S. (2007) Selected elements in Brown Birch Scaber Stalk *Leccinum scabrum*, *J. Environ. Sci. Health.* 42, 2081–2088.
- [7] Sanchez C. (2010) Cultivation of *Pleurotus ostreatus* and other edible mushrooms, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85, 1321–1337.
- [8] Turło J. (2013) Biotechnologia grzybów. Zastosowanie w farmacji i suplementacji, *Biul. Wydz. Farm. Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego* 3, 18–26.
- [9] Gregory J.F. (1985) Chemical changes of Vitamins during food processing, [w:] *Chemical changes in food during processing*, red. T. Richardson, J.W. Finley, Van Nostrand Reinhold Company, New York, 373–408.
- [10] Mattila P., Konko K., Euroala M., Pihlava J.-M., Astola J., Vahteristo L., Hietaniemi V., Kumpulainen J., Valtonen M., Piironen V. (2001) Contents of vitamins, mineral elements, and some phenolic compounds in cultivated mushrooms, *J. Agric. Food Chem.* 49, 2343–2348.
- [11] Grant W.B., Holick M.F. (2005) Benefits and Requirements of Vitamin D for Optimal Health: A Review, *Altern. Med. Rev.* 10, 94–111.
- [12] Fairfield K.M., Fletcher R.H. (2002) Vitamins for chronic disease prevention in adults, *J. Am. Med. Assoc.* 287, 3116–3127.
- [13] Teichmann A., Dutta P.C., Staffas A., Jagerstad M. (2007) Sterol and vitamin D₂ concentrations in cultivated and wild grown mushrooms: Effects of UV irradiation, *Food Sci. Technol.* 40, 815–822.
- [14] Mattila P., Ronkainen R., Lehtikoinen K., Piironen V. (1999) Effect of household cooking on the vitamin D content in fish, eggs, and wild mushrooms, *J. Food Comp. Anal.* 12, 153–160.
- [15] Bojarowicz H., Płowiec A. (2010) Wpływ witaminy A na kondycję skóry, *Probl. Hig. Epidemiol.* 91, 352–356.
- [16] Semba R.D. (1998) The role of vitamin A and related retinoids in immune function, *Nutr. Rev.* 56, 38–48.
- [17] Packer L. (1991) Protective role of vitamin E in biological systems, *Am. J. Clin. Nutr.* 53, 1050–1055.
- [18] Esterbauer H., Dieber-Rotheneder M., Striegl G., Waeg G. (1991) Role of vitamin E in preventing the oxidation of low density lipoprotein, *Am. J. Clin. Nutr.* 53, 314–321.

- [19] Rokayya S., Yang L., Baokun Q., Shengnan W., Qiaozhi Z., Feifei H., Ying M., Jing J., Lianzhou J. (2014) HPLC Analysis of Water-Soluble Vitamins (B2, B3, B6, B12 and C) and Fat-Soluble Vitamin (E, K, D, A and β -carotene) of Okra (*Abelmoschus esculentus*), *J. Chem.* 6.
- [20] Kumirska J., Gołębiowski M., Paszkiewicz M., Bychowska A. (2010) *Analiza żywności*, Wyd. Uniwersytetu Gdańskiego, Gdańsk, 198–204.
- [21] Nyireddy S. (2004) Separation strategies of plant constituents-current status, *J. Chromatogr. B* 812, 35–51.

WYKORZYSTANIE DWUWYMIAROWEJ CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ W ANALIZIE ZWIĄZKÓW FARMACEUTYCZNYCH W PRÓBKACH WÓD ŚRODOWISKOWYCH

EWELINA KIREJCZYK¹, PIOTR P. WIECZOREK²

¹ Instytut Ceramiki i Materiałów Budowlanych
Oddział Inżynierii Procesowej Materiałów Budowlanych
ul. Oświęcimska 21, 45-641 Opole

² Wydział Chemii, Uniwersytet Opolski
pl. Kopernika 11, 45-040 Opole,
e-mail: pwiecz@uni.opole.pl; e.kirejczyk@icimb.pl

Hasła do zapamiętania: chromatografia dwuwymiarowa, HILIC, farmaceutyki w wodach, chromatografia oddziaływań hydrofilowych, zanieczyszczenia wód i ścieków

Wykaz skrótów:

2DLC	– dwuwymiarowa chromatografia cieczowa
ACN	– acetonitryl
GC	– chromatografia gazowa
HILIC	– chromatografia oddziaływań hydrofilowych
HPLC	– wysokosprawna chromatografia cieczowa
IC	– chromatografia jonowa
IEC	– chromatografia jonowymienna
LC	– chromatografia cieczowa
LOD	– granica wykrywalności
LOQ	– granica oznaczalności
MDLC	– wielowymiarowa chromatografia cieczowa
MS	– spektroskopia mas
MS/MS	– spektroskopia tandemowa

NP	– układ faz normalnych
RP	– układ faz odwróconych
SSRI	– selektywne inhibitory wychwyty zwrotnego serotoniny

1. Wstęp

Związki farmaceutyczne to grupa substancji aktywnych biologicznie, o mniej lub bardziej złożonej budowie chemicznej. Lek składający się z substancji czynnej i substancji pomocniczej, wprowadzony do ustroju w ściśle określonej dawce prowadzi do osiągnięcia pożądanego efektu terapeutycznego [1]. Część leku jest metabolizowana przez organizm, pozostała część (10–90%) zostaje wydalana w postaci macierzystej lub w postaci metabolitów. Dynamiczny postęp w dziedzinie nauk biologiczno-chemicznych spowodował gwałtowny wzrost liczby nowych związków leczniczych, a tym samym ilość ich zażywania. Wciąż wzrastająca dystrybucja i eksploatacja związków farmaceutycznych spowodowała ich niekontrolowane przenikanie do środowiska naturalnego [2]. Jedno z pierwszych badań na obecność farmaceutyków w próbkach środowiskowych przeprowadzono w 1976 r. w Stanach Zjednoczonych, w którym stwierdzono obecność kwasu klofibrowego, leku regulującego gospodarkę lipidową [3]. W kolejnych latach podobne badania wykonano w wielu innych krajach, w tym także europejskich, gdzie poddano analizie próbki wód, ścieków i gleb. W próbkach stwierdzono znaczne ilości kilku grup leków, przede wszystkim były to antybiotyki, hormony, niesteroidowe leki przeciwzapalne, β -blokery oraz środki psychotropowe [4]. Głównym źródłem zanieczyszczeń naturalnego środowiska wodnego są tradycyjne oczyszczalnie ścieków, niemające odpowiednio przystosowanych systemów oczyszczania dla tego rodzaju związków. Związki farmaceutyczne trafiające do kanalizacji pochodzą głównie z gospodarstw domowych, szpitali i hodowli zwierząt. Po procesach oczyszczania ścieki zawierające związki farmaceutyczne trafiają bezpośrednio do wód powierzchniowych. Pomimo że związki te występują w ilościach śladowych, ze względu na ich wysoką aktywność biologiczną mogą stanowić zagrożenie dla organizmów wodnych. Dodatkowo wysoka stabilność, jaką wykazują w środowisku wodnym, powoduje, że są długotrwale w nim utrzymywane, często prowadząc do bioakumulacji. Ten fakt pośrednio wpływa również na zagrożenie dla zdrowia i życia człowieka. Na dzień dzisiejszy trudno z całą pewnością stwierdzić, jakie następstwa niesie z sobą obecność farmaceutyków w środowisku. Aktualnie wiadomo, że związki hormonalne z grupy estrogenów są przyczyną za-

Tabela. Związki farmaceutyczne najczęściej oznaczane w próbkach wód i ścieków [4, 6, 7]

Rodzaj	Grupa	Substancja aktywna
Leki hormonalne	estrogeny	estradiol, etyloestradiol, estrol, estron
Leki przeciwbólowe i przeciwzapalne	niesteroidowe leki przeciwzapalne	ibuprofen, naproksen, paracetamol, diklofenak, ketoprofen, kwas acetylosalicylowy
Leki psychotropowe	selektywne inhibitory wychwyty zwrotnego serotoniny	fluoksetyna, citalopram, setralina
Antybiotyki	β -laktamy	ampicylina, amoksycylina, oksacyklina, cefalosporyny
	tetracykliny	tetracyklina, oksytetracyklina, doksy cyklina
	fluorochinolony	norfloksacyna, ciprofloksacyna, ofloksacyna, pefloksacyna
	sulfonoamidy	sulfaguanidyna, sulfafurazol, sulfacetamid, sulfakarbamid
	makrolidy	erytromycyna
Leki nasercowe	β -blokery	metoprolol, atenolol, propranolol
Leki przeciwpadaczkowe	pochodne dibenzoazepiny	karbamazepina

burzeń funkcji rozrodczych wielu gatunków ryb [4], natomiast szeroko stosowane w lecznictwie i weterynarii antybiotyki powodują wzrost lekooporności bakterii chorobotwórczych, co może doprowadzić do nieodwracalnych zmian w środowisku wodnym [5].

2. Metody oznaczania związków farmaceutycznych w próbkach wód środowiskowych

Związki farmaceutyczne to grupa substancji o bardzo zróżnicowanym charakterze chemicznym. Dostosowanie odpowiednio selektywnej i czułej procedury analitycznej umożliwiającej oznaczenie szerszego spektrum substancji jest trudnym i długotrwałym procesem. Bardzo niski poziom stężeń oraz złożoność matrycy, jakimi są woda środowiskowa czy ścieki, stanowi dodatkowe utrudnienie. W analizie wód wykorzystuje się głównie techniki chromatograficzne w połączeniu z różnymi metodami ekstrakcji. Pierwszym i bardzo istotnym etapem analitycznym jest procedura przygotowania próbki obejmująca wydzielanie, oczyszczenie i wzbogacenie pożądaných analitów. Kolejnym krokiem jest dobranie odpo-

wiedniej metodyki analitycznej, jej optymalizacji oraz sposobu detekcji. W analizie związków farmaceutycznych głównie wykorzystuje się dwa rodzaje chromatografii: chromatografię gazową (GC) i chromatografię cieczową (LC) [6]. Większość farmaceutyków ulega rozkładowi w warunkach wysokotemperaturowych, z tego powodu zastosowanie chromatografii gazowej jest możliwe dopiero po przeprowadzeniu derywatywacji, w wyniku której uzyskane pochodne wykazują stabilność w warunkach prowadzonej analizy. Otrzymane wyniki często obciążone są dodatkowym błędem wynikającym z wydajności reakcji chemicznej otrzymywania derywatów. W chromatografii cieczowej derywatywacja jest rzadko stosowana, niekiedy wykorzystuje się ją w celu poprawienia selektywności i czułości metody lub w wypadku analizy związków niemających właściwości umożliwiających detekcję [8].

3. Zastosowanie chromatografii cieczowej w analizie związków farmaceutycznych

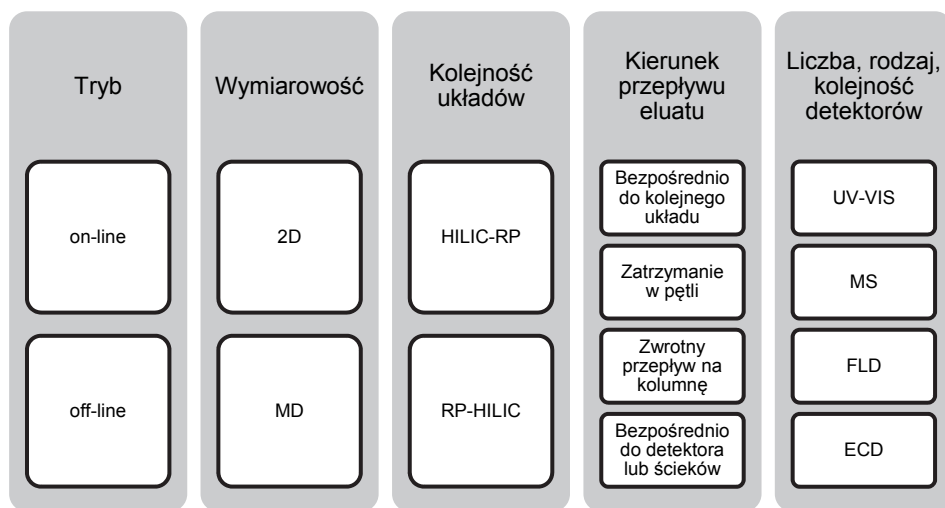
W chromatografii cieczowej mechanizm rozdziału analitów jest uwarunkowany rodzajem zastosowanych faz tworzących układ chromatograficzny, głównie opierających się na oddziaływaniach o charakterze adsorpcyjnym (NP, RP) lub jonowymiennych (IC, IEC). Stosunkowo nowy rodzaj chromatografii – chromatografia oddziaływań hydrofilowych (HILIC) wykorzystuje cechy pośrednie pomiędzy NPLC, RPLC i IC. Podobnie jak w NP w HILIC fazę stacjonarną stanowi hydrofilowe złożo, którym może być żel krzemionkowy, żel krzemionkowy modyfikowany grupami hydroksylowymi, aminowymi, amidowymi, cyjanowymi lub hydrofilowy sorbent polimerowy. Fazą ruchomą jest mieszanina polarnych rozpuszczalników organicznych ze znacznie mniejszą ilością wody lub wodnego roztworu buforowego. Wzrost zawartości wody w elucencie powoduje wzrost siły elucyjnej fazy ruchomej. Rozdział zachodzi pomiędzy cienką warstwą wody zaadsorbowanej i unieruchomionej na fazie stacjonarnej a polarnym rozpuszczalnikiem organicznym fazy ruchomej. W warunkach względnie wysokich zawartości wody mechanizm rozdziału opiera się głównie na oddziaływaniach hydrofilowych, o charakterze podziałowo-adsorpcyjnym. Dodatkowy wpływ na efekt rozdziału mają także oddziaływania adsorpcyjne i jonowymiennie pomiędzy analitami a fazą stacjonarną. Wpływ poszczególnych oddziaływań zależy od składu fazy ruchomej, rodzaju fazy stacjonarnej i charakteru analitów [9–12]. Technika HILIC jest metodą umożliwiającą rozdział związków o charakterze

hydrofilowym, średnio hydrofobowym, związków jonowych i niejonowych. Wiele z tych właściwości pozwala na wytypowanie tej metody, jako preferencyjnej do oznaczania związków farmaceutycznych [8].

4. Dwuwymiarowa chromatografia cieczowa (2DLC) w analizie związków farmaceutycznych

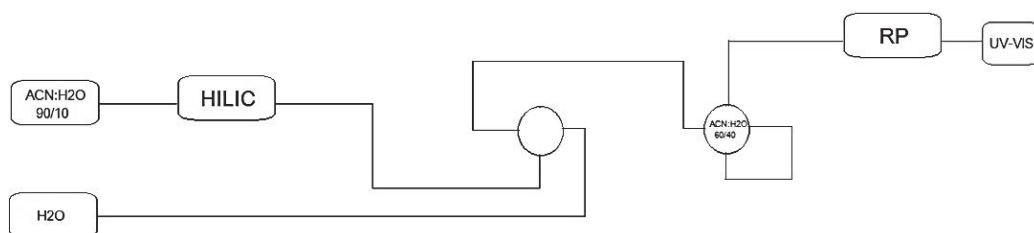
Woda środowiskowa zawiera pełne spektrum różnorodnych substancji różniących się powinowactwem, wielkością cząsteczek, charakterem jonowym, zarówno tych będących celem badań, jak i pozostałych, mogących wpływać na formę ich występowania. Farmaceutyki dzielą się głównie na związki hydrofilowe, hydrofilowe w postaci jonowej oraz hydrofobowe. Jednoetapowa analiza z wykorzystaniem jednej z technik LC nie jest w pełni wystarczająca do uzyskania pełnego rozdziału mieszaniny o zróżnicowanym składzie. Do rozdziału próbek zawierających związki farmaceutyczne o odmiennych właściwościach stosuje się chromatografię wielowymiarową (MDLC). Chromatografia wielowymiarowa łączy co najmniej dwie techniki rozdziału w jednoetapowej analizie [13]. MDLC w zależności od możliwości aparaturowych, rodzaju użytych układów oraz składu próbki umożliwia prowadzenie analizy przy wielu zmiennych, takich jak: tryb przepływu próbki, liczba, rodzaj, rozmieszczenie układów, kierunek przepływu eluatu oraz liczba, rodzaj i rozmieszczenie detektorów (rys. 1). Przepływ próbki pomiędzy układami może odbywać się w trybie *on-line* lub *off-line*. W trybie *on-line* próbka stale przebywa w systemie chromatograficznym, a jej przemieszczanie się pomiędzy układami zachodzi automatycznie, natomiast w trybie *off-line* próbka po pierwszym rozdziale jest manualnie odbierana i wprowadzana do kolejnego. Kluczowym elementem tej techniki jest prawidłowo zaplanowany rozkład układów oraz kierunki i czasy przepływu fazy ruchomej. Kolejność układów musi umożliwiać zmianę składu fazy ruchomej wymaganej do rozdziału w kolejnych wymiarach. Anality po opuszczeniu pierwszego wymiaru mogą być kierowane bezpośrednio do kolejnego układu lub detektora, zatrzymywane w pętli, ponownie zawracane do układu lub usuwane do ścieków. W zależności od liczby układów i stopnia złożoności próbki, manewrując kierunkiem przepływu odpowiednich frakcji, istnieje możliwość zoptymalizowania metody dającej oczekiwany rezultat.

Metoda oznaczenia różnych klas farmaceutyków musi być wysoce selektywna. Prowadzone badania ciągle zmierzają do opracowania techniki niewymagającej zastosowania skomplikowanej i drogiej aparatury. Detekcja przy użyciu spektroskopii mas (MS) jest metodą umożliwiającą ozna-

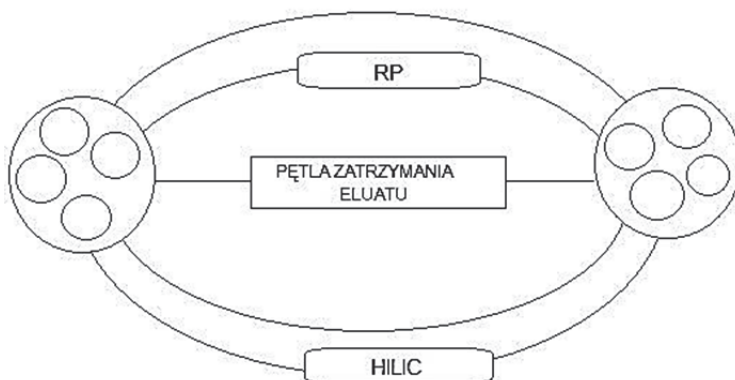


Rys. 1. Plan teoretyczny warunków prowadzenia wielowymiarowych analiz LC

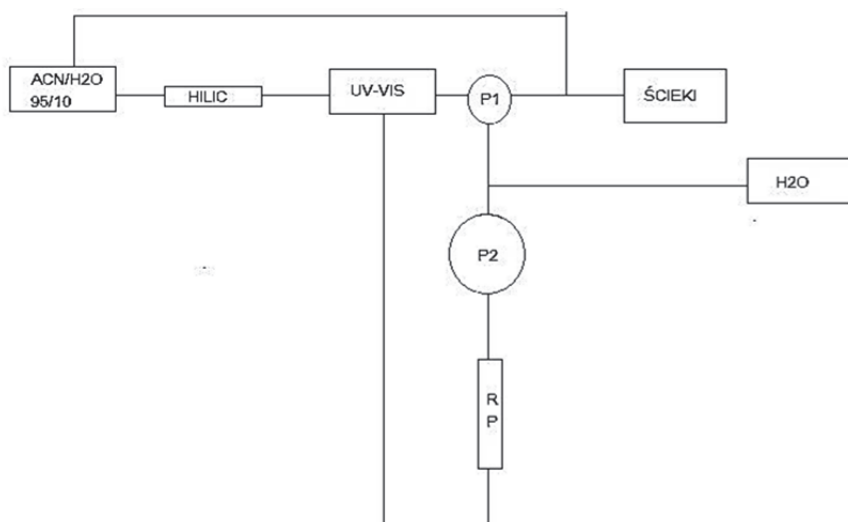
czenia ilościowe i jakościowe analitów na bardzo niskim poziomie stężeń, jednak wysoki koszt aparatury oraz eksploatacji uniemożliwia powszechne jej zastosowanie. W klasycznej chromatografii cieczowej wykorzystywane są najczęściej detektory UV-VIS o znacznie niższej czułości, w której jedynym potwierdzeniem jakościowym uzyskanych wyników jest wartość współczynnika retencji (k_R) wzorca. Uzyskanie dużej liczby sygnałów o bardzo zbliżonych wartościach k_R może uniemożliwić jednoznaczną interpretację otrzymanych wyników. Związki farmaceutyczne należące do samej grupy leków często mają bardzo podobną strukturę, a ich wartości k_R są zbliżone. Przeprowadzanie rozdzielów na większej liczbie złożeń pozwala dostatecznie rozdzielić i zidentyfikować obie substancje. Jednoetapową metodą oznaczania kilku grup farmaceutyków może być stosunkowo prosty układ – *on-line* HILIC-RP-HPLC-UV-VIS. Dla próbek o niskich stężeniach analitów w celu maksymalnego ograniczenia błędów najlepszym rozwiązaniem jest zastosowanie trybu *on-line*, który eliminuje ewentualne straty związane z procesem przenoszenia próbki. Wstępnego rozdzielu analitów o właściwościach hydrofobowych i hydrofilowych dokonuje się w układzie HILIC. Związki silnie hydrofobowe praktycznie nie oddziałują z kolumną chromatograficzną i są wymywane w czasie zbliżonym do czasu martwego, pozostałe związki o charakterze mniej lub bardziej hydrofilowym rozdzielają się na złożu. Eluat zawierający anality silnie hydrofobowe kierowany jest do kolejnego układu – RP.



Rys. 2. Plan teoretyczny *on-line* HILIC-RP-HPLC-UV-VIS



Rys. 3. Plan teoretyczny HILIC-RP-HPLC z wykorzystaniem pętli zatrzymania eluatu [17]



Rys. 4. Plan teoretyczny HILIC-RP-HPLC-UV-VIS z wykorzystaniem zwrotnego przepływu eluatu na kolumnę

Faza ruchoma z wysoką zawartością rozpuszczalnika organicznego z pierwszego wymiaru jest mieszana w układzie pomp z wodą w celu uzyskania odpowiedniego składu do rozdzielania w RP. Związki o mniej hydrofilowym charakterze, które nie zostały dostatecznie rozdzielone na kolumnie HILIC, są kierowane do ponownego rozdzielania na kolumnę RP, pozostałe po opuszczeniu detektora UV-VIS trafiają do ścieków [14–20].

5. Zalety wykorzystania HILIC-RP-HPLC-UV-VIS w oznaczaniu związków farmaceutycznych w próbkach wód i ścieków

Zastosowanie dwuwymiarowej chromatografii cieczowej daje możliwość wykorzystania dwóch technik rozdzielania analitów podczas jednoetapowej analizy. Chromatografia oddziaływań hydrofilowych (HILIC), opierająca się na oddziaływaniach hydrofilowych oraz jonowymiennych, doskonale sprawdza się w analizie związków polarnych występujących w postaci obojętnej lub jonowej. Wysoka zawartość rozpuszczalnika organicznego w fazie ruchomej umożliwia połączenie jej z chromatografią faz odwróconych (RP) w trybie *on-line* poprzez zwiększenie ilości wody w eluencie. Odpowiedni program przepływu próbki i jej poszczególnych frakcji umożliwia pełen rozdział analitów o zróżnicowanym charakterze fizykochemicznym podczas jednoetapowej analizy. Zastosowanie trybu *on-line* zapobiega powstawaniu błędów wynikających z ewentualnych strat w trakcie przenoszenia próbki między układami, a także pozwala na zautomatyzowanie metody, skrócenie czasu analizy i zminimalizowanie ingerencji analityka. Wykorzystanie spektroskopii UV-VIS sprawia, że opracowana metoda staje się łatwo dostępna i może znaleźć zastosowanie w tradycyjnych laboratoriach środowiskowych. Wadą w porównaniu do MS czy MS/MS są wyższe granice wykrywalności (LOD) i oznaczalności (LOQ), a także brak pewności uzyskanych wyników dla próbek o bardzo złożonym składzie. W sytuacji, gdy liczba pików na chromatogramie jest zbyt wysoka, a ich współczynniki retencji są bardzo zbliżone, jednoznaczna interpretacja wyników może być niemożliwa. Wyjściem z tej sytuacji jest zrewalidowanie metody poprzez zmianę warunków elucji w taki sposób, by odległości pomiędzy pikami stały się większe, a sygnał pochodzący od wzorca był jednoznaczny. Podczas walidacji warto wykorzystać MS w celu potwierdzenia poprawności metody.

6. Podsumowanie

Opracowanie i zwalidowanie jednoetapowej metody pozwalającej na uzyskanie szybkiego, ogólnego stanu jakościowego i ilościowego wód środowiskowych i ścieków pod kątem zanieczyszczeń farmaceutykami przyczyniłoby się do możliwości stałego kontrolowania ich zawartości w środowisku naturalnym. Wykorzystanie chromatografii dwuwymiarowej opartej na dwóch technikach, takich jak HILIC i RP, umożliwia rozdział analitów o odmiennym powinowactwie. Wykorzystanie detektorów UV-VIS nie wymaga wielkich nakładów finansowych, dzięki czemu metoda staje się łatwo dostępna dla klasycznych laboratoriach środowiskowych. Technika *on-line* HILIC-RP-HPLC-UV-VIS mogłaby być powszechnie stosowana przez laboratoria środowiskowe w monitoringu wód i ścieków.

Literatura

- [1] Dz.U. 2001 Nr 126 poz. 1381
- [2] Nuijs A.L.N., Tarcomnicu I., Covaci A. (2011) Application of hydrophilic interaction chromatography for the analysis of polar contaminants in food and environmental samples, *J. Chromatogr. A* 1218, 5964–5974.
- [3] Nikolaou A., Meric S., Fatta D. (2007) Occurrence patterns of pharmaceuticals in water and wastewater environments, *Anal. Bioanal. Chem.* 387, 1225–1234.
- [4] LaFleur A.D., Schug K.A. (2011) A review of separation methods for the determination of estrogens and plastics-derived estrogen mimics from aqueous systems, *Anal. Chim. Acta* 696, 6–26.
- [5] Moema D., Nindi M.M., Dube S. (2012) Development of a dispersive liquid–liquid microextraction method for the determination of fluoroquinolones in chicken liver by high performance liquid chromatography, *Anal. Chim. Acta* 730, 80–86.
- [6] Rao R.N., Nagaraju V. (2003) An overview of the recent trends in development of HPLC methods for determination of impurities in drugs, *J. Pharmaceut. Biomed.* 33, 335–377
- [7] Szymonik A., Lach J. (2012) Zagrożenie środowiska wodnego obecnością środków farmaceutycznych, *Inż. Ochr. Środ.* 15(3), 249–263.
- [8] Nuijs van A.L.N., Tarcomnicu I., Covaci A. (2011) Application of hydrophilic interaction chromatography for the analysis of polar contaminants in food and environmental samples, *J. Chromatogr. A* 1218, 5964–5974.
- [9] Buszewski B., Noga S. (2012) Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) – a powerful separation technique, *Anal. Bioanal. Chem.* 402, 231–247.
- [10] Dejaegher B., Heyden Y.V. (2010) HILIC methods in pharmaceutical analysis, *J. Sep. Sci.* 33, 698–715.
- [11] McCalley D.W. (2008) Evaluation of the properties of a superficially porous silica stationary phase in hydrophilic interaction chromatography, *J. Chromatogr. A* 1193, 85–91.

- [12] Kahsay G., Song H., Van Schepdael A., Cabooter D., Adams E. (2014) Hydrophilic interaction chromatography (HILIC) in the analysis of antibiotics, *J. Pharmaceut. Biomed.* 87, 142–154.
- [13] Sweeney A.P., Shalliker R.A. (2002) Development of a two-dimensional liquid chromatography system with trapping and sample enrichment capabilities, *J. Chromatogr. A* 968, 41–52.
- [14] Rezaadoost H., Ghassempour A. (2011) Two-dimensional Hydrophilic Interaction/Reversed-phase Liquid Chromatography for the Preparative Separation of Polar and Non-polar Taxanes, *Phytochem. Analysis* 23, 164–170.
- [15] Jandera P. (2008) Stationary phases for hydrophilic interaction chromatography, their characterization and implementation into multidimensional chromatography concepts, *J. Sep. Sci.* 31, 1421–1437.
- [16] García-Gómez D., Rodríguez-Gonzalo E., Carabias-Martínez R. (2015) Design and development of a two-dimensional system based on hydrophilic and reversedphase liquid chromatography with on-line sample treatment for the simultaneous separation of excreted xenobiotics and endogenous metabolites in urine, *Biomed. Chromatogr.* 29(8), 1190–1196.
- [17] Cabooter D., Choikhet K., Lestremau F., Dittmann M., Desmet G. (2014) Towards a generic variable column length method development strategy for samples with a large variety in polarity, *J. Chromatogr. A* 1372, 174–186.
- [18] Verlicchi P., Galletti A., Petrovic M., Barceló D., Al Aukidy M., Zambello E. (2013) Removal of selected pharmaceuticals from domestic wastewater in an activated sludge system followed by a horizontal subsurface flow bed – Analysis of their respective contributions, *Sci. Total. Environ.* 454, 411–425.
- [19] Xiao W.-B., Jian Y., Li H. (2014) Application of Two-dimensional Liquid Chromatography in Bioanalysis of Drugs and Toxicants, *Chinese J. Anal. Chem.* 42(12), 1851–1858.
- [20] Duarte R.M.B.O., Barros A.C., Duarte A.C. (2012) Resolving the chemical heterogeneity of natural organic matter: New insights from comprehensive two-dimensional liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1249, 138–146.

METODY PRZYGOTOWANIA PRÓBEK O ZŁOŻONYM SKŁADZIE MATRYCY DO OZNACZANIA KSENOBIOTYKÓW

KAROLINA KUCAB*, PIOTR P. WIECZOREK

Katedra Chemii Analitycznej i Ekologicznej, Wydział Chemii, Uniwersytet Opolski
ul. Oleska 48, 45-052 Opole

* e-mail: kkucab@uni.opole.pl

Hasła do zapamiętania: ksenobiotyki, metody przygotowania próbek, analiza próbek środowiskowych, techniki ekstrakcyjne, PPCPs

Wykaz skrótów:

EDCs	– związki endokrynne (<i>Endocrine Disrupting Compounds</i>)
PPCPs	– farmaceutyki i produkty higieny osobistej (<i>Pharmaceuticals and Personal Care Products</i>)
NOM	– naturalna materia organiczna (<i>Natural Organic Matter</i>)
CE	– elektroforeza kapilarna (<i>Capillary Electrophoresis</i>)
HPLC	– wysokosprawna chromatografia cieczowa (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
GC	– chromatografia gazowa (<i>Gas Chromatography</i>)
MS	– spektrometria mas (<i>Mass Spectrometry</i>)
DAD	– detektor z matrycą diodową (<i>Diode Array Detector</i>)
ECD	– detektor wychwytu elektronów (<i>Electron Capture Detector</i>)
FID	– detektor płomieniowo-jonizacyjny (<i>Flame Ionization Detector</i>)
LLE	– ekstrakcja ciecz-ciecz (<i>Liquid-Liquid Extraction</i>)
SPE	– ekstrakcja do fazy stałej (<i>Solid-Phase Extraction</i>)
MIPs	– polimery z wdrukowanym śladem cząsteczki (<i>Molecularly Imprinted Polymers</i>)
SPME	– mikroekstrakcja do fazy stacjonarnej (<i>Solid-Phase Microextraction</i>)
DLLME	– dyspersyjna mikroekstrakcja w układzie ciecz-ciecz (<i>Dispersive Liquid-Liquid Microextraction</i>)

- DLLME-SFO – dyspersyjna mikroekstrakcja w układzie ciecz-ciecz oparta na zestaleniu kropli organicznego rozpuszczalnika (*Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Based on Solidification of Floating Organic Drop*)
- SLM – immobilizowane membrany ciekłe (*Supported Liquid Membranes*)
- MMLLE – ekstrakcja przy użyciu mikroporowatych membran w układzie ciecz-ciecz (*Microporous Membrane Liquid-Liquid Extraction*)
- LOD – limit detekcji (*Limit of Detection*)

1. Wstęp

W ostatnich latach ksenobiotyki stały się jednym z głównych tematów badań w naukach przyrodniczych ze względu na ich stałe przedstawianie się do środowiska i potencjalnie szkodliwe skutki dla zdrowia ludzkiego. Wiele z tych substancji powszechnie występuje w naszym otoczeniu oraz może się w nim utrzymywać przez miesiące i lata [1]. Ich absorpcja ze środowiska zewnętrznego do wewnętrznego może zachodzić poprzez oddychanie, skórę oraz spożywanie skażonej żywności [2]. Do środowiska zewnętrznego natomiast wnikają głównie poprzez ścieki komunalne, rolnicze i przemysłowe, a stamtąd przedostają się do wód powierzchniowych i gruntowych [3]. Ponadto, większość tych związków nie podlega programom rutynowego monitorowania, tak więc ich analiza oraz badania toksyczności mogą być wykorzystane do przyszłych regulacji prawnych, a tym samym przyczynić się do ochrony środowiska i ludzi [5].

Pojęcie ksenobiotyku celnie określa nazwa powstała z połączenia dwóch greckich słów *xenos* – obcy i *bios* – życie, tak więc ksenobiotyki są definiowane jako związki chemiczne obce dla organizmów żywych [4]. Można je zaliczyć do kilku grup w zależności od ich źródła pochodzenia oraz zastosowania, takich jak np. farmaceutyki, dodatki do żywności, agrochemikalia, kosmetyki, przemysłowe środki chemiczne, chemikalia gospodarstwa domowego i wiele innych [5].

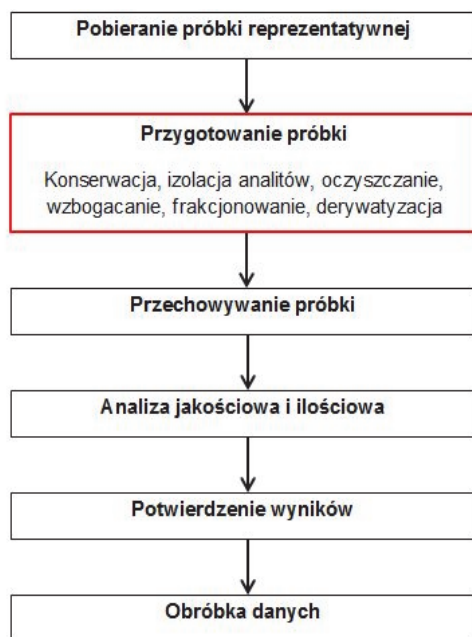
Duża grupa ksenobiotyków to związki endokryne (EDCs), dlatego często są określane jako ksenoestrogeny. Wykazując podobieństwo do naturalnych estrogenów, mogą ingerować w syntezę hormonów endogennych, prowadzić do zaburzeń funkcjonowania układu dokrewnego i immunologicznego oraz sprzyjać rozwojowi niektórych typów nowotworów.

Wśród nich wyróżniamy m.in. polichlorowane bifenyle, ftalany, bisfenol A, alkilofenole, dioksyne, pestycydy chloroorganiczne, leki, metale ciężkie, filtry UV oraz wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne [5].

Spośród zanieczyszczeń chemicznych istotną grupę stanowią farmaceutyki i produkty higieny osobistej (PPCPs). Grupa ta obejmuje tysiące różnych związków chemicznych stosowanych w medycynie, weterynarii, kosmetyce i farmaceutyce. Termin PPCPs odnosi się do każdej substancji, która jest stosowana z powodów zdrowotnych i kosmetycznych. Są to m.in.: leki na receptę i bez recepty, nutraceutyki, leki weterynaryjne, środki zapachowe, filtry UV oraz różnego rodzaju kosmetyki. W porównaniu do pestycydów i metali ciężkich niewiele uwagi poświęcało się badaniu tej grupy związków jako potencjalnych zanieczyszczeniach środowiska. Zainteresowanie tą grupą rozpoczęło się w latach 70. ubiegłego wieku, kiedy pojawiły się pierwsze prace dotyczące oznaczania pozostałości leków w próbkach środowiskowych przy niskich stężeniach na poziomie ppb. Jednakże dopiero od niedawna temat przyciągnął znaczną uwagę ze względu na ich wyróżniającą się aktywność biologiczną, wysoką rozpuszczalność, częściowe metabolizowanie i biodegradowalność oraz wzrost odporności bakterii na niektóre farmaceutyki. Aktualna literatura wyraźnie wskazuje, że istniejące technologie oczyszczania ścieków nie są w stanie poradzić sobie z usunięciem większości tych substancji, ich metabolitów oraz produktów ubocznych. W związku z tym łatwo docierają one do wód środowiskowych, a co najgorsze – do wody pitnej i żywności [3, 6].

2. Metody przygotowania próbek – izolacja, wzbogacanie i oczyszczanie

Próbki środowiskowe zawierają w swoim składzie substancje interferujące zwane naturalną organiczną materią (NOM), takie jak np.: substancje humusowe, barwniki, hormony roślinne, tłuszcze, białka, cukry i inne. Ponadto, występowanie większości oznaczanych analitów w bardzo niskich stężeniach i różnice we właściwościach fizykochemicznych utrudniają ich bezpośrednią analizę. Dlatego przygotowanie próbek (ang. *sample pretreatment*) jest najważniejszym etapem procedury analitycznej (rys. 1). W dużej mierze decyduje o jakości wyników analizy i jest procesem czasochłonnym. Głównymi założeniami tego skomplikowanego etapu są: zmiana matrycy na mniej złożoną, izolacja analitów, usunięcie substancji przeszkadzających oraz wzbogacenie próbki [2, 7].



Rys. 1. Ogólny schemat procedury analitycznej

2.1. Techniki ekstrakcyjne

Ze względu na łatwość użycia i szerokie zastosowanie do najpowszechniej stosowanych metod izolacji związków organicznych z próbek środowiskowych zalicza się techniki ekstrakcyjne. Ekstrakcja analitów jest bardzo ważnym etapem przygotowania próbki, pozwalającym na wydzielenie pożądaných związków z próbki pierwotnej i przeniesienie ich do matrycy mniej złożonej. Ponadto może stanowić etap oczyszczania próbki, umożliwiając identyfikację substancji podczas oznaczenia końcowego. Wybór odpowiedniej techniki zależy od rodzaju analitów, interferentów oraz ich właściwości fizykochemicznych. Na wydajność ekstrakcji mają wpływ czynniki takie, jak rodzaj rozpuszczalnika, temperatura, czas ekstrakcji oraz natura badanej próbki [8].

2.1.1. Klasyczne techniki ekstrakcyjne – LLE i SPE

Do metod znajdujących szerokie zastosowanie w analizie ksenobiotyków należą ekstrakcja ciecz-ciecz (LLE) oraz ekstrakcja do fazy stałej (SPE). Te klasyczne techniki są zazwyczaj używane dla większych

objętości próbek. Niestety tradycyjna, prosta i powszechnie stosowana dla wielu grup związków organicznych ekstrakcja LLE ma kilka wad. Jest to metoda czasochłonna, z ograniczoną selektywnością w analizie śladowej, wysokim kosztem i zużyciem rozpuszczalników organicznych oraz z możliwością do tworzenia emulsji [9].

Z tego powodu do wydzielenia i wzbogacenia śladowych ilości związków organicznych z próbek ciekłych lub roztworów preferowaną metodą jest ekstrakcja do fazy stałej. Jej główną zaletą jest dostępność wielu typów sorbentów umieszczonych w kolumnkach lub dyskach, które w zależności od mechanizmu separacji dzielą się na polarne, niepolarne i wymiennicze jonowe [8]. Ksenobiotyki o charakterze hydrofobowym mogą być łatwo zateżone metodą SPE, stosując dowolny sorbent w układzie faz odwróconych, taki jak np. żel krzemionkowy modyfikowany grupami alkilowymi. Niestety większość związków, w tym z grupy PPCPs, ma właściwości bardzo polarne. W tym wypadku preferowane są jonowymienne sorbenty polimerowe i materiały w trybie mieszanym. Jednym z najczęściej stosowanych sorbentów do ekstrakcji pozostałości farmaceutyków jest Oasis HLB (kopolimer diwinylobenzenu i winylopirolidonu), wykazujący równowagę hydrofilowo-lipofilową [6]. Coraz częściej do poprawy odzysku analitów polarnych stosowane są selektywne sorbenty, znane jako tzw. polimery z wdrukowanym śladem cząsteczki (MIPs). Ich działanie polega na rozpoznawaniu cząsteczkowym, a materiały sorpcyjne otrzymuje się w stosunkowo prostym procesie polimeryzacji poprzez utworzenie kompleksu cząsteczki wzorca z grupami funkcyjnymi monomerów. Technika SPE z wykorzystaniem MIPs znalazła zastosowanie m.in. do izolacji i zateżenia alkilofenoli oraz różnego rodzaju farmaceutyków z próbek wody, a także pestycydów fosforoorganicznych z próbek żywności [2, 6].

2.1.2. Techniki mikroekstrakcji

Aktualne badania dotyczące analizy śladowej koncentrują się na miniaturyzacji, efektywności, prostocie i przyjaznych dla środowiska technikach ekstrakcyjnych, które doprowadziły do rozwoju metod mikroekstrakcji. Metody te znajdują zastosowanie przede wszystkim do wydzielenia związków organicznych z próbek wodnych. Przykładem technik mikroekstrakcji, które dały dobre wyniki w oznaczeniu pozostałości ksenobiotyków, np. z grupy pestycydów, są dyspersyjna ekstrakcja cieczy-ciecz (DLLME) oraz mikroekstrakcja do fazy stałej (SPME). Obydwie metody mają wiele zalet. SPME jest techniką prostą, bezrozpuszczalni-

kową z krótkim czasem ekstrakcji i desorpcji. Co ważne, umożliwia bezpośrednie połączenie z chromatografem (w szczególności gazowym) i stosuje się ją zarówno do polarnych, jak i niepolarnych analitów w szerokim zakresie stężeń. Niestety wadą tej metody jest kruchość i łamliwość włókien oraz współzawodnictwo w sorpcji analitów. W technice DLLME wykorzystuje się mieszaninę rozpuszczalnika o wysokiej gęstości (ekstrahenta) oraz polarnego rozpuszczalnika mieszającego się z wodą (dyspergatora), dlatego też jej wydajność w dużej mierze zależy od doboru odpowiedniej mieszaniny rozpuszczalników. Zaletami tej mikroekstrakcji są przede wszystkim: prostota operacji, szybkość, niski koszt, duży odzysk oraz wysoki współczynnik wzbogacenia. Dobór ekstrahenta oraz mikrolitrowe objętości lotnych rozpuszczalników organicznych przy wyższej temperaturze otoczenia mogą stanowić utrudnienia [10–12]. Z powodzeniem wykorzystuje się ją do ekstrakcji i wzbogacenia polarnych związków organicznych, a w połączeniu z innymi technikami może być stosowana również do ekstrakcji nieorganicznych ksenobiotyków, takich jak metale ciężkie (np. zastosowanie techniki DLLME-SFO) [13].

2.1.3. Ekstrakcja membranowa

Techniki membranowe stanowią grupę technik, które mogą potencjalnie rozwiązać problemy tradycyjnych metod ekstrakcyjnych. Dzieli się je najczęściej w zależności od rodzaju i porowatości stosowanej membrany. Ogólnie membranę definiuje się jako selektywną barierę służącą do pasywnego bądź aktywnego transportu masy pomiędzy dwiema fazami. Spośród różnych technik membranowych powszechnie stosowaną metodą jest ekstrakcja wykorzystująca immobilizowane membrany ciekłe (SLM). Ich główną zaletą jest możliwość jednoczesnego wydzielania, zażęzania i oczyszczania, natomiast wadą – niestabilność ciekłej membrany. Znajdują zastosowanie głównie dla średniopolarnych oraz polarnych związków jonowych. Membrany ciekłe z powodzeniem wykorzystano do izolacji, wzbogacenia oraz oczyszczenia ksenobiotyków, takich jak herbicydy, jony metali, nitrofenole czy fluorochinolony z próbek środowiskowych. Innym przykładem techniki membranowej stosowanej w analizie ksenobiotyków jest ekstrakcja przy użyciu mikroporowatych membran w układzie ciecz-ciecz (MMLLE). Stosuje się ją głównie do niejonowych związków hydrofobowych (np. surfaktantów). Technika ta wykorzystuje małe objętości próbek, umożliwia połączenie *on-line* z analitycznymi instrumentami, ale w porównaniu z SLM związki te nie są ponownie ekstrahowane [2, 9].

3. Metody oznaczania ksenobiotyków w próbkach o złożonym składzie matrycy

W ciągu ostatnich lat opracowano wiele metod oznaczania chemicznych zanieczyszczeń w próbkach środowiskowych i żywności. Ze względu na fakt, iż większość próbek rzeczywistych charakteryzuje się złożonym składem matrycy, istnieje konieczność opracowania lub dopracowania już istniejących metod w celu osiągnięcia wystarczająco niskich granic wykrywalności. Do jakościowego i ilościowego oznaczania pozostałości ksenobiotyków wykorzystuje się głównie techniki separacyjne, takie jak techniki chromatograficzne (HPLC, GC) czy elektroforezę kapilarną (CE) z tendencją do miniaturyzacji oraz w kombinacji z różnym typem detekcji (np.: MS, DAD, ECD, FID). Techniki te łączą wspólne cechy, takie jak np.: możliwość rozdzielenia złożonych mieszanin, w tym izomerów i homologów, zdolność połączenia z szerokim zakresem selektywnych i czułych detektorów, dostosowanie procedury do objętości próbki, zarówno mikro jak i makro oraz możliwość automatyzacji [14–15]. Wymienione zalety powodują, że metody te górują nad tradycyjnymi technikami analitycznymi. Ze względu na mniejszą czułość oraz fakt, że znaczna część ksenobiotyków jest obojętna w szerokim zakresie pH, techniki elektroforetyczne są rzadziej stosowane w porównaniu np. z chromatografią cieczową. Jednakże po optymalizacji odpowiednich warunków mogą być interesującą alternatywą i stanowić drugą niezależną metodę potwierdzenia wyników. W wypadku chromatografii gazowej często konieczne jest zastosowanie dodatkowego etapu, derywatyzacji (np. do oznaczania farmaceutyków). Metoda ta jest odpowiednia do analizy lotnych lub półlotnych oraz termicznie stabilnych związków, dlatego z powodzeniem znajduje zastosowanie w analizie pestycydów [6, 16].

W odniesieniu do związków PPCPs interesującą grupą są filtry przeciwsłoneczne. Doniesienia literaturowe wskazują, że niektóre z nich wykazują działanie endokrynne, a ze względu na swoją budowę i lipofilowość są łatwo wchłaniane przez skórę i mogą być przenoszone z mlekiem matki. W związku z tym systemy wodne (np. baseny kąpielowe) stały się obiektem monitorowania obecności tych związków. Przykładem jest oznaczenie 4-benzylidenokamfory, benzofenonu-3 i 4-metoksycynamonienu 2-etyloheksylu w próbkach wody z basenu kąpielowego. Jako metodę przygotowania próbki wykorzystano SPE z zastosowaniem sorbentu C18, a oznaczenie końcowe wykonano przy użyciu chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (GC-MS). Uzyskany limit detekcji (LOD) dla badanych związków był na poziomie ng/l [17].

Innym przykładem jest oznaczenie antybiotyków penicylinowych w próbce takiej żywności, jak mięso wołowe. Zhomogenizowaną próbkę mięsa poddano ekstrakcji rozpuszczalnikowej (woda, acetonitryl). Następnie, po odwirowaniu, zateżeniu i doprowadzeniu do odpowiedniego pH, ekstrakt oczyszczano na różnego typu kolumnkach SPE (ISOLUTE® ENV+, Oasis HLB, Oasis Max, C18) i poddano analizie przy użyciu HPLC-MS. Uzyskany LOD był na poziomie $\mu\text{g}/\text{kg}$ [18].

Niektóre procedury wymagają zastosowania kilku technik ekstrakcyjnych. Interesującym przykładem jest analiza herbicydów triazynowych w próbkach soków owocowych. Za pomocą metody elektroforetycznej (CE) oraz z wykorzystaniem połączenia dwóch metod wydzielania, oczyszczania i zateżania – SLM i SPE zidentyfikowano oznaczane związki, uzyskując wysoki współczynnik wzbogacenia oraz satysfakcjonujące limity oznaczalności i wykrywalności (na poziomie $\mu\text{g}/\text{l}$). Gdzie wcześniej wykorzystanie jedynie techniki SLM dało słaby efekt zateżenia, a zastosowanie wyłącznie SPE nie pozwoliło na odpowiednie oczyszczenie matrycy soków pozwalające na ich oznaczenie i identyfikację [2].

4. Perspektywy

Xenobiotyki to liczna i zróżnicowana grupa związków chemicznych, przyczyniająca się w wyraźny sposób do rozwoju gospodarki, a jednocześnie stanowiąca zagrożenie dla środowiska naturalnego i zdrowia człowieka. Ze względu na toksyczność tych związków, ich trwałość, zdolność do bioakumulacji w tkankach organizmów żywych, łatwość przenikania do środowiska, odporność na warunki biochemiczne i atmosferyczne związki te zasługują na szczególną uwagę w chemii analitycznej i środowiskowej. Istotne jest zatem opracowanie prostych, czułych, efektywnych, a co ważne zgodnych z zasadami zielonej chemii metod izolacji i oznaczania xenobiotyków w próbkach o złożonym składzie matrycy. Opracowane nowe metody mogą zatem stanowić użyteczne narzędzia do oceny stopnia zanieczyszczenia środowiska oraz pozwolić na monitorowanie wielu związków organicznych występujących w bardzo niskich stężeniach.

Literatura

- [1] Fetzner S. (2001) Biodegradation of Xenobiotics, *Biotechnology*, Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS).
- [2] Poliwoła A., Chrzanowska A.M., Orłowska K., Wieczorek P.P. (2014) Ekstrakcja membranowa oraz ekstrakcja do fazy stałej jako efektywne techniki wydzielania i za-

- teżania związków organicznych z próbek o złożonym składzie matrycy, *Chemik* 68, 312–320.
- [3] Shraim A., Diab A., Alsuhaime A., Niazy E., Metwally M., Amad M., Sioud S., Dawoud A. (2012) Analysis of some pharmaceuticals in municipal wastewater of Almadinah Almunawarah, *Arab. J. Chem.* 1–11.
- [4] de Bolster M.W.G (1997) Glossary of terms used in bioinorganic chemistry (IUPAC Recommendations 1997), *Pure Appl. Chem.* 69, 1251–1303.
- [5] Matejczyk M., Zalewski P. (2011) Związki endokrynnie aktywne i ich aktywność biologiczna, *Kosmos. Probl. Nauk Biol.* 60, 17–32.
- [6] Buchberger W. (2011) Current approaches to trace analysis of pharmaceuticals and personal care products in the environment, *J. Chromatogr. A* 1218, 603–618.
- [7] Kalajdźić B., Habuda-Stanić M., Romić Ž., Kuleš M. (2013) Removal of natural organic matter from groundwater using Fenton's process, *Global NEST J.* 15, 13–20.
- [8] Namieśnik J. (2000) *Przygotowanie próbek środowiskowych do analizy*, WNT, Warszawa.
- [9] Chrzanowska A.M., Poliwoda A., Wieczorek P.P. (2014) Liquid membranes as a sample preparation method in environmental analysis, [w:] *Membranes and Membrane Processes in Environmental Protection*, red. K. Konieczny, I. Korus, Monografie Komitetu Inżynierii Środowiska Polskiej Akademii Nauk, Warszawa–Gliwice, t. 118, 169–178.
- [10] Hassan J., Ghafari M., Mozaffari S., Farahani A. (2014) Determination Polar Pesticides in Water Samples Using Acetonitril/Butylacetate Dispersive Solvent Extraction Combined with Gc-Ms Determination, *Austin Chromatogr.* 1, 13.
- [11] Chen B., Jin B., Jiang R., Xie L., Lin Y., Feng W., Ouyang G. (2014) Screening and quantification of 304 pesticides and related organic pollutants in surface water using dispersive liquid-liquid microextraction coupled with gas chromatography-mass spectrometry, *Anal. Methods* 6, 1743–1752.
- [12] Von Mühlen C., Lanças F.M. (2014) SPME-GC-MS determination of selected aniline pesticides in surface water, *Sci. Chromatogr.* 6, 117–123.
- [13] Mirzaei M., Rakh M. (2014) Preconcentration of organochlorine pesticides in aqueous samples by dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of floating organic drop after SPE with multiwalled carbon nanotubes, *J. Sep. Sci.* 37, 114–119.
- [14] Oros G., Cserháti T., Szógyi M. (2012) Chromatography of xenobiotics in biological and environmental matrices, *Eur. Chem. Bull.* 1, 81–93.
- [15] Clavijo S., Avivar J., Suárez R., Cerdà V. (2015) Analytical strategies for coupling separation and flow-injection techniques, *TrAC, Trends Anal. Chem.* 67, 26–33.
- [16] D'Orazio G., Asensio-Ramos M., Hernández-Borges J., Fanali S., Rodríguez-Delgado M.Á. (2014) Estrogenic compounds determination in water samples by dispersive liquid-liquid microextraction and micellar electrokinetic chromatography coupled to mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1344, 109–121.
- [17] Giokas D.L., Salvador A., Chisvert A. (2007) UV filters: From sunscreens to human body and the environment, *TrAC, Trends Anal. Chem.* 26, 360–374.
- [18] Macarov C.A., Tong L., Martínez-Huélamo M., Hermo M.P., Chirila E., Wang Y.X., Barrón D., Barbosa J. (2012) Multi residue determination of the penicillins regulated by the European Union, in bovine, porcine and chicken muscle, by LC-MS/MS, *Food Chem.* 135, 2612–2621.

ZASTOSOWANIE METOD DFT DO BADANIA RÓWNOWAG KWASOWO-ZASADOWYCH WYBRANYCH LEKÓW PRZECIWNOWOTWOROWYCH

JUSTYNA WIELIŃSKA, JUSTYNA BEDNARKO,
ANDRZEJ NOWACKI, BEATA LIBEREK

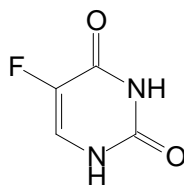
Pracownia Glikochemii, Wydział Chemii, Uniwersytet Gdański
ul. Wita Stwosza 63, 80-308 Gdańsk
e-mail: justyna.wielinska@phdstud.ug.edu.pl

Hasła do zapamiętania: 5-fluorouracyl, stała kwasowości

1. Wstęp

Nowotwory należą do najgroźniejszych i najpoważniejszych chorób cywilizacyjnych dzisiejszych czasów. Skuteczna i bezpieczna terapia przeciwnowotworowa stanowi cel pracy wielu zespołów badawczych na całym świecie. Wśród różnych metod leczenia raka ważne miejsce zajmuje chemioterapia [1, 2], w której wykorzystuje się leki cytostatyczne [3, 4]. Zasada ich działania polega na zaburzeniu cyklu komórkowego i powodowaniu śmierci komórki bądź zahamowaniu jej rozwoju. Niestety, leki te uszkadzają również zdrowe komórki, skąd nieustannie trwają badania nad nowszymi cytostatykami, które będą działały bardziej wybiórczo i mniej toksycznie w stosunku do zdrowych komórek.

Większość leków może być klasyfikowana jako słabe kwasy bądź słabe zasady. Dlatego jednym z podstawowych parametrów charakteryzujących farmaceutyk jest wartość stałej kwasowości (pK_a) [5], zdefiniowanej jako ujemny logarytm dziesiętny ze stałej równowagi dysocjacji kwasu (K_a). Od tej wartości oraz od pH roztworu zależy postać farmaceutyku, który



5-Fluorouracyl

Rys. 2. Struktura 5-fluorouracylu

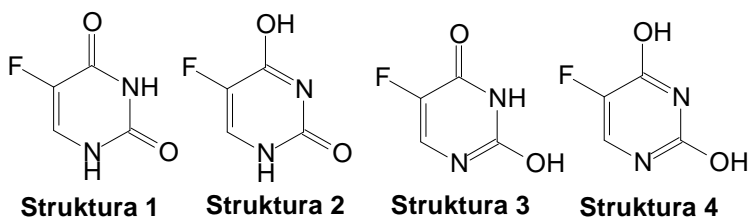
cytostatycznego, jakim jest 5-fluorouracyl (rys. 2) za pomocą metod obliczeniowych. Znajomość precyzyjnej wartości pK_a farmaceutyku umożliwi dokładne przewidywanie stężenia jego postaci kationowej, anionowej bądź obojętnej w różnych wartościach pH. Wskazanie miejsca protonowania bądź deprotonowania farmaceutyku pozwoli też lepiej poznać zależność pomiędzy strukturą leku a jego aktywnością. Wiedza tego rodzaju jest niezbędna do zrozumienia mechanizmu działania leku, mechanizmu uodporniania się organizmu oraz do umiejętnego projektowania nowych farmaceutyków.

3. Metodyka

Strukturę podstawową oraz struktury tautomeryczne 5-fluorouracylu przygotowaliśmy w programie MOLDEN [10]. Do obliczeń wykorzystaliśmy Metody Teorii Funkcjonałów Gęstości (DFT) [11]. Zbudowane struktury poddaliśmy optymalizacji w fazie gazowej za pomocą dwóch funkcyjałów: B3LYP [12–13] i M062X [14]. Pierwszy z nich jest funkcyjałem bardzo popularnym, o szerokim spektrum wykorzystania w rozwiązywaniu zagadnień chemicznych. Drugi z nich to funkcyjał nowszej generacji, który pozwala uwzględnić w obliczeniach oddziaływania dyspersyjne. Optymalizację wykonaliśmy również w wodzie, wykorzystując do tego model solwatacyjny SCRF-PCM (Self-Consistent Reaction Field – Polarizable Continuum Model) [15]. Obliczenia przeprowadziliśmy z użyciem dwóch baz funkcyjnych: 6-311++G** oraz aug-cc-pVDZ. Znalezione podstawowe struktury niskoenergetyczne posłużyły mi do przygotowania odpowiednich struktur protonowanych i deprotonowanych, z uwzględnieniem wszystkich miejsc potencjalnie zdolnych do przyłączenia/oddawania protonów. Struktury te zostały następnie zoptymalizowane w fazie gazowej oraz w fazie wodnej.

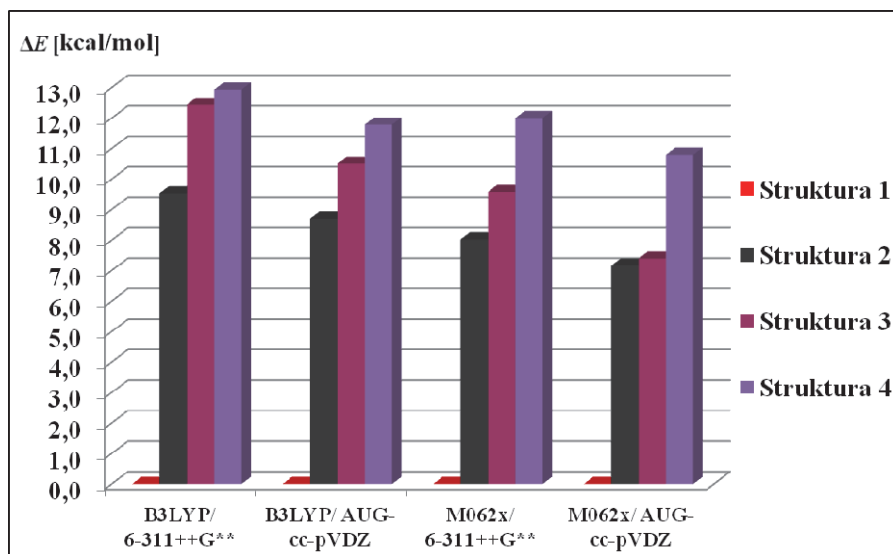
4. Wyniki

5-Fluorouracyl jest cząsteczką sztywną, pozbawioną swobody konformacyjnej. Lek ten natomiast może występować w czterech formach tautomerycznych (rys. 3).

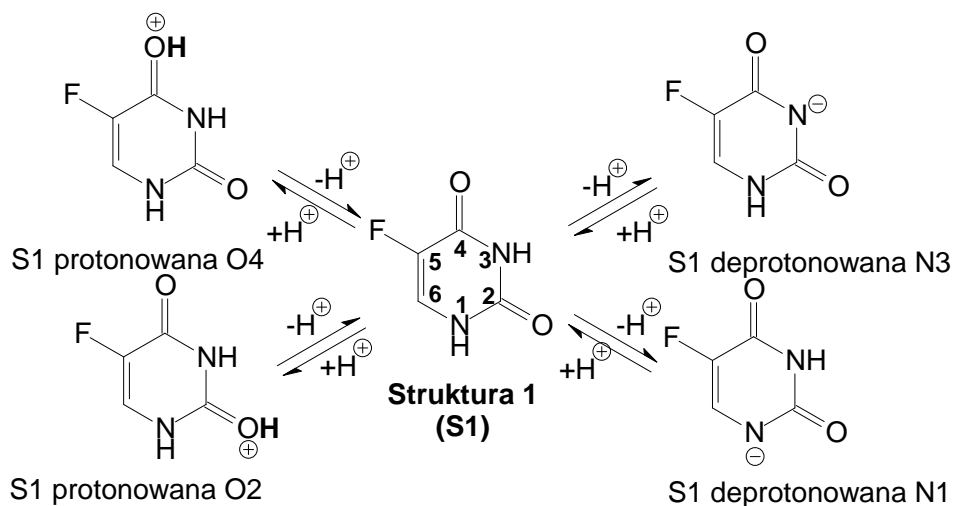


Rys. 3. Struktury czterech form tautomerycznych 5-fluorouracylu

Wartości energii względnej, otrzymane w wyniku optymalizacji poszczególnych struktur, zostały przedstawione na rysunku 4. Niezależnie od wybranej metody zdecydowanie najniższej energetyczna okazała się struktura 1.



Rys. 4. Energie względne [kcal/mol] struktur tautomerycznych 5-fluorouracylu



Rys. 5. Struktury protonowane i deprotonowane podstawowej struktury 5-fluorouracylu

Na kolejnym etapie ze struktury 1 zbudowaliśmy struktury protonowane i deprotonowane (rys. 5).

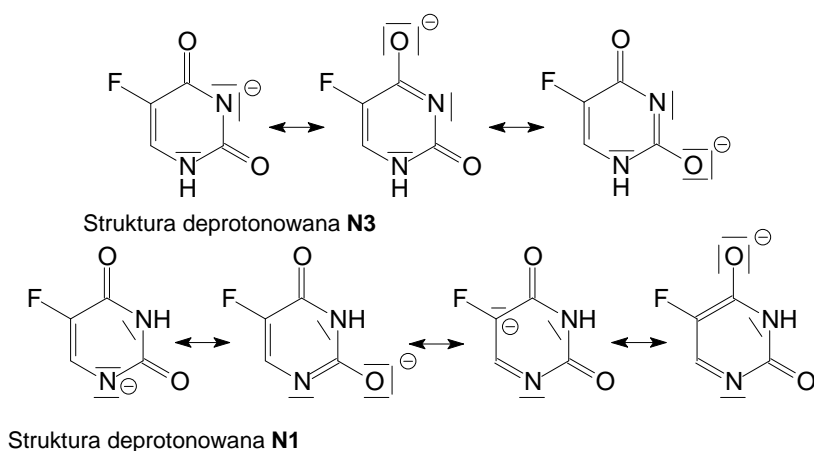
W tabeli przedstawiono wartości energii swobodnej Gibbsa oraz pK_a struktury 1 obliczone za pomocą dwóch funkcjonałów.

Tabela. Energie swobodne Gibbsa [a.u.] oraz pK_a struktury 1 obliczone za pomocą funkcjonałów: B3LYP/6-311++G** oraz M062x/6-311++G**

	B3LYP/6-311++G**			M062x/6-311++G**		
	Struktura 1	S1 deprot. N3	S1 deprot. N1	Struktura 1	S1 deprot. N3	S1 deprot. N1
$G_{f.gaz.}$	-514,1540	-513,6164	-513,6337	-513,9618	-513,4247	-513,443
pK_a		7,58	5,05		5,56	2,45
	Struktura 1	S1 prot. O4	S1 prot. O2	Struktura 1	S1 prot. O4	S1 prot. O2
$G_{f.gaz.}$	-514,1540	-514,4701	-514,4576	-513,9618	-514,2745	-514,2633
pK_a		-25,43	-27,04		-28,41	-30,45

Z wyników otrzymanych metodą B3LYP można wywnioskować, iż struktura 1 5-fluorouracylu łatwiej oddaje proton z atomu azotu N1 (wartość pK_a 5,05) niż z atomu azotu N3 (wartość pK_a 7,58). Tę samą tendencję można zaobserwować w wypadku metody M062x, według której stałe kwasowości tych samych protonów wynoszą odpowiednio 2,45 (N1) i 5,56 (N3). Większa kwasowość protonu zlokalizowanego na azocie N1 prawdo-

podobnie spowodowana jest obecnością fluoru w pozycji C5 pierścienia. Obie deprotonowane struktury N1 i N3 są stabilizowane rezonansem (rys. 6), przy czym struktura deprotonowana N3 ma ładunek zdelokalizowany na atomy tlenu dwóch grup karbonylowych. Struktura deprotonowana N3 również ma ładunek zlokalizowany na atomy tlenu dwóch grup karbonylowych, ale dodatkowo także na atom węgla C5. Sąsiadujący z atomem węgla C5 fluor efektem indukcyjnym powoduje dodatkowe rozmycie ładunku ujemnego, stabilizując odpowiadającą tej sytuacji strukturę rezonansową.



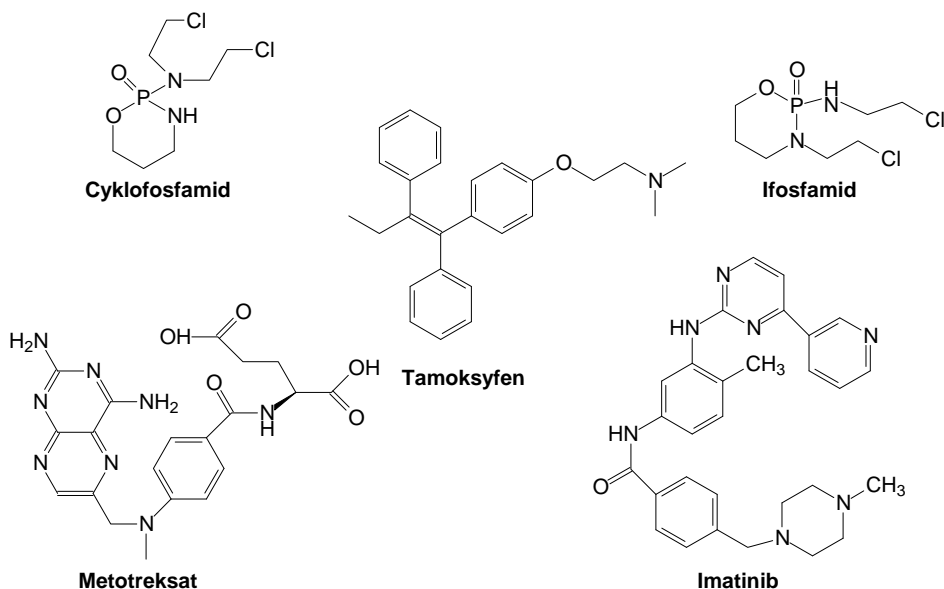
Rys. 6. Struktury rezonansowe deprotonowanych postaci N3 i N1

Porównując otrzymane wyniki z danymi eksperymentalnymi (pK_a 5-fluorouracylu 7,6–8,0) [8, 16], wnioskujemy, że metoda B3LYP daje poprawniejsze wartości pK_a .

5. Perspektywy

Kolejnym etapem naszych prac będzie wyznaczenie stałych kwasowości pięciu innych leków przeciwnowotworowych, jakimi są: cyklofosfamid, ifosfamid, metotreksat, imatinib oraz tamoksyfen (rys. 7).

Budując struktury podstawowe cyklofosfamidu oraz ifosfamidu, uwzględnimy dwie możliwe konformacje krzesłowe pierścienia sześciocłonowego, rozpatrując tym samym położenie aksjalne i ekwatorialne podstawników fosforu. Wykonamy także rotację wokół wszystkich wiązań



Rys. 7. Pozostałe badane leki przeciwnowotworowe

pojedynczych. Uzyskamy w ten sposób pełną reprezentację rotamerów tych związków, a struktury niskoenergetyczne posłużą nam do zbudowania czterech struktur protonowanych i jednej deprotonowanej.

Podczas budowania struktur wyjściowych tamoksyfenenu uwzględniamy dwie możliwe geometrie wiązania podwójnego (*Z* i *E*) oraz wykonujemy rotację wokół wiązań pojedynczych. Bliskość przestrzenna pierścieni aromatycznych w tamoksyfenie uniemożliwia ich ułożenie koplanarne względem wiązania podwójnego. Podobnie jak w przypadku poprzednich związków, uzyskane struktury najniższej energetycznej wykorzystamy do zbudowania układów protonowanych.

Metotreksat oraz imatinib są lekami strukturalnie bardzo złożonymi. Charakteryzują się dużą swobodą konformacyjną. W celu znalezienia najtrwalszej struktury wykonujemy rotację wokół wiązań pojedynczych. Struktury o najniższej energii posłużą nam do zbudowania struktur protonowanych lub deprotonowanych.

Literatura

- [1] Fisher B., Anderson S., Redmond C.K. (1995) Reanalysis and Results after 12 Years of Follow-up in a Randomized Clinical Trial Comparing Total Mastectomy with Lumpectomy with or without Irradiation in the Treatment of Breast Cancer, *New Engl. J. Med.* 333, 1456–1461.

- [2] Diab S.G., Hilsenbeck S.G., de Moor C., Clark G.M., Osborne C.K., Ravdin P.M., Elledge R.M. (1998) Radiation therapy and survival in breast cancer patients with 10 or more positive axillary lymph nodes treated with mastectomy, *J. Clin. Oncol.* 16, 1655–1660.
- [3] Garcia A., Broséus R., Vincent S., Barbean B., Prevost M., Saure S. (2010) Oxidation kinetics of cyclophosphamide and methotrexate by ozone in drinking water, *Chemosph.* 79, 1056–1063.
- [4] Kosjek T., Heath E. (2011) Occurrence, fate and determination of cytostatic pharmaceuticals in the environment, *Trends Anal. Chem.* 30, 1065–1086.
- [5] Cairns D. (2008) Essentials of Pharmaceutical Chemistry, Fourth Edition, *Pharmaceutical Press*, London, 1–19.
- [6] Mahoney B.P., Raghunand N., Baggett B., Gilles R.J. (2003) Tumor acidity, ion trapping and chemotherapeutics, I. Acid pH affects the distribution of chemotherapeutic agents *in vivo*, *Biochem. Pharmacol.* 66, 1207–1218.
- [7] Toolram A.P., Kümmerer K., Schneider M. (2014) Environmental risk assessment of anti-cancer drugs and their transformation products: A focus on their genotoxicity characterization-state of knowledge and short comings, *Mut. Res./Rev. Mut. Res.* 760, 18–35.
- [8] Booker V., Halsall C., Llwellyn N., Johnson A., Williams R. (2014) Prioritising anti-cancer drugs for environmental monitoring and risk assessment purposes, *Sci. Total Environ.* 473–474, 159–170.
- [9] Gomez-Canela C., Corrtés-Francisco N., Ventura F., Caixach J., Lacorte S. (2013) Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry and high resolution mass spectrometry as analytical tools to characterize multi-class cytostaic compounds, *J. Chromat. A* 1276, 78–94.
- [10] Schaftenaar G., Noordik J.H. (2000) Molden: a pre- and post-processing for molecular and electronic structures, *J. Comp.-Aided Mol. Design* 14, 123–134.
- [11] Becke A.D. (1993) Density-functional thermochemistry. III. The role of exchange, *J. Chem. Phys.* 98, 5648–5652.
- [12] Lee C., Yang W., Parr R.G. (1988) Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density, *Phys. Rev. B* 37, 785–789.
- [13] Zhao Y., Truhlar D.G. (2008) The M06 suite of density functional for main group thermochemistry, thermochemical kinetics, noncovalent interactions, excited states, and transition elements: two new functional and systematic testing of four M06-class functional and 12 other functional, *Theor. Chem. Acc.* 120, 215–241.
- [14] Zhao Y., Truhlar D.G. (2008) Density functional with broad applicability in chemistry, *Acc. Chem. Res.* 41, 15–167.
- [15] Tomasi J., Persico M. (1994) Molecular interactions in solution: an overview of methods based on continous distributions of the solvent, *Chem. Rev.* 94, 2027–2094.
- [16] Şanlı N., Şanlı S., Alsancal G. (2010) Determination of Dissociation Constants of Folinic Acid (Leucovorin), 5-Fluorouracil, and Irinotecan in Hydro-organic Media by a Spectrophotometric Method, *J. Chem. & Engin. Data* 55, 2695–2699.

Część trzecia



CHEMIA
BIONIEORGANICZNA

BIOLOGICZNIE AKTYWNE KOMPLEKSY JONÓW LANTANOWCÓW – ZWIĄZKI NOWEJ GENERACJI

MAŁGORZATA T. KACZMAREK, MICHAŁ ZABISZAK,
RENATA JASTRZĄB

Wydział Chemii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
ul. Umultowska 89b, 61-614 Poznań
e-mail: gosiat@amu.edu.pl; zabiszakm@amu.edu.pl; renatad@amu.edu.pl

Hasła do zapamiętania: lantanowce, związki kompleksowe lantanowców, substancje antynowotworowe, związki kontrastowe, rezonans magnetyczny

Wykaz skrótów:

ATP	– zwłóknienie układowe adenozyne 5'-monofosforan
MIC	– minimalne stężenie hamujące
MBC	– minimalne stężenie bakteriobójcze
IZD	– średnica strefy zahamowania wzrostu drobnoustrojów
MGd	– moteksafiryna gadolinu
NADPH	– dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy
ROS	– reaktywne związki tlenu
MRI	– magnetyczny rezonans jądrowy
DOTA	– kwas 1,4,7,10-tetraazacyclododekane-1,4,7,10-tetra octowy
D03A	– kwas 1,4,7,10-tetraazacyclododekane-1,4,7-tri octowy
DTPA	– kwas dietyleno triamino penta octowy
BMA	– bis-metyloamid
HP	– 10-2-hydroksopropyl
NSF	– nefrogenne

1. Wstęp

Badania nad medycznym zastosowaniem związków zawierających jony lantanowców (jonów metali ziem rzadkich) jest bardzo ważnym nurtem badań od XIX w. Od 1960 r. znane są kompleksy lantanowców

wykazujące właściwości farmakologiczne, takie jak: antykoagulacyjne, przeciwzapalne, antibakteryjne, antyalergiczne i przeciwnowotworowe. Kompleksy jonów lantanowców wykorzystywane są także jako środki w leczeniu oparzeń [1].

Właściwości biologiczne jonów lantanowców opierają się głównie na podobieństwach do jonów wapnia, co stało się podstawą do badań nad potencjalnymi zastosowaniami tych jonów w medycynie.

Jednym z najwcześniejszych zastosowań terapeutycznych jonów lantanowców było wykorzystanie szczawianu ceru jako środka przeciwwymiotnego. Po raz pierwszy opisany w połowie XIX w. preparat ten dostępny był aż do połowy XX w. Mechanizm działania tego związku nigdy nie został wyjaśniony ale, jako substancja nierozpuszczalna, najprawdopodobniej działa lokalnie w obrębie układu pokarmowego. Ponadto, na początku XX w. sole metali ziem rzadkich były używane do leczenia gruźlicy. Później stwierdzono, że lantanowce mają właściwości przeciwzakrzepowe, ale ich stosowanie utrudniały poważne skutki uboczne wywoływane działaniem preparatów zawierających jony lantanowców. Stwierdzenie, iż chlorek lantanu zmniejsza nadmierne osadzanie wapnia, czym opóźnia proces powstawania blaszki miażdżycowej, doprowadziło do badania właściwości przeciwmiażdżycowych tej grupy związków. Węglan lantanu (Fosrenol) stosuje się jako środek wiążący fosforany w leczeniu hiperfosfatemii u dializowanych pacjentów (zatwierdzony w USA i Europie). Lek jest alternatywą, bez negatywnych skutków, dla dotąd stosowanych preparatów zawierających sole wapnia i glinu [2].

Najszerze zastosowanie medyczne, zwłaszcza w diagnostyce obrazowej, znalazły związki kompleksowe gadolinu. Substancje te są szeroko stosowane w obrazowaniu za pomocą rezonansu magnetycznego zarówno w profilaktyce w celu zdiagnozowania ewentualnych stanów chorobowych, jak również w celu monitorowania postępów leczenia.

W niniejszej pracy przedstawiono najnowsze postępy i sukcesy w badaniach nad terapeutycznym zastosowaniem jonów lantanowców.

2. Biochemia jonów lantanowców

Biologiczne właściwości jonów lantanowców w głównej mierze opierają się na ich podobieństwie do jonu wapnia. Podobieństwo jonów jest efektem zbliżonego promienia jonowego kationu wapnia (99 pm) i kationów lantanowców (od 103 pm dla jonu lantanu do 86 pm dla jonu lutetu), różniących się ładunkiem, który w wypadku jonów lantanowców

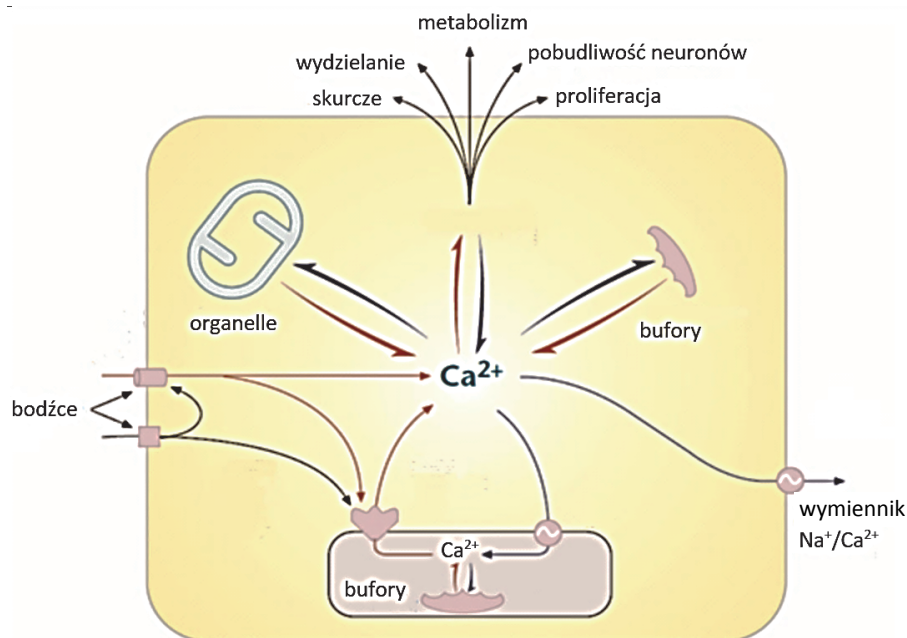
jest wyższy. Wraz ze wzrostem ładunku jądra od lantanu do lutetu przy niezmienniej liczbie powłok elektronowych, a jedynie zmianie liczby elektronów walencyjnych, rośnie elektrostatyczne przyciąganie elektronów przez jądro, czego konsekwencją jest zmniejszenie promienia atomowego i jonowego lantanowców. Zjawisko to nazwano kontrakcją lantanowców.

Jony lantanowców występują na trzecim stopniu utlenienia w warunkach fizjologicznych, z wyjątkiem ceru i europu, które w tych warunkach preferują czwarty stopień utlenienia. Ze względu na duże podobieństwo jonów lantanowców do jonu wapnia wykazują one powinowactwo do miejsc wiążących te jony i charakteryzują się wyższym niż jon wapnia powinowactwem do wiązania cząsteczek wody.

Jony lantanowców tworzą związki kompleksowe o trwałości podobnej jak jony wapnia. Trwałość tych kompleksów rośnie ze zmniejszaniem się promienia jonowego, przeciwnie niż liczba koordynacyjna, która w obrębie grupy maleje od lantanu do lutetu. Stosunkowo duże rozmiary jonów lantanowców powodują, że mogą one tworzyć związki kompleksowe, w których osiągają wysokie liczby koordynacyjne, nawet do 12. Jednak preferowane liczby koordynacyjne to 8–9, podczas gdy typowa liczba koordynacyjna dla jonu wapnia wynosi 6 [3, 4].

Jony lantanowców nie mają możliwości przenikania przez błonę komórkową i wnikania do wnętrza komórki, ale mają zdolność do selektywnego blokowania kanałów transportujących jony wapnia do wnętrza komórki. Ponadto, mogą utrudniać skurcze mięśni gładkich, szkieletowych oraz mięśnia sercowego poprzez blokowanie wiązania jonu wapnia z adenozyino-5'-trifosforanem (Ca^{2+} -ATP) w retikulum endoplazmatycznym komórek mięśniowych. Pomimo że jony lantanowców nie mają dostępu bezpośrednio do organelli komórkowych, są stosowane jako sondy w badaniu transportu jonów wapnia w mitochondriach i innych organelach. Tendencja do blokowania kanałów transportujących zwiększa się wraz ze wzrostem promienia jonowego lantanowca $\text{Ho}^{3+} \approx \text{Y}^{3+} \approx \text{Yb}^{3+} \geq \text{Er}^{3+} > \text{Gd}^{3+} > \text{Nd}^{3+} > \text{Ce}^{3+} > \text{La}^{3+}$.

Kolejnym efektem działania jonów lantanowców jest blokowanie wazopresyny, hormonu antydiuretycznego odpowiedzialnego za zagęszczanie moczu oraz stymulującego wydzielanie jonów wapnia i manganu(II) poprzez błonę hepatocytów. Wpływają także na wydzielanie neurotransmiterów, takich jak epinefryna, dopamina czy serotonina, które są przykładami receptorów blokujących kanały wapniowe. Blokowanie tych kanałów w mięśniach ma potencjalne zastosowanie terapeutyczne np. w dystrofii mięśniowej Duchennego, powodującej nieodwracalny zanik mięśni (rys. 1) [5].



Rys. 1. Funkcje jonu wapnia w organizmie [6]

Inną ważną funkcją jonów lantanowców jest zdolność do zastępowania jonów wapnia, a także innych jonów metali, takich jak magnez, żelazo(III) czy mangan(II), w białkach [4]. Stwierdzono, że działanie enzymów wapniowo zależnych może być inhibitowane przez jony lantanowców. W niektórych wypadkach działanie enzymów wapniowo zależnych jest aktywowane znacznie mocniej przez jony lantanowców niż przez jony wapnia. Sugeruje się, że efekt hamujący lub stymulujący jonów lantanowców może wynikać z funkcji, jaką pełni wapń w naturalnych enzymach. W przypadku, gdy jony wapnia pełnią rolę katalityczną, zastąpienie go lantanowcem prowadzi do dezaktywacji enzymu, natomiast gdy jon wapnia pełni rolę inhibitującą, wzmocnienie działania wynikające z wprowadzenia jonu lantanowca uzależnione jest od jego promienia jonowego. Jeżeli jednak jon wapnia pełni rolę czynnika strukturalnego, zastąpienie go jonem lantanowca w wielu wypadkach prowadzi do zaniku aktywności enzymu. Przykładem enzymu, którego aktywność blokowana jest przez jony lantanowców, jest nukleaza stalifokokowa należąca do enzymów typu cytochromu P450 – zaangażowanych w procesy krzepnięcia krwi, takie jak aktywacja protrombiny. Inny mechanizm, w którym czynny udział biorą jony lantanowców to, koagulacja. Enzymy odpowie-

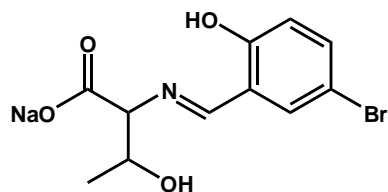
działne za te procesy zawierające trypsynę oraz acetylocholinostazę są stymulowane jonami lantanowców, np. wpływają na kalmodulinę (białko zawierające wapń), powodując polimeryzację kolagenu oraz aktywny G [2].

3. Właściwości antybakteryjne kompleksów lantanowców

W kilku ostatnich dekadach w medycynie i farmacji obserwowany jest intensywny rozwój badań nad nowymi materiałami, które wykazują aktywność antybakteryjną. Kompleksy lantanowców są związkami, które mogą znaleźć zastosowanie jako aktywne biologicznie materiały ze względu na specyficzną konfigurację elektronową (możliwość osiągania wysokich liczb koordynacyjnych), dużą elastyczność otoczenia koordynacyjnego jonów metali (możliwość dość łatwej zmiany budowy sfery koordynacyjnej) oraz ze względu na ich szczególne fizykochemiczne właściwości [7].

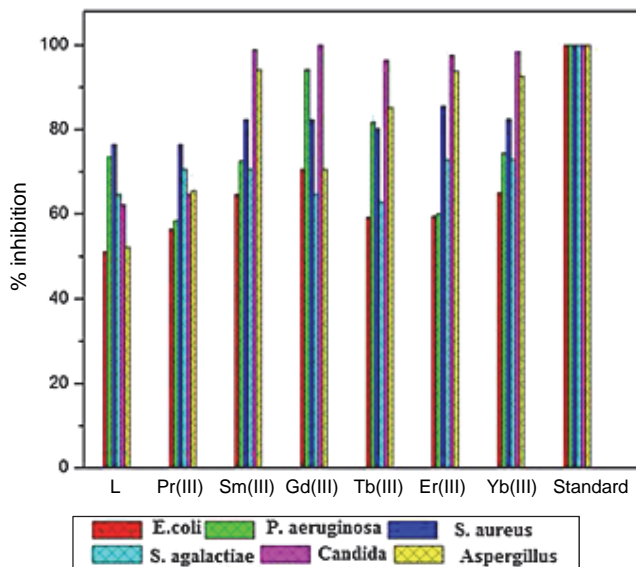
Właściwości antybakteryjne związków badane są metodą seryjnych rozcieńczeń w roztworze oraz metodą dyfuzyjno-krażkowa (metoda Kirby-Bauera) na nośnikach stałych. Parametrami charakteryzującymi właściwości bakteriobójcze kompleksów są minimalne stężenie hamujące (MIC [$\mu\text{g/mL}$], ang. *Minimal Inhibitory Concentration*) – najmniejsze stężenie środka bakteriobójczego hamujące wzrost drobnoustrojów; minimalne stężenie bakteriobójcze (MBC [mg/mL], ang. *Minimal Bactericidal Concentration*) – najmniejsze stężenie środka bakteriobójczego oznaczone w warunkach *in vitro*, przy którym ginie 99% drobnoustrojów oraz średnica strefy zahamowania wzrostu drobnoustrojów (IZD [mm ; cm], (ang. *Inhibition Zone Diameters*) – jest to obszar, w którym bakterie nie są w stanie się rozwijać [8]. Ligandy oraz tworzone przez nie kompleksy z jonami lantanowców testuje się zwykle przeciwko bakteriom Gram-dodatnim (*Salmonella typhi*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* i *Bacillus subtilis*) i Gram-ujemnym (*Escherichia coli*, *Aeromonas aquariorum*, *Serratia marcescens* i *Pseudomonas aeruginosa*), wykorzystując antybiotyki (Kanamycine, Chloramphenicol, Ampicillin, Amoxicillin and Gattifloxacin) jako układ odniesienia [9, 10].

Ligand typu zasady Schiffa (rys. 2) oraz sześć jego kompleksów z jonami lantanowców o ogólnym wzorze $[\text{LnL}^1(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}]\text{NO}_3$, gdzie: Ln to Pr(III), Sm(III), Gd(III), Tb(III), Er(III) oraz Yb(III); L^1 to sól sodowa kwasu 2-[(5-bromo-2-hydroksy-benzylideno)-amino]-3-hydroksypropionowego, poddano testom antybakteryjnym, wykorzystując metodę dyfuzyjno-krażkową, określając średnicę strefy zahamowania wzrostu drobnoustrojów.



Rys. 2. Wzór soli sodowej kwasu 2-[(5-bromo-2-hydroksy-benzylideno)-amino]-3-hydroksypropionowego – liganda L¹

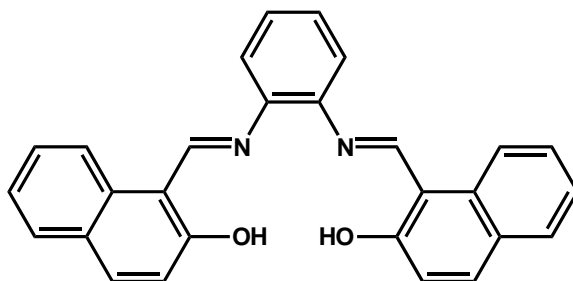
Roztwory badanych substancji o stężeniu $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ (soli sodowej kwasu 2-[(5-bromo-2-hydroksy-benzylideno)-amino]-3-hydroksypropionowego – liganda L¹ i jego kompleksów) zostały przygotowane w dimetyloformamidzie, następnie rozcieńczone wodą destylowaną do 60, 40 do $20 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. Stwierdzono, że sól sodowa kwasu 2-[(5-bromo-2-hydroksy-benzylideno)-amino]-3-hydroksypropionowego – ligand L¹ jest aktywny biologicznie, jego aktywność wynika z obecności grupy iminowej. Jednak otrzymane kompleksy lantanowców z tym ligandem wykazują znacznie lepsze działanie antybakteryjne. Tłumaczone jest to chelatacją metalu z ligandem organicznym, co synergistycznie zwiększa efekt bakteriobójczy. Efekt chelatowania zmniejsza polarność jonu metalu głównie dlatego, że jego ładunek do-



Rys. 3. Wyniki testów antybakteryjnych dla soli sodowej kwasu 2-[(5-bromo-2-hydroksy-benzylideno)-amino]-3-hydroksypropionowego – liganda L¹ i jego kompleksów lantanowców (stężenie badanej próbki $60 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)

datni jest częściowo dzielony z atomami donorowymi liganda, a elektrony zostają zdelokalizowane na powstały w wyniku koordynacji jonu metalu przez ligand pierścień chelatowy. W szeregu Pr(III), Sm(III), Gd(III), Tb(III), Er(III), Yb(III) najlepsze właściwości antybakteryjne obserwuje się dla kompleksów jonów Sm(III) i Gd(III) (rys. 3) [11].

Kolejnymi przykładami związków lantanowców, dla których zbadano właściwości antybakteryjne, są kompleksy czterofunkcyjnego liganda *N,N'*-bis(1-naftalenodiamino)-*o*-fenylenodiaminy – L^2 (rys. 4) typu zasady Schiffa, który otrzymano w wyniku reakcji kondensacji 2-hydroksynaftalenu i *o*-fenylenodiaminy. Otrzymano osiem kompleksów o ogólnym wzorze $[LnL^2(NO_3)_2(H_2O)_x](NO_3)$, gdzie Ln = Nd(III), Dy(III), Sm(III), Pr(III), Gd(III), Tb(III), La(III) and Er(III), $x = 0$ dla Nd(III), Sm(III); 1 dla La(III), Gd(III), Pr(III), Nd(III), Dy(III) i 2 dla Tb(III).



Rys. 4. Wzór liganda *N,N'*-bis(1-naftalenodiamino)-*o*-fenylenodiaminy – L^2

Działanie antybakteryjne liganda *N,N'*-bis(1-naftalenodiamino)-*o*-fenylenodiaminy – L^2 i jego kompleksów oszacowano przez minimalne stężenie hamujące (MIC $\mu\text{g/mL}$) z zastosowaniem metody seryjnych rozcieńczeń. MIC oznaczano dla liganda *N,N'*-bis(1-naftalenodiamino)-*o*-fenylenodiaminy – L^2 i jego kompleksów wobec różnych typów Gram-dodatnich i Gram-ujemnych bakterii, a wyniki badań zestawiono w tabeli.

Przedstawione dane wskazują, że ligand *N,N'*-bis(1-naftalenodiamino)-*o*-fenylenodiamina – L^2 wykazuje działanie antybakteryjne przeciwko *P. aeruginosa* i *E. coli*, natomiast nie wykazuje tych właściwości w stosunku do *P. vulgaris*, *S. dysenteriae*, *S. aureus*, *Klebsiella* i *Serratia*. Wszystkie otrzymane kompleksy lantanowców, z wyjątkiem kompleksów jonów Er(III) i Dy(III), odznaczają się dobrą aktywnością antybakteryjną w stosunku do *S. aureus*. Kompleksy jonów La(III) i Pr(III) wykazują najwyższą aktywność przeciwko *S. aureus*, a minimalne stężenie hamujące wy-

nosi odpowiednio 1,95 dla kompleksu jonu La(III) i 3,90 $\mu\text{g/mL}$ dla kompleksu jonu Pr(III). Otrzymane związki nie wykazują aktywności albo jest ona bardzo niska przeciwko gram-negatywnym bakteriom. Porównano właściwości antybakteryjne otrzymanych związków ze standartowymi antybiotykami (Cephalexin i Cephradine) i stwierdzono, że właściwości antybakteryjne kompleksów jonów La(III) i Pr(III) przeciwko *S. aureus*, Sm(III) przeciwko *Serratia* oraz jonów Gd(III), La(III) przeciwko *P. aeruginosa* są znacznie lepsze niż zastosowanych antybiotyków. Pozostale kompleksy wykazują nieznacznya aktywnoc antybakteryjną. Podobnie jak w przytoczonym przykładzie kompleksy charakteryzują się znacznie wyszsza aktywnością antybakteryjną w porównaniu z ligandem [12].

Tabela. Wyniki MIC ($\mu\text{g/mL}$) dla otrzymanego liganda *N,N*-bis(1-naftalenodiamino)-o-fenyleneodiaminy – L^2 i jego kompleksów

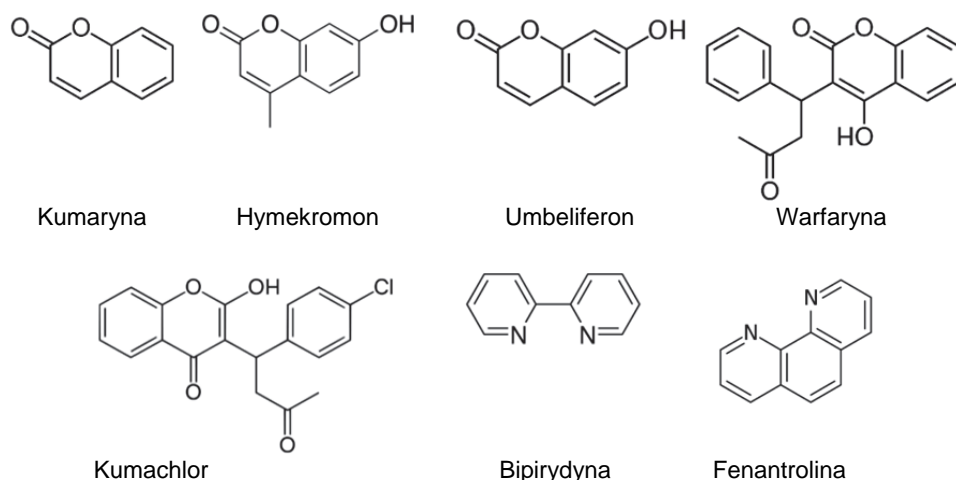
Badany związek	MIC, $\mu\text{g/mL}$						Gram (+) bakterie
	Gram (–) bakterie						
	<i>Sd</i>	<i>Ps</i>	<i>Pv</i>	<i>E. coli</i>	<i>Serratica</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Sa</i>
L	N	62,5	N	62,5	N	N	N
[DyL(NO ₃) ₂ (H ₂ O)](NO ₃)	250	250	125	250	N	N	N
[SmL(NO ₃) ₂](NO ₃)	N	250	N	250	62,5	N	15,6
[PrL(NO ₃) ₂ (H ₂ O)](NO ₃)	N	125	N	125	N	N	3,9
[NdL(NO ₃) ₂](NO ₃)	N	62,5	N	62,5	N	125	7,8
[LaL(NO ₃) ₂ (H ₂ O)](NO ₃)	N	62,5	N	125	N	125	1,95
[ErL(NO ₃) ₂ (H ₂ O)](NO ₃)	N	125	N	125	N	125	250
[GdL(NO ₃) ₂ (H ₂ O)](NO ₃)	N	31,5	N	250	N	125	15,6
Cephalexin	7,8	125	125	15,6	125	7,8	7,8
Cephradine	15,6	125	125	15,6	125	15,6	7,8

Sa – *Staphylococcus aureus*, *Ps* – *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli* – *Escherichia coli*, *Sd* – *Shigella dysenteriae*, *Pv* – *Proteus vulgaris*; Cephalexin and Cephradine – standartowe antybiotyki; N – działanie niewykryte

Wyniki testów antybakteryjnych kompleksów lantanowców wskazują na ich umiarkowane właściwości antybakteryjne w porównaniu z aktywnością ogólnie stosowanych antybiotyków. Dlatego projektowanie i synteza nowych związków, które mogą stać się potencjalnymi nowymi lekami antybakteryjnymi, wymaga dalszych badań.

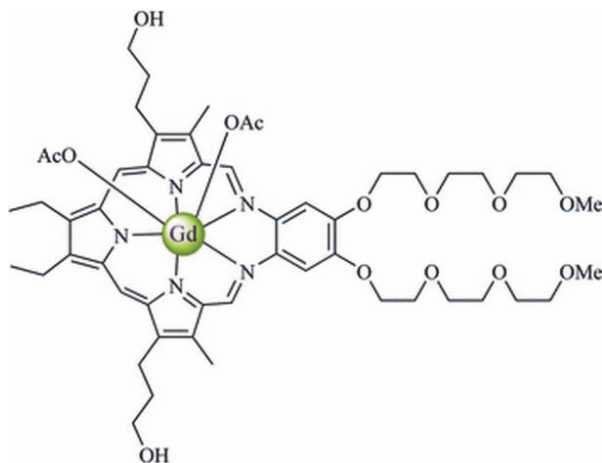
4. Zastosowanie związków lantanowców w leczeniu chorób nowotworowych

Lantanowce (radioizotopy), jak również ich połączenia odgrywają niezmiernie istotną rolę w diagnostyce i leczeniu chorób nowotworowych. Na szczególną uwagę zasługują związki gadolinu, które pełnią ważną rolę jako czynniki kontrastowe w diagnostyce medycznej. Związki jonów lantanowców ze względu na swoje potencjalne działanie antynowotworowe należą do grupy preparatów podlegających intensywnym badaniom. Pierwsze próby kliniczne dowiodły, że nawet prosta sól ceru CeI_3 wykazuje zdolności do zwalczania tzw. guzków litych. Kompleksy jonów ceru(III), lantanu(III) i neodymu(III) z kumaryną i jej pochodnymi, takimi jak hyme-kromon (silny lek o działaniu rozkurczającym), umbeliferon, warfaryna (antagonista witaminy K – środek przeciwzakrzepowy) oraz kumachlor (antykoagulant blokujący protrombinę) – rysunek 5, okazały się w pierwszej fazie badań klinicznych substancjami skutecznie niszczącymi komórki ludzkiej białaczki. Także kompleksy jonu ceru(III) z bipyrydyną oraz fenantroliną są opisywane jako skuteczne czynniki hamujące *in vitro* rozwój komórek nowotworowych. Ponadto stwierdzono, że jon terbu(III) wykazuje właściwości wzmacniające działanie *cis*-platyny, powodując zwiększenie jej akumulacji w komórkach normalnie wykazujących odporność na działanie tego związku [3].



Rys. 5. Wzory ligandów tworzących kompleksy z jonami lantanowców o działaniu antynowotworowym

Jedną z ważniejszych grup związków, która przeszła III fazę testów klinicznych, wykorzystywaną w leczeniu przerzutów komórek nowotworowych z płuc do mózgu, są kompleksy teksafiryiny z jonami lantanowcami. Kompleks Gd (III) z teksafiryną (rys. 6), zwany moteksafiryną gadolinu (MGd), swoje działanie antynowotworowe jako radio- i chemioterapeutyk zawdzięcza wyjątkowym właściwościom redoks [13].



Rys. 6. Kompleks gadolinu (III) z teksafiryną [14]

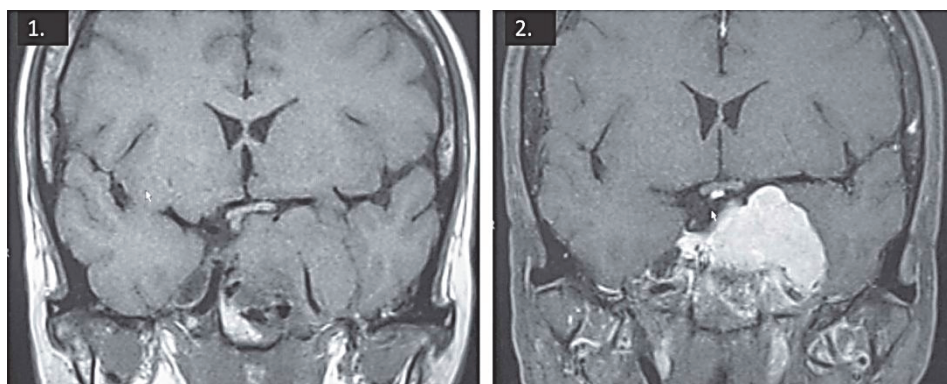
Kompleks MGd może przyjmować elektrony np. z cząsteczek O_2^- i ulegać redukcji. W wypadku beztlenowego środowiska kompleks MGd może usuwać elektrony powstające w wyniku oddziaływania promieniowania jonizującego z wodą, powodując zwiększenie stężenia jonów hydroksylowych. W obecności tlenu natomiast te same inicjujące elektrony tworzą z tlenem jon ponadtlenkowy i zregenerowaną formę kompleksu MGd [15]. Związek gadolinu z teksafiryną uważany jest za substancję, która reagując z antyoksydantami, wytwarza reaktywne związki tlenu (ROS), takie jak O_2^- , H_2O_2 czy OH^\bullet . Związki te oddziałują z takimi biocząsteczkami, jak białka czy kwasy nukleinowe, powodując ich zniszczenie i w konsekwencji prowadząc do apoptozy komórki. Farmakologiczna regulacja procesów redoks, zachodzących w komórkach rakowych, za pomocą kompleksu MGd powoduje wzrost stężenia substancji ROS, co znacznie zwiększa stres oksydacyjny stanowiący naturalny sposób na zwiększenie śmiertelności komórek nowotworowych. W badaniach *in vitro* stwierdzono, że kompleks MGd powoduje przyspieszenie procesu utlenienia kwasu askorbinowego oraz dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NADPH)

w warunkach beztlenowych, a także utlenienie glutationu i białek tiolowych [16]. Podobne działanie jak MGd wykazuje kompleks teksafiryny z jonem lutetu, który oprócz właściwości antynowotworowych stosowany jest także w leczeniu miażdżycy przy chorobach serca oraz degradacji plamki żółtej oka [15, 17]. Ponadto, do leczenia nowotworów pochodzenia neuroendokrynnego w ostatnich latach zaczęto stosować izotop lutetu ^{177}Lu w połączeniu z analogami somatostatyny.

5. Diagnostyka obrazowa a związki kompleksowe jonów lantanowców

Diagnostyka obrazowa (tomografia) to dział medycyny zajmujący się obrazowaniem zmian fizjologicznych, jak również patologicznych zachodzących w organizmie. Wśród metod obrazowania magnetyczny rezonans jądrowy MRI (ang. *magnetic resonance imaging*) jest jedną z podstawowych technik diagnostyki.

Zjawisko magnetycznego rezonansu jądrowego zostało odkryte w 1938 r. przez Isidora Rabięgo, a następnie w 1946 rozszerzone do badania cieczy i ciał stałych przez Felixa Blocha i Edwarda Millsa Purcella. W 1974 r. Paul Lauterbur oficjalnie opublikował pierwszy obraz uzyskany dzięki zjawisku jądrowego rezonansu magnetycznego, przedstawiający przekrój poprzeczny żywej myszy. Pierwsze obrazy ciała ludzkiego uzyskane za pomocą magnetycznego rezonansu jądrowego, które miały wartość diagnostyczną, otrzymali w 1977 r. Larry Minkoff, Michael Goldsmith oraz amerykański fizyk Raymond Vahan Damadian (uważany za twórcę pierwszego aparatu MRI).

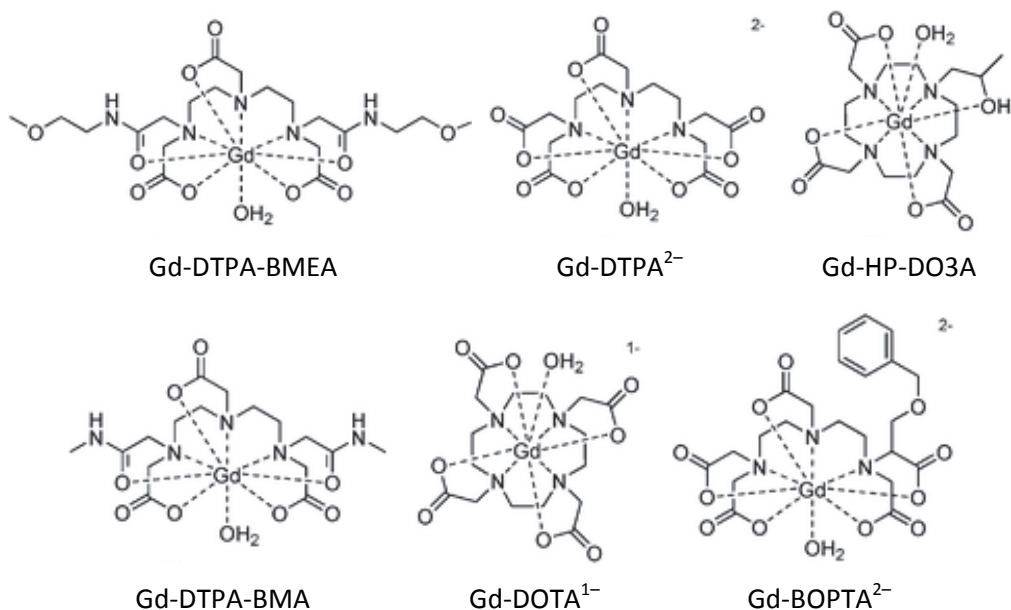


Rys. 7. Zdjęcie MRI mózgu, bez kontrastu (1), z kontrastem (2), ukazujące istnienie oponiaka (łagodnego nowotworu ośrodkowego układu nerwowego) [18]

Pierwsze instalacje kliniczne aparatury do badań MRI na świecie miały miejsce na początku lat 80. XX w., natomiast w Polsce pierwszy aparat został uruchomiony w roku 1991. Dzięki wysokiej czułości i swoistości MRI stał się jedną z najdokładniejszych metod obrazowania i jest wykorzystywany m.in. w diagnozowaniu nowotworów we wczesnych fazach rozwoju, jak również w diagnostyce układu sercowo-naczyniowego. Niezwykle istotne w uzyskaniu medycznie wartościowego obrazu jest zastosowanie odpowiednich środków kontrastowych (rys. 7).

Wzmocnienie obrazu MRI po podaniu środków kontrastowych zawierających jony gadolinu znalazło zastosowanie w diagnostyce chorób: ośrodkowego układu nerwowego, układu mięśniowo-stawowego, serca, wątroby, nerek i nadnerczy oraz narządu rodowego. Głównym zadaniem MRI jest identyfikacja guzów, zmian zapalnych, a także zmian niedokrwienia. Podany dożylnie roztwór kompleksu gadolinu wzbogaca angiografię rezonansu magnetycznego, znacznie zwiększając jakość obrazowania, zwłaszcza małych naczyń. Związki gadolinu mogą być stosowane do uwidocznienia, wykrycia i charakteryzacji guzów nowotworowych lub zmian chorobowych w obrębie głowy i kręgosłupa. Wykorzystywane są również do obrazowania naczyń krwionośnych (z wyjątkiem tętnic serca) w celu diagnostyki zwężenia i niedrożności naczyń (angiografia metodą rezonansu magnetycznego).

Jako środki kontrastowe w badaniach magnetycznego rezonansu stosuje się związki zawierające niesparowane elektrony o relatywnie małym lokalnym polu magnetycznym. Pole to powoduje skrócenie czasów relaksacji T1 i T2 protonów otoczenia, wynikające z wymiany pomiędzy wodą wolną i wodą związaną przez środek kontrastowy. Tkanka kumulująca środek kontrastowy w zależności od sekwencji pomiarowej może wykazywać hiperintensywność sygnału (obrazy T1 zależne) lub hipointensywność (obrazy T2 zależne), co umożliwia uzyskanie obrazu z lepszym kontrastem między tkankami patologicznymi i prawidłowymi. Ze względu na właściwości magnetyczne środki kontrastowe można podzielić na pozytywne i negatywne. Do środków kontrastowych pozytywnych zaliczamy paramagnetyki skracające czas relaksacji T1, zawierające jony gadolinu, manganu, dysprozu i żelaza. W praktyce klinicznej głównie wykorzystywane są paramagnetyki, których podstawowym składnikiem jest gadolin. Komercyjne związki kompleksowe gadolinu stosowane w diagnostyce na szeroką skalę to: megluminian gadoteratu (Gd-DOTA; Dotarem), dimegluminian gadopentatu (Gd-DTPA; Magnevist), gadodiamid (Gd-DTPA-BMA; Omniscan), gadoteridol (Gd-HP-D03A; ProHance), dimegluaminina gadobenasu (MultiHance), gadoresetamide (Optimark) oraz gadobutulum (Gadovist) – rysunek 8 [19, 20].



Rys. 8. Związki kontrastowe gadolinu wykorzystywane w obrazowaniu MRI

Związki kontrastowe gadolinu są to substancje dobrze rozpuszczalne w wodzie, łatwo wchłaniające się z układu krążenia oraz przewodu pokarmowego do przestrzeni międzykomórkowych i relatywnie szybko wydalane przez nerki. Na uwagę zasługuje fakt, że ich podaniu praktycznie nie towarzyszą objawy niepożądane. Jedyne zaobserwowane efekty uboczne to ból głowy i uczucie gorąca (u ok. 1–2% pacjentów). Istotne reakcje niepożądane odnotowano zaledwie u około 0,01% badanych. Z drugiej strony sugeruje się, że ekspozycja na gadolin zawarty w preparatach kontrastowych może być przyczyną rozwoju nefrogennego zwłóknienia układowego (NSF). Pierwsze doniesienia na ten temat opublikowano w 2006 r. U większości pacjentów z przewlekłą chorobą nerek, którym podano kompleksy jonu gadolinu, nie zaobserwowano objawów NSF, jednak oszacowano, że ryzyko zachorowania na NSF u pacjentów w zaawansowanym stadium przewlekłej choroby nerek po ekspozycji na gadolin wynosi około 2,4% i wzrasta po każdej kolejnej ekspozycji lub w przypadku większej dawki preparatu kontrastowego podanego jednorazowo. U chorych na NSF gadolin łączy się z G-proteinowymi receptorami typu C, w tym wapniowymi oraz glutaminianowymi. Uwolnienie jonów gadolinu z preparatów kontrastowych w organizmie ściśle związane jest z rodzajem liganda i wartością stałej trwałości utworzonego kompleksu.

Gadodiamid (Omniscan), gadowersetamid (OptiMark) oraz gadopentat (Magnevist) charakteryzują się łatwym uwalnianiem jonów Gd^{3+} poprzez transmetylację, z następczą ich chelatacją w ustroju. Zdecydowanie mniejszym stopniem uwalniania jonów Gd^{3+} odznaczają się: gadobenat (Multi-Hance), kwas gadoksetowy (Primovist), gadofosfeset (Vasovist), gadoterydol (ProHance), gadobutrol (Gadovist), gadoterat (Dotarem). Nie opisywano przypadków NSF po zastosowaniu tych preparatów. Im dłużej środki zawierające jon gadolinu znajdują się w organizmie, tym większe prawdopodobieństwo uwolnienia jonów Gd^{3+} i wystąpienia nefrogenego zwłóknienia układowego.

6. Perspektywy

Lantanowce i ich związki należą do grupy substancji intensywnie badanych zwłaszcza ze względu na ich właściwości, jakie pełnią w organizmach żywych. Ich zdolność do zastępowania jonu wapnia oraz wiązania cząsteczek wody powoduje, że są to związki intensywnie badane pod względem ich zastosowania w medycynie. Nie ulega wątpliwości rola związków kompleksowych jako substancji antybakteryjnych, jak również preparatów wykorzystywanych w diagnostyce medycznej. Niezwykle istotne wydaje się zastosowanie związków lantanowców jako związków nowej generacji w leczeniu chorób nowotworowych, szczególnie z zastosowaniem związków biologicznie czynnych jako ligandów. Właściwości nowych związków kompleksowych lantanowców mogą stanowić grupę aktywnie czynnych nie tylko *in vitro* substancji antynowotworowych.

Literatura

- [1] Guan Q.-L., Xing Y.-H., Liu J., Wei W.-J., Wang X., Bai F.-Y. (2013) Application of multiple parallel perfused microbio reactors: synthesis, characterization and cytotoxicity testing of the novel rare earth complexes with indole acid as a ligand, *J. Inorg. Biochem.* 128, 57–67.
- [2] Fricker S.P. (2006) The therapeutic application of lanthanides, *Chem. Soc. Rev.* 35, 524–533.
- [3] Wang K., Cheng Y., Yang X., Li R. (2003) Cell responses to lanthanides and potential pharmacological actions of lanthanides, *Met. Ions Biol. Syst.* 40, 707–751.
- [4] Evans C.H. (1983) Interesting and useful biochemical properties of the lanthanides, *Trends Biochem. Sci.* 8(12), 445–449.
- [5] Yeung E.W., Head S.I., Allen D.G. (2003) Gadolinium reduces short-term stretch-induced muscle damage in isolated mdx mouse muscle fibres, *J. Physiol.* 552, 449–458.

- [6] Bootman M.D., Lipp P. (2001) Calcium Signalling and Regulation of Cell Function, *Encyclopedia of Life Sciences*, Nature Publishing Group.
- [7] Subhan A.M., Rahman S., Alam K., Hasan M. (2014) Spectroscopic analysis, DNA binding and antimicrobial activities of metal complexes with phendione and its derivative, *Spectrochim. Acta*, Part A 118, 944–950.
- [8] Fleck M., Karmakar D., Ghosh M., Ghosh A., Saha R., Bandyopadhyay D. (2012) Synthetic aspects, crystal structure and antibacterial activity of two new Schiff base cobalt(III) complexes, *Polyherdon* 34, 157–162.
- [9] Siu Y., Hu R.H., Liu D.S., Wu Q. (2011) Adjustment of the structures and biological activities by the ratio of NIL to RE for two sets of Schiff Base complexes [(NiL)_nRE] (n=1 or 2; RE la or Ce), *Inorg. Chem. Commun.* 14, 396–398.
- [10] Lekha L., Kanmani Raja K., Rajagopal G., Easwaramoorthy D. (2014) Synthesis, spectroscopic characterization and antibacterial studies of lanthanide(III) Schiff base complexes containing N, O donor atoms, *J. Mol. Struct.* 1056–1057, 307–313.
- [11] Logu L., Kamatchi K.R., Rajmohan H., Monohr S., Gurusamy R., Deivanayagam E. (2015) In vitro antimicrobial and antyoxidant evolution of rare earth metal Schiff base complexes derived from threonine, *Appl. Organometal. Chem.* 29, 90–95.
- [12] Taha Z.A., Ajlouni A.M., Momani A.W., Al-Ghzawi A.A. (2011) Syntheses, characterization, biological activities and photophysical properties of lanthanides complexes with a tetradentate Schiff base ligand, *Spectrochim. Acta*, Part A 81, 570–577.
- [13] Evens A.M. (2004) Motexafin gadolinium: a redox-active tumor selective agent for the treatment of cancer, *Curr. Opin. Oncol.* 16, 576–580.
- [14] Storr T., Thompson K.H., Orvig C. (2006) Design of targeting ligands in medicinal inorganic chemistry, *Chem. Soc. Rev.* 35, 534–544.
- [15] Sessler J.L., Miller R.A. (2000) Texaphyrins: New drugs with diverse clinical applications in radiation and photodynamic therapy, *Biochem. Pharmacol.* 59, 733–739.
- [16] Evens A.M., Lecane P., Magda D., Prachand S., Singhal S., Nelson J., Miller R.A., Gartenhaus R.B., Gordon L.I. (2005) Apoptosis following MGd exposure, *Blood* 105, 1265–1273.
- [17] Mody T.D., Fu L., Sessler J.L. (2001) Texaphyrins: Synthesis and Development of a Novel Class of therapeutic Agents', [w:] *Progress in Inorganic Chemistry*, vol. 49, red. K.D. Karlin, John Wiley & Sons, Inc., New York.
- [18] Woods A.D., Caputo M.K. (2014) Essential Uses of Radiologic Testing in Eye Care, *Rev. Optomet.* 1(15), 52–57.
- [19] Normann P.T., Hals P.A. (1995) In vivo stability and excretion of gadodiamide (GdDTPA-BMA), a hydrophilic gadolinium complex used as a contrast enhancing agent for magnetic resonance imaging, *Eur. J. Drug. Metab. Pharmacokinet.* 20(4), 307–313.
- [20] Kumar K., Tweedle M.F. (1993) Macrocyclic polyaminocarboxylate complexes of lanthanides as magnetic resonance imaging contrast agents, *Pure Appl. Chem.* 65(3), 515–520.

ZASTOSOWANIE MODELU TRAWIENIA *IN VITRO* W OCENIE BIOPRZYSWAJALNOŚCI PIERWIASTKÓW ŚLADOWYCH

JUSTYNA WOJCIESZEK, LENA RUZIK, MACIEJ JAROSZ

Katedra Chemii Analitycznej, Wydział Chemiczny, Politechnika Warszawska
ul. Noakowskiego 3, 00-664 Warszawa
e-mail: jwojcieszek@ch.pw.edu.pl

Hasła do zapamiętania: bioprzyswajalność, biodostępność, pierwiastki śladowe, model trawienia *in vitro*, SEC ICP MS

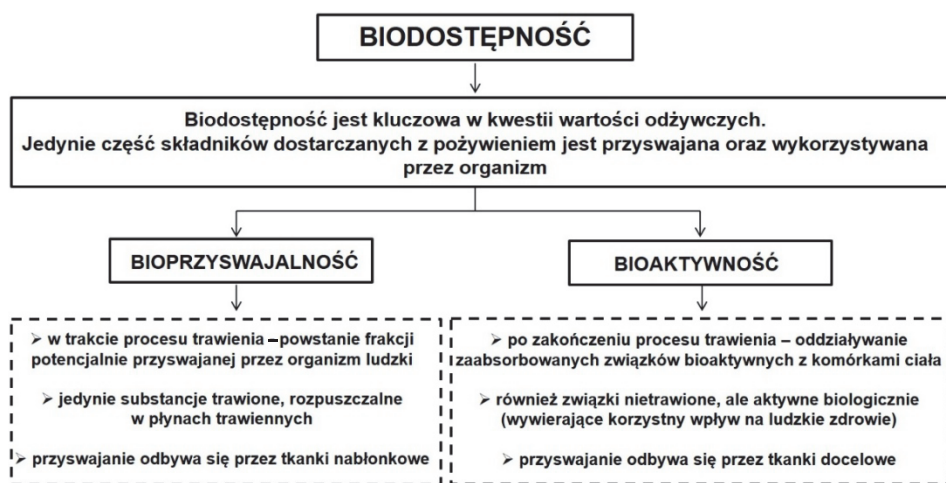
1. Wstęp

1.1. Mikroelementy niezbędne dla organizmu ludzkiego

Niektóre pierwiastki śladowe, takie jak np. miedź, cynk czy mangan, wchodzą w skład komórek jako materiał budulcowy, w skład hormonów, a także wielu enzymów uczestniczących w procesach warunkujących życie. Miedź i mangan są nieodzowne w syntezie katecholamin, a cynk przy wytwarzaniu, magazynowaniu i wydzielaniu insuliny. Pierwiastki śladowe mogą być uważane za ważniejsze od witamin, gdyż nie mogą być syntezowane przez żywy organizm. Istotne jest, aby dostarczane były do organizmu ludzkiego przede wszystkim za pomocą dobrze zbilansowanej diety [1]. Z drugiej strony pierwiastki, które są niezbędne dla ludzkiego życia, mogą także być toksyczne, jeżeli będą występować w organizmie w nadmiarze. Dlatego ważna jest kontrola ich zawartości w żywności, jak również kontrola pozostałych składników pokarmowych (np. białek, tłuszczów, witamin) [2].

1.2. Biodostępność jako połączenie bioprzyswajalności i bioaktywności

Informacje na temat całkowitej zawartości pierwiastków obecnych w produktach żywnościowych można uzyskać z wykorzystaniem różnych technik analitycznych, takich jak absorpcyjna spektrometria atomowa (AAS), optyczna spektrometria emisyjna ze wzbudzeniem w plazmie sprzężonej indukcyjnie (ICP OES) lub spektrometria mas z jonizacją w plazmie sprzężonej indukcyjnie (ICP MS) [1]. Oznaczenie całkowitej zawartości pierwiastków nie jest równoznaczne z określeniem ich biodostępności, bowiem jedynie część związków dostarczanych z pokarmem jest wchłaniana przez organizm ludzki [3]. Oprócz oznaczania całkowitej zawartości istotne jest poznanie formy chemicznej pierwiastków, które są absorbowane z przewodu pokarmowego; zależy od tego ich przyswajanie bądź toksyczność. Informacje na temat wchłanianych związków pierwiastków uzyskiwane są dzięki badaniom nad biodostępnością. Biodostępność może być zdefiniowana jako ilość małowcząsteczkowych związków powstających w trakcie procesu trawienia, które mogą uzyskać dostęp do strumienia krwi i brać udział w procesach metabolicznych zachodzących w organizmie ludzkim. Biodostępność jest pojęciem obejmującym bioprzyswajalność oraz bioaktywność, jednak ze względu na trudności praktyczne oraz etyczne pojawiające się podczas badania aktywności biologicznej składników pożywienia biodostępność sprowadza się bardziej do określania bioprzyswajalności. Pomimo że terminy biodostęp-



Rys. 1. Biodostępność jako 'suma' bioprzyswajalności oraz bioaktywności

ność oraz bioprzyswajalność często są stosowane zamiennie, należy pamiętać, iż w biodostępności zawarta jest dodatkowo bioaktywność (rys. 1) [4, 5]. Określenie bioaktywności jest istotne w wypadku badań nad nietrawionymi składnikami pożywienia, np. wielocukrami oraz oligocukrami, które pomimo że nie są wchłaniane przez organizm, to mają korzystny wpływ na ludzkie zdrowie [6].

1.3. Bioprzyswajalność

Miarą bioprzyswajalności jest wielkość frakcji rozpuszczalnych w płynach trawiennych związków pierwiastków zdolnych do przenikania przez ściany jelita cienkiego, uwalnianych z matrycy produktu żywnościowego i obecnych w przewodzie pokarmowym człowieka [7]. Rozpuszczalność związków pierwiastków w płynach trawiennych człowieka umożliwia ich absorpcję, tak więc bioprzyswajalność jest wskaźnikiem biodostępności. Badania bioprzyswajalności dostarczają informację na temat zawartości oraz formy pierwiastków dostępnych oraz potencjalnie wchłanianych przez organizm ludzki; pomagają wykazać, czy składnik pożywienia jest efektywnie trawiony oraz przyswajany. Na rzeczywistą ilość substancji odżywczych przyswajanych przez organizm ludzki wpływ mają: (1) czynniki związane ze stosowaną dietą (np. oddziaływanie analizowanych substancji z innymi składnikami pożywienia lub stopień ich uwolnienia z matrycy produktu spożywczego) oraz (2) czynniki fizjologiczne (np. płeć, wiek, geny, przebyte choroby). Szacowanie bioprzyswajalności jest pomocne w dobieraniu odpowiedniej dawki oraz źródła pożywienia tak, aby zapewnić jak największy efekt odżywczy, co ma korzystny wpływ na zdrowie człowieka [5, 7, 8].

1.4. Badanie trawienia metodą *in vivo*

Badania procesu trawienia pokarmu są stosowane w naukach o żywności. Prowadzi się je dwoma metodami – *in vivo* oraz *in vitro*. Trawienie *in vivo* prowadzone jest na ludziach bądź zwierzętach. Badany składnik jest podawany jako komponent zbilansowanej diety, a następnie, po ustalonym czasie, określana jest jego ilość zatrzymana przez organizm ludzki (na podstawie oznaczenia różnicy zawartości składnika w spożytym pokarmie oraz w wydalonym kale i moczu). Prowadzenie badań na ludziach lub zwierzętach jest często kosztowne, zasobo- i czasochłonne, a także etycznie dyskusyjne. Dlatego w większości wypadków stosowany jest model trawienia *in vitro*, symulujący procesy zachodzące w przewodzie pokarmowym człowieka [8].

1.5. Badanie trawienia metodą *in vitro*

Trawienie pokarmu jest skomplikowanym procesem, w trakcie którego wielkocząsteczkowe związki obecne w spożytej żywności ulegają przekształceniu w składniki odżywcze, które wykorzystywane są do wzrostu i ochrony komórek ciała ludzkiego. Podczas trawienia pokarmu dwa główne procesy zachodzą w tym samym czasie: (1) mechaniczne – zmniejszanie rozmiarów cząstek żywności (głównie jama ustna oraz żołądek) oraz (2) enzymatyczne – hydroliza makrocząsteczek do związków, które wchłaniane są do krwiobiegu (głównie żołądek oraz jelito cienkie). Badanie tych procesów możliwe jest dzięki zastosowaniu metod *in vitro*, które zostały opracowane jako proste narzędzia do badania drogi pokarmu w przewodzie pokarmowym człowieka. Oparte są one na fizjologii człowieka i obejmują transport pożywienia przez ściany jelit, metabolizm, a także przewidywanie biodostępności różnych składników żywności [9]. Zasadniczo metody trawienia *in vitro* stanowią szybką oraz niedrogą alternatywę dla badań *in vivo*, prowadzonych na ludziach lub zwierzętach. Modele *in vitro* pozwalają na uzyskanie dokładnych rezultatów w krótkim czasie i dlatego mogą być odpowiednim narzędziem do kontroli spożywanych produktów spożywczych. Wyniki otrzymywane za pomocą tych metod oparte są na tworzeniu frakcji przyswajalnej, która reprezentuje maksymalne stężenia pierwiastków rozpuszczalnych w płynach trawiennych [10]. Postępowanie *in vitro* powinno naśladować procesy zachodzące w dwóch lub trzech obszarach układu pokarmowego (tj. jama ustna, żołądek, jelito cienkie). Najbardziej popularne jest dwuetapowe postępowanie mające na celu odwzorowanie trawienia żołądkowego oraz jelitowego z zastosowaniem roztworów enzymów trawiennych, w skład których wchodzi głównie amylaza (obecna w jamie ustnej, odpowiedzialna za wstępną hydrolizę węglowodanów), pepsyna (obecna w żołądku, powoduje wstępny rozkład wielkocząsteczkowych białek), pankreatyna (obecna w jelicie cienkim mieszanina lipazy – trawienie tłuszczów, proteazy – trawienie białek, amylazy – trawienie cukrów), a także sole żółciowe (powodują emulgację tłuszczów oraz wspomagają ich wchłanianie w jelicie cienkim) i związki nieorganiczne. Ważne jest, aby warunki (temperatura, środowisko, czas poszczególnych etapów, wykorzystywane enzymy) stosowane podczas symulacji procesu trawienia były jak najbardziej zbliżone do warunków rzeczywistych procesów zachodzących w przewodzie pokarmowym człowieka. Próbkę są inkubowane w takich warunkach, aby naśladować perystaltykę żołądka i jelit. W celu symulacji procesu mieszania pokarmu na każdym etapie ekstrakcji enzymatycznej wykorzystywane są różne techniki wytrąsania. Proces najczę-

ściej prowadzony jest w łaźni wodnej z łagodnym mieszaniem. Podczas procesu ekstrakcji próbki inkubowane są w temperaturze normalnie panującej w ludzkim ciele, co pozwala enzymom trawiennym na skuteczne działanie [11–13].

Podsumowując, badania procesów zachodzących w przewodzie pokarmowym człowieka powinny być prowadzone w następujący sposób:

- temperatura 37°C podczas wszystkich etapów procesu trawienia;
- pH 6,5 w obecności śliny w ciągu około 2 min (etap często pomijany ze względu na krótki czas przebywania pokarmu w jamie ustnej);
- pH 1–4 w obecności kwasu chlorowodorowego oraz pepsyny w ciągu około 3 h (symulacja trawienia żołądkowego);
- pH 4–7,5 w obecności soków jelitowych w ciągu około 7 h (symulacja trawienia zachodzącego w jelicie cienkim).

Przed analizą frakcji uzyskanych na każdym etapie badania obecne w nich związki metali muszą zostać oddzielone. Związki przyswajalne oddzielane są najczęściej za pomocą wirowania, filtracji i/lub dializy. Zastosowanie tych technik może wpływać na odzysk metali, co trzeba wziąć pod uwagę podczas opracowywania metod trawienia *in vitro* pierwiastków śladowych. Frakcje uzyskane w wyniku symulacji trawienia mogą być także poddawane kolejnym procesom imitującym wchłanianie związków pierwiastków do organizmu człowieka. Postępowania te realizowane są głównie za pomocą ultrafiltracji lub przy użyciu membran dializacyjnych o odpowiedniej średnicy porów, zależnej od rozmiarów strawionych produktów żywnościowych. Nieliczne grupy badawcze prowadzą także badania z etapem symulującym wchłanianie pokarmu poprzez zastosowanie kultur komórek nabłonka jelitowego (głównie Caco-2) [11].

2. Badania własne – oszacowanie bioprzyswajalności związków manganu obecnych w jagodzie czarnej

Jagody czarne (*Vaccinium Myrtillus* L.) wykorzystywane są głównie ze względu na swoje prozdrowotne właściwości, m.in. wspomagają leczenie chorób oczu, poprawiają pracę układu krążenia. Znajdujące się w jagodach flawonoidy mają działanie przeciwnowotworowe, natomiast garbniki neutralizują toksyny pokarmowe. Celem prezentowanych badań była ocena bioprzyswajalności wybranych pierwiastków obecnych w jagodach (na przykładzie manganu – duża zawartość w badanych owocach) poprzez zastosowanie dwuetapowej symulacji procesu trawienia *in vitro* przy użyciu roztworu pepsyny jako soku żołądkowego oraz pankreatyny jako soku jelitowego. Aby określić bioprzyswajalność ważnych składni-

ków odżywczych z jagody czarnej, oszacowana została wydajność ekstrakcji enzymatycznej poprzez porównanie zawartości pierwiastków obecnych w ekstraktach trawiennych oraz całkowitej zawartości pierwiastków w próbkach po mineralizacji.

Badania wykonywane były z wykorzystaniem chromatografii rozmiarów wykluczania (SEC), pozwalającej na rozdzielenie składników pokarmu w zależności od ich masy cząsteczkowej, w połączeniu ze spektrometrem mas z jonizacją w plazmie indukcyjnie sprzężonej (ICP MS). Oznaczenie całkowitych zawartości metali oraz ich zawartości w roztworach trawionych prowadzone było przy użyciu ICP MS jako detektora specyficznego pierwiastkowo.

W celu oznaczenia całkowitej zawartości wybranych pierwiastków próbki jagód poddawano mineralizacji na mokro w układzie zamkniętym, w obecności stężonego kwasu azotowego(V) oraz nadtlenu wodoru. Po mineralizacji próbki rozcieńczano wodą, a następnie dokonywano kolejnych rozcieńczeń przed analizą ICP MS. Roztwory próbek oraz wzorców przygotowane były z dodatkiem itru (^{89}Y) jako wzorca wewnętrznego.

Jagody czarne poddawane symulacji procesu trawienia były uprzednio liofilizowane oraz homogenizowane, co pozwalało imitować proces rozdrabniania pokarmu w jamie ustnej. Trawienie żołądkowe symulowane było z wykorzystaniem roztworu pepsyny o pH 1,8 (ustalone za pomocą kwasu chlorowodorowego) przygotowanej w roztworze chlorku sodu. Symulacja trawienia jelitowego prowadzona była za pomocą roztworu pankreatyny (mieszanina trypsyny, amylazy oraz lipazy) dodawanej do ekstraktu żołądkowego. Enzymy obecne w jelicie cienkim są aktywne w pH około 7, dlatego roztwór wodorowęglanu sodu został użyty w celu ustalenia odpowiedniego pH. Symulacja procesu trawienia była prowadzona w temperaturze 37°C, w łaźni wodnej z wytrząsaniem, przez 3 h na każdym etapie ekstrakcji. Frakcje przyswajalnych związków pierwiastków były wydzielane za pomocą wirowania oraz sączenia przez filtry nastrzykawkowe, a otrzymane roztwory były analizowane przy użyciu techniki SEC ICP MS.

Tabela. Całkowita zawartość manganu oraz jego zawartość w ekstraktach trawiennych

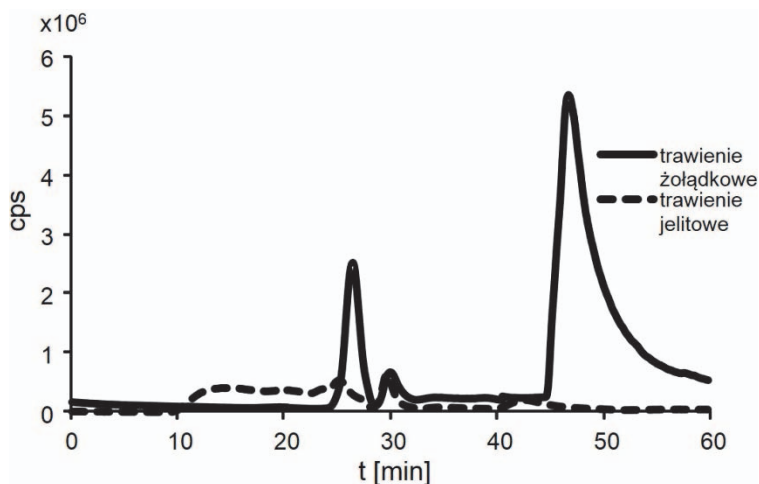
	Całkowita zawartość [$\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$]	Ekstrakt żołądkowy [$\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ (%)]	Ekstrakt żołądkowo-jelitowy [$\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ (%)]
Mangan	589,2	538,1 (91%)	613,9 (104%)

% całkowitej zawartości manganu

Owoce czarnej jagody są bogatym źródłem manganu. W tabeli przedstawiono wyniki całkowitej zawartości manganu w jagodach, oszacowano także bioprzyswajalność manganu z czarnej jagody poprzez określenie wydajności ekstrakcji enzymatycznej (porównanie zawartości manganu w ekstraktach trawiennych z jego całkowitą zawartością w jagodach –

$$\text{bioprzyswajalność} = \frac{\text{frakcja wyekstrahowana}}{\text{całkowita zawartość}} \times 100\%.$$

Analiza danych otrzymanych po przeprowadzeniu symulacji trawienia żołądkowo-jelitowego pozwala stwierdzić, że już po symulacji trawienia żołądkowego wydajność ekstrakcji manganu uzyskuje wartość powyżej 90%, natomiast po zakończeniu symulacji procesu trawienia wartość ta wynosi 104%. Prowadzi to do wniosku, że wszystkie związki manganu obecne w jagodzie czarnej są rozpuszczalne w płynach trawiennych, a więc są przyswajalne i mogą zostać zaabsorbowane przez organizm ludzki.



Rys. 2. Profile chromatograficzne ekstraktów trawiennych uzyskane dla ^{55}Mn

Na rysunku 2 przedstawiono profile chromatograficzne manganu uzyskane po analizie ekstraktów trawiennych z wykorzystaniem techniki SEC ICP MS. Na chromatogramach można zaobserwować jeden wspólny sygnał dla obu ekstraktów, przy $t_r = 29,5$ min, prawdopodobnie od związków manganu z produktami rozpadu białek lub enzymu pepsyny, która może ulegać samotrawieniu. Ponieważ pepsyna jest enzymem odpowiedzialnym za wstępne trawienie białek, sygnały przy $t_r = 26,5$ oraz $46,5$ min,

odpowiadają prawdopodobnie kompleksom ze związkami powstałymi w wyniku rozpadu białek. Sygnały przy $t_r = 26,5$ oraz $29,5$ min, uzyskane po analizie ekstraktu żołądkowego, znajdują się w obszarze mas cząsteczkowych pomiędzy 44 a 17 kDa, co może być potwierdzeniem obecności kompleksów manganu z zastosowanymi enzymami trawiennymi lub z produktami ich rozpadu. Dodatkowy sygnał przy $t_r = 24,5$ min, obecny na chromatogramie po analizie ekstraktu jelitowego, odpowiada prawdopodobnie połączeniom manganu z produktami rozpadu cukrów lub kwasów organicznych, których dużą zawartość oznaczono w jagodzie czarnej.

Przeprowadzone badania dostarczyły informacji o wysokiej przyswajalności związków manganu obecnych w czarnych jagodach. Analiza ekstraktów trawiennych za pomocą techniki SEC ICP MS wskazała, iż związki manganu obecne w roztworach uzyskanych w wyniku symulacji trawienia mają średnie i małe masy cząsteczkowe, pomiędzy 44 i 1 kDa.

3. Perspektywy

W ciągu ostatnich lat opracowano modele trawienia *in vitro*, które znalazły zastosowanie w wielu badaniach żywieniowych oraz zdrowotnych. Prowadzone badania dostarczają cennych informacji na temat biodostępności składników odżywczych obecnych w spożywanym pokarmie, a także zanieczyszczeń występujących w żywności. Niestety, w dalszym ciągu nie jest możliwa symulacja wszystkich parametrów trawiennych *in vivo* z zastosowaniem jednego modelu *in vitro*. Niezbędne są dalsze badania, które pozwolą na rozszerzenie potencjału sztucznych modeli trawiennych i lepsze zbliżenie się do rzeczywistych procesów zachodzących w organizmie człowieka podczas trawienia pokarmu. Opracowanie odpowiednich, bardziej szczegółowych metod *in vitro* może doprowadzić do powstania materiałów certyfikowanych (CRM) wraz z wytycznymi do ich stosowania. Rozwój CRM pozwoliłby na odpowiednią kontrolę jakości we wszystkich laboratoriach.

Literatura

- [1] Khouzam R.B., Pohl P., Łobiński R. (2011) Bioaccessibility of essential elements from white cheese, bread, fruit and vegetables, *Talanta* 86, 425–428.
- [2] He M., Wang W.-X. (2013) Bioaccessibility of 12 trace elements in marine molluscs, *Food Chem. Toxicol.* 55, 627–636.
- [3] Cabañero A.I., Madrid Y., Cámara C. (2004) Selenium and mercury bioaccessibility in fish samples: an *in vitro* digestion method, *Anal. Chim. Acta* 526, 51–61.

- [4] Erdemir U.S., Gucer S. (2015) Bioaccessibility of copper in Turkish hazelnuts (*Corylus avellana* L.) by chemical fractionation and *in vitro* methods, *Biol. Trace Elem. Res.* 167, 146–154.
- [5] Fernández-García E., Carvajal-Lérida I., Pérez-Gálvez A. (2009) *In vitro* bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency, *Nutr. Res.* 29, 751–760.
- [6] Roberfroid M. (2002) Functional food concept and its application to prebiotics, *Digest Liver Dis.* 34, 105–110.
- [7] Carbonell-Capella J.M., Buniowska M., Barba F.J., Esteve M.J., Frígola A. (2014) Analytical methods for determining bioavailability and bioaccessibility of bioactive compounds from fruits and vegetables: A Review, *Compr. Rev. Food Sci. F.* 13, 155–171.
- [8] Gawęcki J. (red.) (2012) *Żywnienie człowieka. Podstawy nauki o żywieniu*, Wyd. Nauk. PWN, Warszawa, 101–106.
- [9] Granado-Lorencio F., Olmedilla-Alonso B., Herrero-Barbudo C., Blanco-Navarro I., Pérez-Sacristán B., Blázquez-García S. (2007) *In vitro* bioaccessibility of carotenoids and tocopherols from fruits and vegetables, *Food Chem.* 102, 641–648.
- [10] Kulkarni S.D., Acharya R., Rajurkar N.S., Reddy A.V.R. (2007) Evaluation of bioaccessibility of some essential elements from wheatgrass (*Triticum aestivum* L.) by *in vitro* digestion method, *Food Chem.* 103, 681–688.
- [11] Intawongse M., Dean J.R. (2006) *In-vitro* testing for assessing oral bioaccessibility of trace metals in soil and food samples, *Trends Anal. Chem.* 25, 876–886.
- [12] Guerra A., Etienne-Mesmin L., Livrelli V., Denis S., Blanquet-Diot S., Alric M. (2012) Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion, *Trends Biotechnol.* 30, 591–600.
- [13] Hur S.J., Lim B.O., Decker E.A., McClements D.J. (2011) *In vitro* human digestion models for food applications, *Food Chem.* 125, 1–12.

OKREŚLANIE ZMIAN HOMEOSTAZY METALI W KOMÓRKACH RAKOWYCH I PRAWIDŁOWYCH ZA POMOCĄ SPEKTROMETRII MAS Z JONIZACJĄ W PLAZMIE INDUKCYJNIE SPRZĘŻONEJ

WIOLETTA JAKUBCZAK¹, MAJA HACZYK², MICHAŁ CHUDY²,
ARTUR DYBKO², KATARZYNA PAWLAK¹

¹ Katedra Chemii Analitycznej, Wydział Chemiczny, Politechnika Warszawska
ul. Noakowskiego 3, 00-664

² Zakład Mikrobioanalitiky, Wydział Chemiczny, Politechnika Warszawska
ul. Noakowskiego 3, 00-664

e-mail: wiolettajakubczak@o2.pl; mhaczyk@ch.pw.edu.pl; chudziak@ch.pw.edu.pl;
dybko@ch.pw.edu.pl; kpawlak@ch.pw.edu.pl

Hasła: ICP MS, CE-ICP MS, SEC-ICP MS, komórki nowotworowe A549,
komórki prawidłowe MRC-5, auranofina, cisplatyna

Wykaz skrótów:

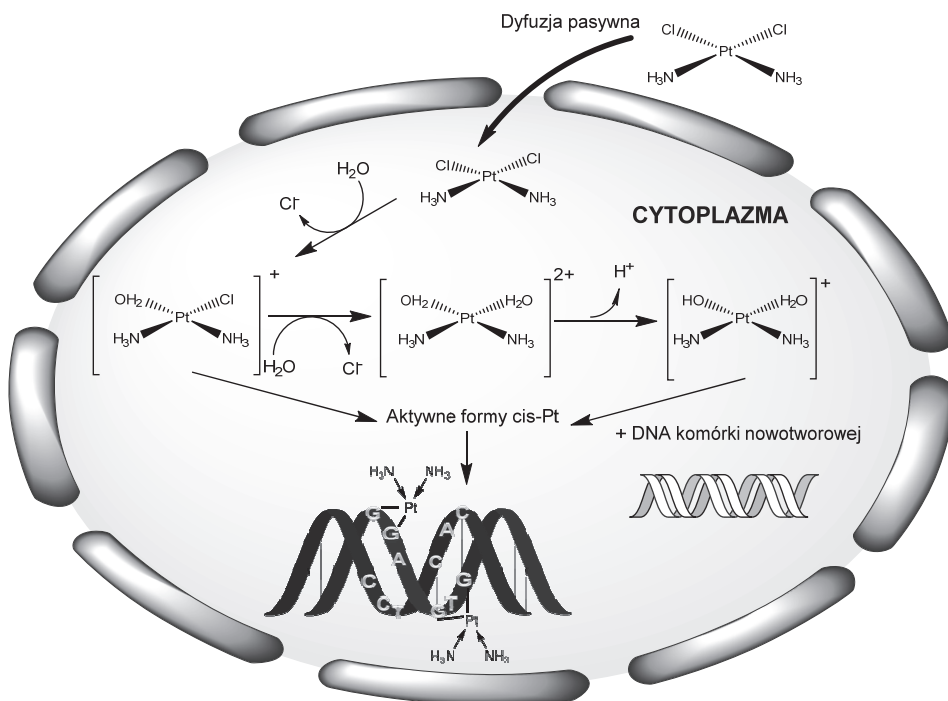
AUF	– auranofina
cis-Pt	– cisplatyna
A549	– komórki nowotworowe raka płuc
MRC-5	– komórki prawidłowe
TRxR	– reduktaza tioredoksynowa mitochondriów
PARP	– polimeraza poli(ADP-rybozy)-1
SEC-ICP MS	– chromatografia wykluczania połączona ze spektrometrią mas z jonizacją w plazmie indukcyjnie sprzężonej
CE-ICP MS	– strefowa elektroforeza kapilarna połączona z ICP MS
Tris	– 2-amino-2-hydroksyetylo-propano-1,3-diol
HEPES	– kwas 2-[4-(2-hydroksyetylo)-piperazyn-1-ylo] etanosulfonowy

1. Wstęp

Chemioterapia obok chirurgii i radioterapii jest w dalszym ciągu jedną z podstawowych metod leczenia nowotworów. Leki przeciwnowotworowe, zwane również cytostatykami, wykazują działanie antyproliferacyjne. Na skutek zmian zachodzących w strukturze DNA dochodzi do inicjacji apoptozy, czyli tzw. programowanej śmierci komórki [1].

1.1. Cisplatyna

Cisplatyna (cis-Pt) ze względu na fakt, iż należy do grupy leków alkilujących wymaga obecności w swej strukturze dwóch ligandów (anionów chlorkowych) aktywnych chemicznie, będących względem siebie w położeniu *cis* oraz dwóch ligandów niereaktywnych (np. grupy aminowe). Oddziaływanie leków platynowych z niemi DNA jest zawsze poprzedzone procesem hydrolizy i zawsze prowadzi do otrzymania aktywnych metabolitów (rys. 1). Mechanizm działania kompleksów platyny polega na



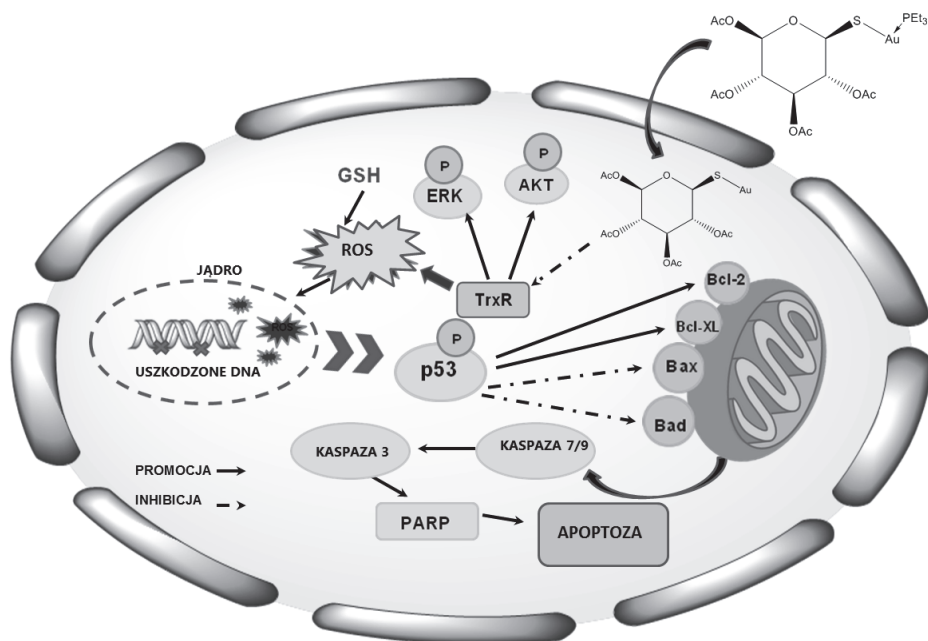
Rys. 1. Mechanizm oddziaływania cis-Pt z DNA

inhibicji replikacji DNA poprzez tworzenie krzyżowych wiązań wewnątrznicowych między sąsiadującymi niciami DNA, jak i w obrębie tej samej nici. Głównym miejscem ataku cisplatyny jest przede wszystkim silnie nukleofilowy atom N(7) guaniny (rys. 1). Utworzenie licznych poprzecznych, dwufunkcyjnych, 1,2-wewnątrznicowych wiązań stanowiących aż 65% spośród wszystkich możliwych wiązań, jakie mogą zostać wytworzone między atomem guaniny a cząsteczką cisplatyny uniemożliwia replikację DNA, a tym samym podział komórki. Oprócz tego wpływa na funkcje metaboliczne, prowadząc do apoptozy komórki.

Cisplatyna jest wysoce skuteczna w leczeniu raka jąder i jajnika, a także jest powszechnie stosowana w leczeniu raka pęcherza moczowego, szyjki macicy, mózgu i płuc. Pomimo sukcesów cis-Pt powoduje wiele skutków ubocznych, takich jak: nefro-, neuro- i ototoksyczność oraz nudności i wymioty [2–4]. Najbardziej niekorzystna jest jednak coraz częściej występująca lekooporność.

1.2. Auranofina

Auranofina (1-tio-2,3,4,6-tetraacetylo- β -D-glukozo-trietylofosfina złota(I), AUF) jest kompleksem złota – aurotioglukozą zawierającą aktywną grupę trietylofosfinową, która łatwo ulega odłączeniu, odsłaniając aktywne centrum koordynacyjne w postaci złota (rys. 2). Związek ten stosowano z powodzeniem w leczeniu reumatoidalnego zapalenia stawów. Hamuje on reduktazę tioredoksynową mitochondriów (TrxR) i katepsyny B. Oprócz tego auranofina ma zdolność do generowania reaktywnych form tlenu (ROS), które prowadzą do uszkodzenia łańcucha DNA, a także do blokowania fosforylacji kinaz Akt i ERK [4–6]. Uważa się, że auranofina, jak i inne kompleksy złota, hamuje działanie białka kinazy C oraz metaloenzymów wiążących cynk(II). Kinaza C jest ponadto odpowiedzialna za wewnątrzkomórkowy proces transdukcji sygnału poprzez fosforylowanie reszt serynowej i treoninowej w białku p53 [5–8]. Białko to odpowiedzialne jest za uruchomienie wielu procesów naprawczych DNA (supresję nowotworu). W wypadku braku efektów inicjowana jest apoptoza komórki poprzez zwiększoną ekspresję genów Bcl-2, Bcl-XL i inhibicję genów Bax i Bad prowadzących do uwalniania z mitochondrium cytochromu C odpowiedzialnego za aktywację kaspaz i śmierć komórki. Aktywacja kaspaz prowadzi do proteolizy istotnych białek komórkowych (np. PARP), a to do apoptozy komórki (rys. 2).



Rys. 2. Spodziewany mechanizm działania auranofiny w komórkach nowotworowych

Wydatność działania metaloleków jest zależna od stopnia akumulacji tych związków przez komórki i reaktywności produktów przemiany metaloleków w środowisku komórki.

1.3. Techniki rozdzielania sprzężone z ICP MS

Do najbardziej popularnych technik oznaczania metali zalicza się spektrometrię mas z jonizacją w plazmie indukcyjnie sprzężonej, ICP MS. Oferuje ona doskonałą czułość ze względu na wydajne źródło jonizacji atomów oraz dobrą selektywność zapewnianą przez rozróżniający izotopy analizator mas. ICP MS jest zatem doskonałym narzędziem do wykrywania i oznaczania *ex vivo* metali w różnych płynach ustrojowych, tkance biologicznej, jak i w pojedynczych komórkach. Ponadto, metody przy ich użyciu są powtarzalne i łatwo odtwarzalne. Oznaczone mogą być nie tylko metale toksyczne, ale także mikroelementy o dużym znaczeniu biologicznym (Fe, Zn, Cu, Mn).

W wypadku badania przemian związków zawierających metale w organizmach żywych konieczna jest analiza specyjna pozwalająca

na rozróżnienie form badanego metalu. Ponieważ specjacja badana jest w próbkach pochodzenia biologicznego na poziomie śladowym i ultraśladowym, konieczne jest stosowanie różnych technik rozdzielania w połączeniu z czułą detekcją, jak ICP MS. Techniki te dzielimy na dwie główne grupy [9–11]: chromatograficzne i elektromigracyjne. Do głównych technik rozdzielania chromatograficznego związków pochodzenia biologicznego należy chromatografia cieczowa: wykluczania (SEC) lub w odwróconym układzie faz (RPLC). Podstawowymi technikami elektromigracyjnymi natomiast są strefowa elektroforeza kapilarna (CZE) i micelarna chromatografia elektrokinetyczna (MEKC). Spośród wymienionych technik rozdzielania chromatografia wykluczania pozwala na szybkie określenie powinowactwa badanego kompleksu metali do białek.

Celem badań jest opracowanie metod badania cytotoksyczności wybranych metaloleków, ich reaktywności i wpływu na homeostazę metali w komórkach rakowych badanych *in vitro*. Uzyskane wyniki mają za zadanie pozwolić scharakteryzować złożony mechanizm transportu kompleksów metali do komórki i ich aktywacji.

2. Część eksperymentalna

2.1. Stosowane roztwory

Roztwór cisplatyny o stężeniu 1,79 mM przygotowywano w roztworze pożywki. Proces wspomagano poprzez intensywne mieszanie roztworu w temperaturze 37°C, co miało za zadanie przyspieszyć proces aktywacji cisplatyny poprzez jej hydrolizę. Roztwór auranofiny o stężeniu 0,114 mM przygotowywano poprzez rozpuszczenie odpowiedniej ilości związku w dimetylosulfotlenku (DMSO) i dodaniu roztworu pożywki tak, aby zawartość DMSO w końcowym roztworze nie przekraczała 1% i nie wpływała na żywotność komórek. Auranofina jest związkiem światłoczułym, dlatego wszystkie etapy pracy wykonywano w ciemnym pomieszczeniu.

2.2. Linie komórkowe i ich hodowla

Linie komórkowe A549 i MRC-5 (nowotworowe i prawidłowe ludzkie komórki płuc) pozyskano z Amerykańskiej Kolekcji Hodowli Komórkowych – ATCC. Komórki były utrzymywane w hodowli ciągłej

w monowarstwie, w temperaturze 37°C i atmosferze zawierającej 5% ditlenku węgla. Medium hodowlane stanowiła baza EMEM (ang. *Eagle Minimal Essential Medium*) z dodatkiem 10-procentowej bydlęcej surowicy płodowej (FBS), 1 mM mieszanki antybiotyków penicyliny/streptomycyny i 0,25 mM L-glutaminy. Dodatkowo w medium hodowlanym przeznaczonym dla komórek MRC-5 znajdowały się aminokwasy endogenne (NEAA). Komórki obu linii były pasażowane co drugi dzień. Po 24 h do hodowli dodawano roztwory cisplatyny lub auranofiny, tak aby ich stężenie w medium hodowlanym wynosiło odpowiednio: 0,1; 6; 10; 25 μM dla cis-Pt, natomiast 0,1; 0,6; 1; 1,4 μM dla AUF. Komórki inkubowano przez 24 lub 72 h i zbierano w postaci dwóch frakcji: (1) te, które same odkleiły się od podłoża oraz (2) komórki odklejane trypsyną. Komórki odwirowywano i zawieszano w wodzie tak, aby gęstość komórek nie była mniejsza niż 1×10^5 komórek/ml. Zawieszono komórki poddawano lizie za pomocą szklanej sondy ultradźwiękowej wyposażonej w szklaną końcówkę, która nie zanieczyszcza próbki jonami metali. Otrzymane lizaty, po dwukrotnym odwirowaniu i przesączeniu, poddawano analizie za pomocą ICP MS i SEC-ICP MS na różnych stopniach rozcieńczenia (1:1, 1:3, 1:10, 1:20). Odpowiednie rozcieńczenia były ustalane poprzez porównanie średnich stężeń ($n = 3$) i wyznaczonych dla nich odchyleń standardowych.

2.3. Oznaczanie zawartości Au i Pt w komórkach za pomocą ICP MS

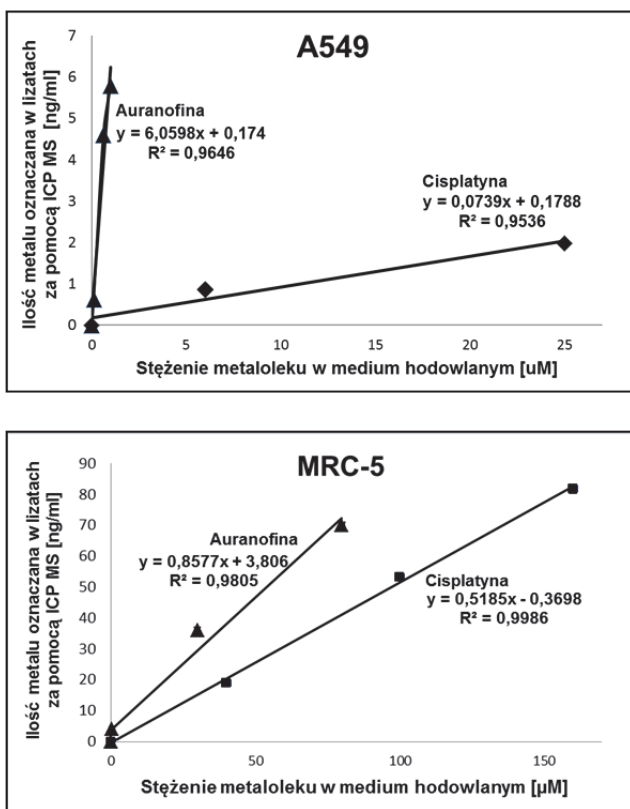
Ze względu na bogaty skład lizatów, który może wpływać na wydajność rozpylania próbki i jednorodność aerozolu, sprawdzono natężenie sygnałów i poziom szumów dla trzech rozpylaczy: V-groove, koncentrycznego i krzyżowego. Stwierdzono, że najlepszy stosunek sygnału do szumu ($S/N = 50\text{--}60$ dla 10 ppb ^{89}Y) uzyskano dla rozpylaczy koncentrycznego i krzyżowego, pracujących w trybie aspiracji (moc plazmy 1290 W, przepływ gazu rozpylającego $1,1 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$). Rozpylacz krzyżowy używał jednak dwa razy mniejsze objętości próbki i został wybrany do dalszych pomiarów. Podczas prowadzonych badań stosowano niklowy próbnik w celu oznaczenia platyny (granica wykrywalności 0,05 ng/ml), natomiast próbnik platynowy pozwolił zmniejszyć szumy oraz granicę wykrywalności (poniżej 0,2 ng/ml) dla Cu, Mo, Ni i Au. Efekt matrycowy kompensowano poprzez kalibrację aparatu przy użyciu roztworów substancji wzorcowych przygotowanych w odpowiednich kwasach oraz dodanie oczyszczonych składników cytozolu.

2.4. Badanie przemian auranofiny i cisplatyny za pomocą SEC-ICP MS

Podczas pomiarów prowadzonych w celu zarejestrowania przemian zachodzących w komórkach podczas stosowania metaloleków za pomocą techniki SEC ICP MS wykorzystano kolumnę Superdex™ 200 10/300 GL, fazą ruchomą był roztwór Tris-H₃PO₄ o pH = 7,4 (przepływ 0,5 ml/min).

3. Wyniki i dyskusja

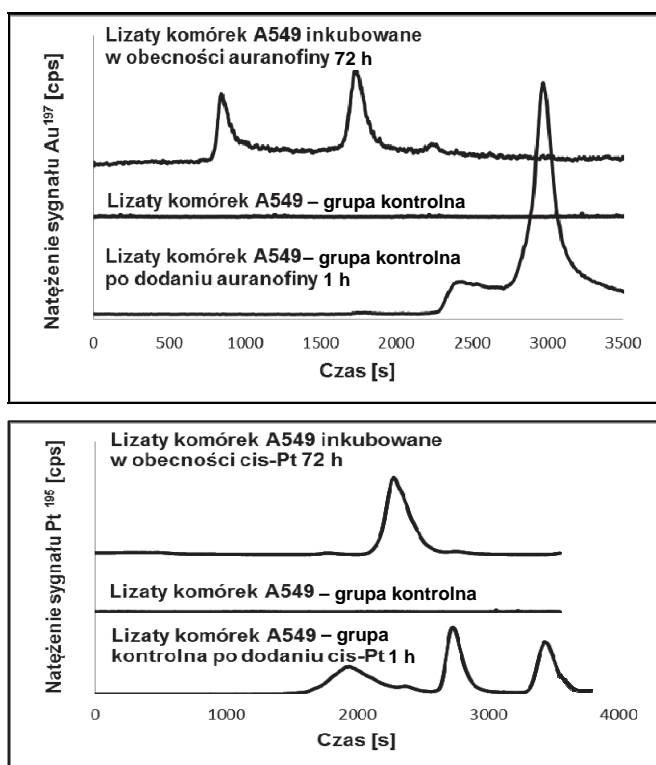
Po oznaczeniu złota i platyny w lizatach stwierdzono, że zarówno w wypadku komórek rakowych, jak i prawidłowych rosła zawartość obu metali w cytozolu komórkowym (rys. 3).



Rys. 3. Ilość metaloleku gromadzonego przez komórki nowotworowe i prawidłowe

Stopień akumulacji auranofiny przez komórki rakowe był jednak większy niż cisplatyny, gdyż podobne zawartości obu metali (23,1 fg Au i 19,7 fg Pt w komórce) zostały osiągnięte dla 20-krotnie mniejszej dawki auranofiny niż cis-Pt. Uzyskane wyniki są zgodne z testami na aktywność enzymatyczną (MTT), które potwierdziły większą cytotoksyczność auranofiny (IC-50 1 μM) w porównaniu z cisplatyną (IC-50 10 μM) wobec komórek raka płuc (nie pokazano). Należy także zaznaczyć, że komórki A549 (nowotworu płuc) były bardziej wrażliwe na działanie metaloleków niż komórki prawidłowe MRC-5. Ciekawym zjawiskiem jest zaburzona homeostaza metali w wypadku komórek rakowych – zawartości mikroelementów (Fe, Zn, Ni, Cu i Mo) są 10-krotnie mniejsze niż w komórkach prawidłowych, w których zawartość zmniejszała się na skutek zwiększania się dawek metaloleków (nie pokazano).

Uzyskane chromatogramy za pomocą SEC różniły się w wypadku obu rodzajów metaloleków. Dla auranofiny zaobserwowano więcej pików o czasach retencji odpowiadających związkom wielkocząsteczkowym: pierwszy



Rys. 4. Chromatogramy lizatów komórek rakowych

pik > 100 kDa, drugi 60 kDa i trzeci 20 kDa (rys. 4). W wypadku cisplatyny chromatogram był uboższy i zawierał tylko jeden pik odpowiadający związkom o masie cząsteczkowej 20 kDa.

Należy zaznaczyć, że w wypadku komórek inkubowanych po dodaniu auranofiny liczba pików chromatograficznych jest większa w porównaniu do grupy kontrolnej, do której auranofina została dodana po przeprowadzeniu lizy. Świadczy to o tym, że na skutek obecności kompleksu złota cytozol komórki ulega wzbogaceniu przez wielkocząsteczkowe białka (najprawdopodobniej zawierające cysteinę). Takiego efektu należałoby się spodziewać przy mitochondrialnym mechanizmie apoptozy komórki.

4. Perspektywy

Opracowana metoda oznaczania zawartości metali w lizatach komórkowych pozwoliła określić stopień akumulacji metaloleków przez komórki rakowe. Ze względu na realizację badań w warunkach *in vitro* oznaczenia powinny być wykonywane względem komórek prawidłowych, co pozwala na wstępne określenie selektywności leku. Pionierskie oznaczenia mikroelementów w lizatach, oparte są na hipotezie, że metale powinny wymieniać inne podobne pod względem chemicznym mikroelementy, okazały się udanym przedsięwzięciem, zwłaszcza w wypadku żelaza, cynku i miedzi. Do zaobserwowania różnic w działaniu obu metaloleków konieczne jest zastosowanie technik sprzężonych. Chromatogramy uzyskane za pomocą SEC-ICP MS pozwoliły stwierdzić, że: cis-Pt w lizacie komórkowym tworzy przede wszystkim addukty ze związkami wielkocząsteczkowymi o zbliżonej masie cząsteczkowej (ok. 20 kDa), natomiast auranofina potrafi tworzyć addukty ze związkami wielkocząsteczkowymi o różnych masach cząsteczkowych, które pojawiają się w cytozolu na skutek obecności auranofiny. Wpływ metaloleków na mikroelementy w środowisku cytozolu nie jest jednoznaczny i wymaga dalszych badań.

Otrzymane wyniki za pomocą opracowanych metod wskazują, że identyfikacja bioligandów wymaga przeprowadzenia postępowania analitycznego z zakresu proteomiki. Wskazują na to wyznaczone masy cząsteczkowe za pomocą SEC i wpływ na mikroelementy, które często są kofaktorem enzymów.

Literatura

- [1] Łacko A., Hudziec P., Mazur G. (2000) Porównanie parametrów farmakologicznych i klinicznych cisplatyny i karboplantyny w leczeniu guzów litych, *Nowotwory* 50, 609–614.

- [2] Cepeda V., Fuertes M.A., Castilla J., Alonso C., Quevedo C., Pérez J.M. (2007) Biochemical mechanisms of cisplatin cytotoxicity, *Anticancer Agents Med Chem.* 7, 3–18.
- [3] Giaccone G. (2000) Clinical perspectives on platinum resistance, *Drugs.* 59, 9–17.
- [4] Fuertes M.A., Alonso C., Perez J.M. (2003) Biochemical modulation of Cisplatin mechanisms of action: enhancement of antitumor activity and circumvention of drug resistance, *Chem. Rev.* 103, 645–662.
- [5] Marzano C., Gandin V., Folda A., Scutari G., Bindoli A. (2007) Inhibition of thioredoxin reductase by auranofin induces apoptosis in cisplatin-resistant human ovarian cancer cells, *Free Radic. Biol. Med.* 42, 872–881.
- [6] Shaw F.C. (1999) Gold-based therapeutic agents. *Chem. Rev.* 99, 2589–2600.
- [7] Dvorakova K., Payne C.M., Tome M.E., Briehl M.M., Vasquez M.A. (2002) Molecular and cellular characterization of imexon-resistant RPMI8226/I myeloma cells, *Mol Cancer Ther.* 1, 185–195.
- [8] Best S.L., Sadler P. (1996) Gold Drugs: Mechanism of Action and Toxicity, *Gold Bulletin* 29, 3.
- [9] Van Heuveln F., Meijering H., Wieling J. (2012) Inductively coupled plasma-MS in drug development: bioanalytical aspects and applications, *Bioanalysis* 4(15), 1933–1965.
- [10] Stepnowski P., Synak E., Szafranek B., Kaczyński Z. (2010) *Techniki separacyjne*, Wyd. UG, Gdańsk, 9–11.
- [11] Timerbaev A.R., Pawlak K., Aleksenko S.S., Foteeva L.S., Matczuk M., Jarosz M. (2012) Advances of CE-ICP-MS in speciation analysis related to metalloproteomics of anticancer drugs, *Talanta* 102, 164–170.

ZAWARTOŚĆ I PRZEMIANY SIARKI W GLEBIE

KAMILA KARMOWSKA, BARBARA PATORCZYK-PYTLIK

Katedra Żywności i Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
ul. Grunwaldzka 53, 50-357 Wrocław
e-mail: kamila.karmowska@up.wroc.pl

Hasła do zapamiętania: siarka, przemiany, gleba, mikroorganizmy

1. Wprowadzenie

Siarka jest pierwiastkiem rozpowszechnionym we wszystkich elementach środowiska: litosferze, hydrosferze i atmosferze [1]. Jest ona uznawana za makroskładnik niezbędny dla wszystkich organizmów żywych. Do niedawna problematyka związana z siarką rozpatrywana była jedynie w aspektach jej nadmiaru [2–4]. Wynikało to ze znacznej emisji tego pierwiastka z wielu zakładów przemysłowych wykorzystujących surowce kopalne, a głównie węgiel. Emisja własna oraz transgraniczna powodowała, że na znacznym obszarze Polski dopływ siarki z tego źródła znacząco przekraczał wymagania pokarmowe, nawet gatunków roślin o dużym zapotrzebowaniu na ten pierwiastek [3, 5]. Depozycja siarki w postaci kwaśnych deszczy oraz opadu suchego w latach 80. XX w., wynosząca $60\text{--}80 \text{ kg S} \cdot \text{ha}^{-1} \cdot \text{rok}^{-1}$ [6], powodowała wiele niekorzystnych zmian w środowisku, w tym m.in.: wzrost zakwaszenia gleb, a w konsekwencji ograniczenie dostępności wielu składników pokarmowych, zwiększenie rozpuszczalności związków glinu, manganu i innych metali ciężkich, zwiększenie wymywania składników zasadowych, zmiany w składzie ilościowym i jakościowym mikroorganizmów glebowych, co prowadziło do zakłócenia naturalnego obiegu pierwiastków [7–11]. Modernizacja i restrukturyzacja przemysłu, a także podjęte na początku lat 80. XX w. działania proekologiczne przyczyniły się do redukcji emisji związków siarki do atmosfery. W porównaniu do roku 1980, kiedy to we-

dług danych GUS wyemitowanych zostało 4132 tys. Mg SO₂, emisja w 2012 r. była mniejsza o blisko 80% i wynosiła 853,3 tys. Mg [6]. Ograniczenie dopływu siarki na tej drodze, straty w wyniku wymywania do wód gruntowych, spadek zużycia nawozów naturalnych, mineralnych oraz pestycydów zawierających w swoim składzie ten pierwiastek, a także wzrost areалу uprawy roślin o dużym zapotrzebowaniu na ten składnik, głównie rzepaku (2000 r. – 437 tys. ha, 2013 r. – 920 tys. ha), stały się przyczyną zmniejszenia zasobów siarki w glebach [2, 4, 6, 12–17]. Zależność taką potwierdzają badania przeprowadzone przez Siebielca i in. [18] w ramach „Monitoringu chemizmu gleb ornich Polski”. Wykazały one, że w 2010 r. 94% z 216 analizowanych profili glebowych charakteryzowało się niską zawartością tego makroskładnika. Szulc [19] na podstawie obliczonych bilansów siarki na powierzchni pola stwierdził, że dla warunków Polski w latach 2000–2003 były one ujemne. Przykładowo dla rzepaku ozimego średnio wyniósł on $-49,4 \text{ kg S} \cdot \text{ha}^{-1}$, a dla zbóż od -7 do $-13 \text{ kg S} \cdot \text{ha}^{-1}$.

W warunkach wzrostu areálu upraw roślin o dużym zapotrzebowaniu na siarkę oraz intensyfikacji produkcji konieczne staje się poszukiwanie rozwiązań mających na celu optymalizację nawożenia tym makroskładnikiem, zwiększenie efektywności jego wykorzystania z nawozów i tym samym właściwe zabezpieczenie roślin przed negatywnymi skutkami jego niedoboru [2, 3, 13, 15, 19, 20].

2. Znaczenie siarki dla roślin

Rośliny mają zdolność pobierania siarki zarówno z gleby, jak i atmosfery. Podstawowym źródłem tego makroskładnika dla roślin jest SO₄²⁻ obecny w roztworze glebowym [20, 21]. Jedynie w warunkach znacznej emisji związków siarki, przy jednocześnie niskiej zasobności gleb w ten pierwiastek, lub w warunkach dokarmiania dolistnego rośliny mogą adsorbować ditlenek siarki przez liście [21].

Siarka bierze udział w wielu procesach metabolicznych i fizjologicznych – jest niezbędna w procesie fotosyntezy, uczestniczy w syntezie chlorofilu i ligniny oraz bierze udział w procesach oksyducyjnych zachodzących w komórkach [2, 4, 14, 21–23]. Wpływa nie tylko na wielkość plonu, ale również na jego jakość [24, 25]. Od dawna znany jest problem hamowania syntezy białka na skutek deficytu siarki, którego konsekwencją jest redukcja plonu [2, 8, 10, 19, 22, 24, 26, 27]. Wśród najważniejszych związków, w skład których wchodzi ten pierwiastek, można wymienić niezbędne do syntezy białek aminokwasy,

tj. metionina, cysteina i cystyna. Oprócz tego stanowi on składnik budulcowy sulfolipidów, witamin, glukozydów, układów redukujących: glutationu, ferrodoksyny czy olejków gorczycznych i czosnkowych [1, 2, 4, 22, 23].

Odpowiednie zaopatrzenie roślin w siarkę pełni dodatkowo ważną rolę w procesach ich adaptacji do niekorzystnych warunków środowiska [14, 23], zwiększa odporność na choroby bakteryjne i grzybowe oraz szkodniki [17, 21, 22, 28].

W literaturze coraz częściej podkreślany jest wpływ siarki na metabolizm innych składników pokarmowych [2, 29]. W warunkach deficytu siarki w glebie rośliny słabiej wykorzystują azot, z kolei deficyt azotu może zmniejszyć efektywność wykorzystania siarki [2, 14, 24, 29]. Intensywne nawożenie azotem w warunkach niedoboru siarki prowadzi do zawężenia stosunku N:S, co jest wynikiem zwiększenia zawartości w tkankach azotu niebiałkowego [24]. Siarka ma także wpływ na przebieg procesu wiązania azotu przez bakterie brodawkowe. W warunkach niedostatecznego zaopatrzenia roślin w ten pierwiastek spada aktywność nitrogenazy oraz hamowany jest rozwój brodawek korzeniowych [2, 23, 26].

Wielokierunkowy wpływ siarki na rośliny uprawne dowodzi, że w warunkach postępującego deficytu tego makroskładnika konieczne staje się rozpoznanie czynników decydujących o formie występowania tego składnika w glebie, a tym samym o jego dostępności [3].

3. Siarka w glebie

Zawartość siarki ogólnej w glebach zależy od ich pochodzenia oraz wielu właściwości fizycznych i chemicznych, ale najczęściej w glebach mineralnych mieści się ona w zakresie 0,02–0,20%, natomiast w glebach organicznych może dochodzić do 3,5% [3, 19, 30, 31]. W glebach mineralnych użytkowanych rolniczo stwierdzono zawartość od 0,007 do 0,108% [32], a średnią na poziomie 0,022%, przy wahaniami od 0,008 do 0,079% [18]. Dane te wskazują, że większość polskich gleb uprawnych (ponad 60%) charakteryzuje się niską naturalną zawartością tego makroskładnika. Deficyt siarki stwierdzany jest przede wszystkim na glebach bardzo lekkich i lekkich, wykazujących niską zawartość materii organicznej [1, 31]. Znacznie więcej tego składnika zawierają gleby wytworzone z glin średnich i ciężkich, a także mady i rędziny [33]. Siarka w glebach występuje w połączeniach organicznych i mineralnych, a wzajemny udział poszczególnych form tego pierwiastka jest uzależniony od wielu czynników,

wśród których najczęściej w literaturze wymieniane są: zawartość części spławianych, węgla organicznego, azotu ogólnego, odczyn, forma i dawka stosowanego nawożenia [1, 3, 19, 27, 31, 34–41].

Dominującą formą występowania siarki w glebach są jej połączenia organiczne. Zawarta jest ona w resztkach roślinnych, zwierzęcych, mikroorganizmach, występuje także w formie związków organicznych, tj. aminokwasy, białka, polipeptydy. W zależności od typu i właściwości gleby forma ta może stanowić od 50 do nawet 97% całkowitej zawartości tego makroskładnika [1, 30, 34, 36, 40]. Wykazano, że w grupie połączeń organicznych występujących w glebach można wyróżnić: połączenia estrowe ($-C-O-S-$), sulfaminiany ($-C-O-S-$), cysteinę ($-C-S-S-$), ulegające redukcji do H_2S pod wpływem HJ [42]. W tej postaci może być związane od 30 do 70% siarki organicznej. Druga grupa to połączenia z węglem ($-C-S-$), tj. aminokwasy siarkowe, dwusiarczki, merkaptany, sulfony, kwasy sulfonowe – ulegające redukcji do nieorganicznych siarczków oraz połączenia nieulegające temu procesowi.

Siarka w połączeniach mineralnych występuje w glebach głównie w postaci siarczanów(VI), a jedynie w glebach podmokłych, w warunkach beztlenowych w postaci siarczków lub jako siarka elementarna [3, 36]. Formy zredukowane S to w większości połączenia nierozpuszczalne, a tym samym nie stanowią one dostępnego źródła tego pierwiastka dla roślin. Siarka siarczanowa(VI) występuje w roztworze glebowym w postaci soli rozpuszczonych oraz połączeń nierozpuszczalnych, tj. związki z wapniem, magnezem, barem, strontem [36]. Forma rozpuszczalna może ulegać w glebach procesom adsorpcji przez koloidy glebowe [34]. Intensywność zachodzenia tego procesu uwarunkowana jest zawartością tlenków glinu i żelaza oraz odczynem. W glebach wykazujących odczyn $>6,5$ adsorpcja SO_4^{2-} jest niewielka, wzrasta natomiast wraz ze wzrostem zakwaszenia gleby, a największa intensywność zachodzenia tego procesu ma miejsce w warunkach pH 3,0 [3, 34, 36, 40].

Zawartość siarki siarczanowej(VI), formy najistotniejszej z punktu żywienia roślin, w większości gleb uprawnych waha się od 5 do 8% i z reguły nie przekracza 10% zasobów siarki całkowitej [1, 3, 18, 19, 31, 33, 34, 40]. W zależności od kierunku i intensywności zachodzących w glebie procesów zawartość siarczanów(VI) może podlegać dużej zmienności w czasie [1, 3, 21, 34, 36, 40]. Wśród czynników decydujących o zawartości tej formy siarki istotną rolę odrywają te, które decydują o rodzaju i aktywności mikroorganizmów występujących w glebie, a tym samym pośrednio wpływają na kierunek i intensywność zachodzącym w glebie procesów przemian tego składnika [35, 37, 43], ale także te, które decydują o intensywności jego wymywania [1, 2]. Na podstawie literatury Mc Grath [3]

podaje, że w zależności od typu gleby i jej właściwości, klimatu, intensywności uprawy, stosowanego nawożenia straty tego składnika wahają się od ilości śladowych do nawet $310 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1} \cdot \text{rok}^{-1}$. Na podstawie przeprowadzonych badań lizymetrycznych, z wykorzystaniem S znakowanej, wykazano, że w ciągu roku z gleby płowej wymyciu uległo 3–18% ilości wprowadzonej siarki [16], natomiast rocznie z gleb uprawnych wymywane jest $30\text{--}80 \text{ kg S} \cdot \text{ha}^{-1}$ [17].

4. Przemiany siarki w glebie

Przemiany związków siarki w glebach charakteryzują się dużą złożonością oraz dynamiką w czasie i obejmują procesy mineralizacji, immobilizacji, utleniania oraz redukcji [3, 30, 36]. Za krążenie tego pierwiastka w glebie odpowiedzialne są procesy biochemiczne, jednak główną rolę odgrywają w nim procesy biologiczne, prowadzone przy udziale mikroorganizmów, promieniowców oraz grzybów [1, 3, 30, 44]. Dlatego też wzajemny układ procesów przemian uzależniony jest od rodzaju i liczebności występujących w glebie mikroorganizmów, o których decydują z kolei panujące w glebie stosunki wodno-powietrzne, temperatura i odczyn gleby oraz zasobność w składniki pokarmowe i energetyczne [3, 30, 34, 35, 37, 43, 44].

4.1. Mineralizacja

Mineralizacja połączeń siarki, czyli zespół procesów prowadzących do rozkładu organicznych związków tego pierwiastka, pełni ważną rolę w udostępnianiu roślinom składników pokarmowych [1, 30, 34, 44]. Jest to proces zachodzący głównie na drodze przemian mikrobiologicznych, prowadzony zarówno przez bakterie tlenowe, jak i beztlenowe (*Pseudomonas*, *Clostridium*) oraz przez grzyby (*Aspergillus*) [30]. Jeżeli jednak zawartość siarki w rozkładanym materiale nie przekracza 0,13%, to cała jej uwolniona ilość jest asymilowana przez mikroorganizmy, co ogranicza jej dostępność dla roślin [45].

W literaturze najczęściej podawany jest przebieg mineralizacji zaproponowany przez McGilla i Cole'a (1981). Autorzy ci wyróżniają dwie podstawowe drogi przemian: biologiczną i biochemiczną. Biochemiczna polega na uwolnieniu siarczanów z połączeń typu --C--O--S na drodze hydrolizy, zachodzącej pod wpływem enzymu sulfatazy wydzielanej przez bakterie w warunkach niedoboru siarki. Arylosulfataza hydrolizuje estry

siarczanowe ($R-O-SO_3^{2-}$) do fenoli ($R-OH$) i nieorganicznych siarczanów (SO_4^{2-}) [35, 37, 46, 47]. Aktywność tego enzymu w glebie może być modyfikowana na drodze stosowanego nawożenia. Zawartość arylosulfatazy w glebach nawożonych obornikiem zwiększała się, a w wyniku wprowadzenia nawozów mineralnych ulegała ograniczeniu [35, 37, 46, 48]. Negatywny wpływ na aktywność enzymatyczną gleb jonów: NO_3^- , NO_2^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-} , Cl^- stwierdzili Gerimda i in. [47]. Druga droga – biologiczna, dotyczy głównie siarki bezpośrednio związanej z węglem i wynika z działalności mikroorganizmów, które swoje zapotrzebowanie na energię w postaci węgla pozyskują z rozkładu materii organicznej. Obydwa procesy, mimo istotnych różnic, są z sobą ściśle powiązane, gdyż wiele związków organicznych zanim ulegnie transportowi przez membrany komórkowe, musi zostać rozłożone do mniejszych cząsteczek [1, 3].

Pozytywnie na intensywność zachodzenia procesu mineralizacji wpływa wzrost pH gleby. Wapnowanie przyspiesza proces mineralizacji organicznych połączeń siarki, ale nie prowadzi to do zwiększenia zawartości siarczanów(VI) w roztworze glebowym, bowiem powstający $CaSO_4$ jest solą nierozpuszczalną [30]. Sposób uprawy gleby oraz stosowane nawożenie z kolei przyczyniają się do modyfikacji zawartości substancji organicznej w glebie, a tym samym zawartości w niej węgla. Z reguły tempo mineralizacji jest wyższe w glebach uprawnych niż odłogowanych [40, 45].

Przebieg procesu mineralizacji, zarówno na drodze biochemicznej, jak i biologicznej, jest uzależniony w dużej mierze od temperatury, która decyduje o tempie jej przebiegu oraz od dostępu tlenu, który wpływa na rodzaj otrzymywanych produktów. W obecności tlenu jest to siarczan, natomiast przy jego braku siarczki, siarczany i merkaptany [3]. Mineralizacja zachodzi najsprawniej w temperaturze 20–35°C [3, 43].

4.2. Immobilizacja

Immobilizacja, będąca procesem przeciwnym do mineralizacji, pełni ważną rolę w zatrzymywaniu siarczanów w glebie. Proces ten prowadzi do znacznego ograniczenia ich wymywania, jednak jednocześnie ogranicza możliwość pobrania tego składnika przez rośliny [1, 30]. Przebieg procesu immobilizacji zależy od rodzaju prowadzących go mikroorganizmów. Jednak we wszystkich przypadkach można wyróżnić dwa podstawowe etapy [1, 3, 30, 34, 44]: w pierwszym siarka występująca w połączeniach nieorganicznych (a w niektórych przypadkach także siarka związana w aminokwasach i innych prostych związkach organicznych) jest asymilowana przez mikroorganizmy i rośliny, a w kolejnym, po

częściowym rozkładzie obumarłego materiału mikrobiologicznego, następuje ich przekształcenie w złożone związki organiczne.

Najważniejszym czynnikiem decydującymi o stanie dynamicznej równowagi między procesami mineralizacji i immobilizacji są: rodzaj i liczebność mikroorganizmów występujących w glebie, wzajemny stosunek C:N:S, wilgotność, odczyn, okrywa roślinna oraz stosowane zabiegi uprawowe [1, 19, 44]. Jak wskazuje Barrow (1960) [1, 40], gdy: C:S > 400:1 – występuje przewaga procesu immobilizacji w wyniku intensywnego namnożenia mikroorganizmów heterotroficznych; przy stosunku C:S = 200–400:1 – procesy immobilizacji i mineralizacji zachodzą w ścisłej równowadze; jeśli C:S < 200:1 – dominują procesy mineralizacji i uwolnienie S–SO₄²⁻ do roztworu glebowego.

Przewaga procesów immobilizacji ma miejsce również w warunkach zbyt wysokiej zawartości azotu w stosunku do siarki. Dodatek azotu wpływa dodatnio na wzrost mikroorganizmów, które zużywają większość występującej w glebie siarki na własne potrzeby [41, 44]. Oprócz zabiegów uprawowych [40, 45] znaczenie ma także gatunek uprawianej rośliny, a dokładniej ilość i skład wydzielin korzeniowych decydujący o składzie i liczebności mikroorganizmów występujących w ryzosferze [23, 44].

4.3. Utlenianie

Utlenianie jest drugim obok mineralizacji procesem prowadzącym do udostępniania roślinom siarki [1, 30, 36, 44]. Zredukowane związki tego pierwiastka w warunkach dostępu tlenu są łatwo utleniane przez organizmy wykorzystujące powstającą w tym procesie energię na własne potrzeby. Uwolniony w procesie mineralizacji H₂S, a także S⁰ (obecna w glebie lub wprowadzona w postaci nawozu mineralnego) przy współudziale bakterii z rodzaju *Thiobacillus* oraz grzybów i promieniowców ulega utlenieniu do SO₄²⁻ [3, 30, 36, 44, 47, 49]. Na tempo procesu utleniania połączeń siarki istotny wpływ ma temperatura, odczyn i wilgotność. Zbyt niska temperatura istotnie obniża intensywność zachodzenia procesu utleniania siarki elementarnej (S⁰). Fox i in. (1964) stwierdzili, że w temperaturze 23° proces utleniania zachodzi 15 razy szybciej niż w temperaturze 4°. Ci sami autorzy wykazali, że postępujący proces utleniania siarki skutkuje obniżeniem odczynu gleb, co z kolei ma negatywny wpływ na rozwój mikroorganizmów biorących udział w tym procesie. Limitująco na ich aktywność może wpływać również zbyt niska wilgotność. Zbyt wysoka sprzyja natomiast intensyfikacji zachodzenia procesów redukcji siarczanów [30].

4.4. Redukcja

Bakterie redukujące siarczany są charakterystyczne dla siedlisk beztlenowych i bogatych w substancję organiczną, np. gleby bagienne. Odgrywają istotną rolę w obiegu materii organicznej w przyrodzie. W takich warunkach siarczany zredukowane są do siarczków, siarkowodoru lub siarki rodzimej. Podobnie jak w przypadku bakterii utleniających ten pierwiastek, bakterie redukujące wykorzystują powstającą w tym procesie energię na własne potrzeby życiowe [30].

5. Perspektywy

Zachodzące przemiany związków siarki decydują o udziale poszczególnych form tego składnika w glebach uprawnych, a stosowane przez człowieka zabiegi uprawowe mają istotny wpływ na ich kierunek. Czynnikiem decydującym bezpośrednio o wzajemnym układzie tych procesów jest jednak liczebność i rodzaj mikroorganizmów występujących w glebie. Istotna rola mikroorganizmów glebowych w przemianach siarki wskazuje, że proponowane coraz częściej mikrobiologiczne preparaty, służące w praktyce rolniczej do poprawy żyzności, mogą istotnie modyfikować dostępność siarki dla roślin.

Literatura

- [1] Jakubus M. (2006) *Siarka w środowisku*, Wyd. AR, Poznań, 5–30.
- [2] Barczak B. (2010) Siarka jako składnik pokarmowy kształtujący wielkość i jakość plonów wybranych roślin uprawnych, *Rozprawy* 144, Wyd. Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy, Bydgoszcz, 1–131.
- [3] Mcgrath S.P., Zhao F., Blake-Kalff M.M.A. (2003) Sulphur in soils: processes, behavior and measurement, *Nawozy i Nawożenie* 2(15), 28–54.
- [4] Wielebski F., Wójtowicz M. (2000) Problemy nawożenia rzepaku siarką w Polsce i na świecie, *Rośliny Oleiste – Oilseed Crops* XXI, 449–463.
- [5] Kaczor A., Zuzańska J. (2009) Znaczenie siarki w rolnictwie, *Chm. Dyd. Ekol. Met.* 14, 69–78.
- [6] GUS (2010, 2014) *Ochrona środowiska, Informacje i opracowania statystyczne*, Warszawa.
- [7] Kaczor A., Brodowska M.S. (2008) Oddziaływanie emisji ditlenku siarki i tlenków azotu na zakwaszenie gleb w Polsce, *Proc. ECOpole* 2, 191–195.
- [8] Kulczycki G. (2007) Wpływ siarki siarczanowej i elementarnej na plon i skład chemiczny roślin oraz właściwości chemiczne gleb, *Fragm. Agron.* 1(93), 140–149.
- [9] Filipek T. (2005) Dynamika antropogenicznych przyczyn zakwaszenia gleb w Polsce w ostatnich 30 latach, *Nawozy i Nawożenie* 2(23), 67–77.

- [10] Haneklaus S., Bloem E., Schnug E. (2000) Sulphur in agroecosystems, *Folia Univ. Agricult. Stetin.* 204(81), 17–32.
- [11] Kaczor A., Kozłowska J. (2000) Wpływ kwaśnych opadów na agroekosystemy, *Zesz. Nauk. AR w Szczecinie* 81, 55–68.
- [12] Czekala W. (2015) Stan aktualny i tendencje rozwoju w gospodarce nawozami naturalnymi w Polsce, *Arch. Gosp. Odpad. Ochr. Śr.* 17, 39–46.
- [13] Podleśna A. (2013) Potrzeby nawożenia siarką, *Studia i Raporty IUNG-BIP* 34(8), 107–120.
- [14] Jamal A., Moon Y.S., Abdin M.Z. (2010) Sulphur – a general overview and interactions with nitrogen, *Aust. J. Crop Sci.* 4(7), 523–529.
- [15] Podleśna A. (2010) Perspektywy nawożenia roślin siarką, *Studia i Raporty IUNG-BIP* 25, 31–42.
- [16] Kiepuł J. (2007) Próba oceny wymywania siarki pochodzącej z nawożenia w profile gleby płowej, *Fragm. Agron.* 1(93), 124–130.
- [17] Klikocka E. (2005) Sulphur status in environment, *J. Elementol.* 10(3), 625–643.
- [18] Siebielec G., Smerczak B., Klimkowicz-Pawlas A., Maliszewska-Kordybach B., Terelak H., Koza P., Łysiak M., Gałązka R., Pecio M., Suszek B., Miturski T., Hryńczuk B. (2012) Monitoring chemizmu gleb ornych w Polsce w latach 2010–2012, *Bibl. Monit. Środ.* Warszawa, 54–56.
- [19] Szulc W. (2008) Potrzeby nawożenia roślin uprawnych siarką oraz metody ich wyznaczania, *Rozprawy Naukowe i Monografie* 332, SGGW, Warszawa, 1–98.
- [20] Grzebisz W., Przygocka-Cyna K. (2003) Aktualne problemy gospodarowania siarką w rolnictwie polskim, *Nawozy i Nawożenie* 4(17), 64–77.
- [21] De Kok L.J., Castro A., Durenkamp M., Koralewska A., Posthumus F.S., Stuiver C.E.E., Yang L., Stulen I. (2005) Pathways of plant sulfur uptake and metabolism – an overview, *Landbauforschung Voelkenrode* 283, 5–13.
- [22] Gaj R., Klikocka H. (2011) Wielofunkcyjne działanie siarki w roślinie – od żywienia do ochrony, *Post. Ochr. Roślin* 51(1), 33–44.
- [23] Podleśna A. (2005) Nawożenie jako czynnik kształtujący metabolizm roślin uprawnych i jakość płodów rolnych, *Pam. Puł.* 139, 161–174.
- [24] Wielebski F. (2011) Wpływ nawożenia siarką w warunkach stosowania zróżnicowanych dawek azotu na plonowanie różnych typów odmian rzepaku ozimego, *Rośliny Oleiste – Oilseed Crops XXXII*, 61–78.
- [25] Marska E., Wróbel J. (2000) Znaczenie siarki dla roślin uprawnych, *Folia Univ. Agric. Stetin.* 204(8), 69–76.
- [26] Varin S., Cliquet J.B., Personeni E., Avice J.C., Leumaviel-Lavenant S. (2010) How does sulphur availability modify N acquisition of white clover (*Triticum repens* L.)?, *J. Exp. Bot.* 61(1), 225–234.
- [27] Haneklaus S., Bloem E., Schnug E. (2005) Sulfur interactions in crop ecosystem, [w:] *Sulfur in Plants An Ecological Perspective*, red. M.J. Hawkesford, L.J. De Kok, Wyd. Springer-Verlag, Dordrecht, 17–59.
- [28] Bloem E., Haneklaus S., Schnug E. (2005) Significance of sulfur compounds in the protection of plants against pests and diseases, *J. Plant Nutr.* 28, 763–784.
- [29] Zhao F.J., Hawkesford M.J., McGrath S.P. (1999) Sulphur assimilation and effects on yield and quality of wheat, *J. Cereal Sci.* 30, 1–17.
- [30] Król M. (2010) Bakterie utleniające siarkę elementarną i redukujące siarczany, *Monografie i Rozprawy Naukowe* 27, Wyd. IUNG, Puławy, 9–36, 74, 103–104.

- [31] Kulczycki G., Spiak Z. (2003) Zawartość siarki ogólnej i siarczanowej w glebach Polski południowo- zachodniej, *Nawozy i Nawożenie* 4(17), 75–81.
- [32] Motowicka-Terelak T., Terelak H. (1998) Siarka w glebach Polski – stan i zagrożenie, *Bibl. Monit. Środ.* 1–105.
- [33] Lipiński W., Terelak H., Motowicka-Terelak T. (2003) Propozycja liczb granicznych zawartości siarki siarczanowej w glebach mineralnych na potrzeby doradztwa rolniczego, *Roczn. Glebozn.* 54(3), 79–84.
- [34] Scherer H.W., Welp S., Forster S. (2012) Sulfur fractions in particle-size separates as influence by long-term application of mineral and organic fertilizers, *Plant Soil Environ.* 58(5), 242–248.
- [35] Siwik-Ziomek A., Koper J. (2013) Wpływ nawożenia obornikiem i doboru roślin na zawartość siarczanów(VI) i aktywność arylosulfatazy w glebie płowej, *Proc. ECOpole* 7(1), 241–246.
- [36] Scherer H.W. (2009) Sulfur in soils, *J. Plant. Natur. Soil Sci.* 172, 326–335.
- [37] Siwik-Ziomek A., Koper J. (2010) Changes in the content of sulphate sulphur and arylosulfatase activity in soil under potato caused by fertilization, *J. Elementol.* 15(1), 171–176.
- [38] Kulczycki G., Patorczyk-Pytlik B. (2008) Zawartość siarki w glebach i runi użytków zielonych okolic Wrocławia, [w:] *Ekotoksykologia w ochronie środowiska*, red. B. Kolwzan, K. Grabas, Wyd. PZIT, Wrocław, 203–212.
- [39] Skwierawska M., Zawartka L., Zawadzki B. (2008) The effect of different rates and forms of sulphur applied on change of soil agrochemical properties, *Plant Soil Environ.* 54(4), 171–177.
- [40] Szulc W., Rutkowska B., Łabętowicz J. (2004) Zawartość siarki ogólnej, organicznej i siarczanowej w profilu glebowym w warunkach różnych systemów uprawy gleby, *Annales UMCS sec. E* 59(1), 55–62.
- [41] Kowalenko C.G., Lowe L.E. (1975) Mineralization of sulfur from four soils and its relationship to soil carbon, nitrogen and phosphorus, *Can. J. Soil Sci.* 55(1), 9–14.
- [42] Freney J.R., Williams C.H. (1983) The sulphur cycle in soil, [w:] *The global biogeochemical sulfur cycle*, red. M.V. Ivanov, J.R. Freney, CSOPE 19, John Wiley & Sons, New York, 129–201.
- [43] Natywa M., Selwet M., Maciejewski T. (2014) Wpływ wybranych czynników agrotechnicznych na liczebność i aktywność drobnoustrojów glebowych, *Fragm. Agron.* 31(2), 56–63.
- [44] Kertesz M., Mirleau P. (2004) The role of soil microbes in plant sulphur nutrition, *J. Exp. Bot.* 55, 1939–1945.
- [45] Szulc W., Rutkowska B., Łabętowicz J. (2004) Wpływ trzech systemów nawożenia na zawartość ogólnych form siarki i węgla w profilu glebowym, *Nawozy i Nawożenie* 1(18), 92–97.
- [46] Siwik-Ziomek A., Koper J. (2011) Zawartość siarki siarczanowej (VI) oraz aktywność arylosulfatazy w glebie spod uprawy jęczmienia jarego, *Roczn. Glebozn.* 62(1), 152–157.
- [47] Germida J.J., Wainwright M., Gupta V.V.S.R. (1992) Biochemistry of sulphur cycling in soil, *Soil Biochem.* 7, 1–53.
- [48] Kotkova B., Balik J., Cerny J., Kulkanek M., Bazalova M. (2008) Crop influence on mobile sulphur content and arylosulfatase activity in the plant rhizosphere, *Plant Soil Environ.* 54, 100–107.
- [49] Gajewska J., Olejnik K., Parzydeł M., Rostawicka M., Szulc W., Borkowski A. (2006) Charakterystyka morfologiczna i fizjologiczna glebowych bakterii utleniających związku siarki, *Zesz. Nauk. UP we Wrocławiu. Rol.* 546, 65–70.

ANALIZA JAKOŚCIOWA METABOLITÓW KOMPLEKSÓW ZŁOTA O POTENCJALNYCH WŁAŚCIWOŚCIACH PRZECIWNOWOTWOROWYCH

MONIKA KUPIEC, KATARZYNA PAWLAK

Katedra Chemii Analitycznej, Wydział Chemiczny, Politechnika Warszawska
ul. Noakowskiego 3, 00-664 Warszawa
e-mail: mprzadka@ch.pw.edu.pl

Hasła do zapamiętania: kompleksy złota, leki przeciwnowotworowe, spektrometria mas, elektrosrejm, elektrochemiczna komora reakcyjna

Wykaz skrótów:

- ESI MS – spektrometria mas z jonizacją poprzez elektrorozpraszanie
HIV – ludzki wirus niedoboru odporności
NADPH – dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy
AUF – Auranofina – kompleks 2,3,4,6-tetra-O-acetylo-1-tio-β-D-glukopiranozo-S-(trietylo-fosfina) złota (I)
AuBipyC – [(bipy^{dmb}-H)Au(OH)][PF₆] (gdzie bipy^{dmb}-H = zdeprotonowana 6-(1,1-dimetylobenzylo)-2,2'-bipirydyna)

1. Wstęp

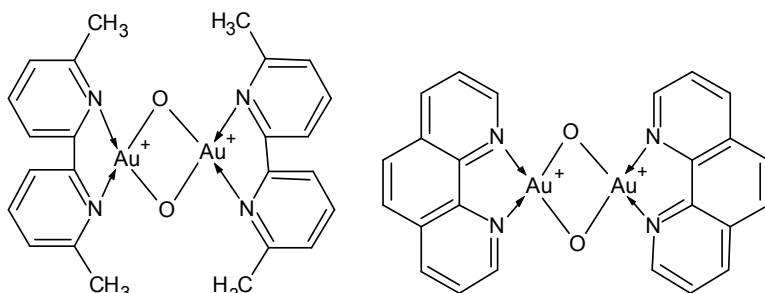
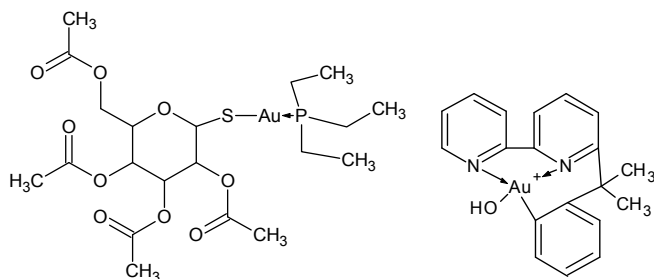
Choroba nowotworowa jest jedną z najmniej poznanych chorób pod względem mechanizmu rozwoju oraz technik zapobiegania i zwalczania. Do tej pory opracowano trzy metody jej leczenia: radioterapia, chirurgia oraz najmłodsza – chemioterapia. Ta ostatnia, z wykorzystaniem leków o działaniu cytostatycznym, często wspomaga inne metody. Związki cytostatyczne mają za zadanie uniemożliwić replikację DNA przędzając podział komórek poprzez odpowiednią modyfikację nici DNA lub

inhibicję enzymów koniecznych do podziału mitotycznego komórki [1]. Ze względu na to, że skuteczność, aktywność i toksyczność badanego związku zależą od wydajności jego transportu [2] i że większość leków cytotoksycznych podawanych jest dożylnie, nacisk kładzie się na badanie oddziaływań kompleksów metalu z białkami transportującymi występującymi w surowicy krwi. Większość związków o właściwościach cytostacyjnych było wykrywanych przypadkowo. Stanowiły one jednak punkt wyjściowy do dalszych poszukiwaniach substancji o określonej bioaktywności. Jednym z przykładów jest kompleks *cis*-[diaminodichloroplatyny(II)] – znany jako cisplatyna oraz jej analogi karboplatyna i oksaliplatyna [1]. Z uwagi na poważne skutki uboczne wywołane stosowaniem leków zawierających platynę poszukiwane są związki o lepszej selektywności i porównywalnej skuteczności. Spośród licznie otrzymywanych związków o potencjalnych właściwościach przeciwnowotworowych tylko niewiele z nich daje pożądane efekty w testach klinicznych. Najlepsze wyniki osiągane są w przypadku kompleksów metali przejściowych zawierających jony: galu(III), tytanu(IV), rodu(II), rutenu(II, III) oraz jednych z najbardziej obiecujących – złota(I) i złota(III) [2].

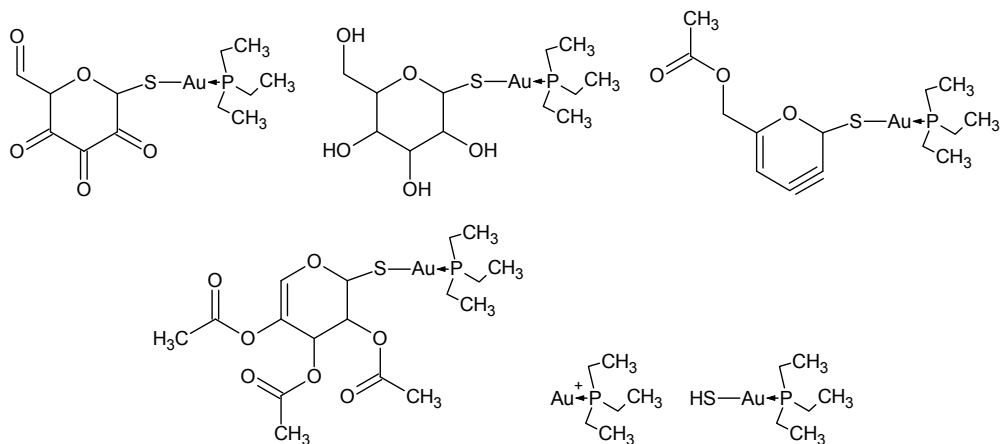
2. Kompleksy złota jako cytostatyki

Kompleksy złota stanowią obiecującą klasę substancji biologicznie czynnych o potencjalnym działaniu przeciwrakowym. Mechanizm ich działania nie jest jeszcze w pełni poznany, ale na podstawie dotychczasowych prac badawczych stwierdzono, że kompleksy złota wykazują inny, tzw. niezależny od DNA mechanizm hamowania rozwoju raka, co czyni je atrakcyjną alternatywą dla obecnych leków na bazie platyny [3]. Badane są kompleksy zarówno na +I, jak i na +III stopniu utlenienia, jedno- lub dwurdzeniowe (rys. 1).

Auranofina (kompleks 2,3,4,6-tetra-O-acetylo-1-tio-β-D-glukopiranozo-S-(trietilo-fosfina) złota(I)) jest jednordzeniowym kompleksem złota(I), który od ponad 20 lat jest stosowany w leczeniu reumatoidalnego zapalenia stawów. Dopiero niedawno zwrócono szczególną uwagę na jego przeciwnowotworowe właściwości w stosunku do białaczki P388 oraz potencjalnie hamujące rozwój w stosunku do HIV. Auranofina jako prolek podawany jest głównie dożylnie, ale może być też podawany doustnie. Auranofina jest kompleksem bardzo reaktywnym. Jej ligandy mogą być wymieniane przez endogenne ligandy zawierające grupy tiolowe, które mogą wpływać na jej reaktywność i zachowanie w organizmie. W roztworze



Rys. 1. Kompleksy złota (od lewej): Auranofina, AuBipyC, AuOxo6, Au₂Phem [3]



Rys. 2. Najbardziej prawdopodobne produkty rozpadu Auranofiny [4]

kompleks ten może ulegać degradacji na skutek wymiany ligandu oraz deacetylacji reszty cukrowej (rys. 2) [4].

Mechanizm działania Auranofiny na komórki nowotworowe opiera się prawdopodobnie na selektywnym hamowaniu właściwości redukujących

enzymu mitochondrialnego – reduktazy tioredoksyny. Reduktaza ta należy do selenoenzymów, które katalizują redukcje zależne od NADPH i odpowiadają za utrzymanie białek w ich zredukowanym stanie. Zahamowanie działania tego enzymu powoduje, iż tioredoksyna nie jest przekształcana w aktywną, zredukowaną formę, co uniemożliwia usuwanie nadtlenu wodoru utworzonego przez mitochondrialny łańcuch oddechowy. Prowadzi to do obrzęku mitochondrialnego, zwiększenia przepuszczalności błony zewnętrznej mitochondriów i uwolnienia cytochromu c. W rezultacie dochodzi do zahamowania syntezy DNA i apoptozy komórki nowotworowej. Najnowsze badania dowodzą, że zwiększone wytwarzanie reduktazy w mitochondriach komórki nowotworowej odpowiada za lekooporność. Auranofina jest zatem niezwykle obiecująca ze względu na zmniejszenie ryzyka występowania lekooporności [5].

Drugim badanym kompleksem złota(III) jest AuBipyC [(bipy^{dmb}-H)Au(OH)][PF₆] (gdzie bipy^{dmb}-H = zdeprotonowana 6-(1,1-dimetylobenzylo)-2,2'-bipirydyna). Kompleks ten, w przeciwieństwie do Auranofiny, jest trwały w fizjologicznych warunkach osocza krwi. Badania wykazały, że przejawia znaczną cytotoksyczność wobec linii ludzkich komórek raka jajnika i płuc. Ponadto, jego mechanizm przeciwnowotworowej aktywności opiera się, tak jak w przypadku Auranofiny, na mitochondrialnym szlaku apoptozy [6].

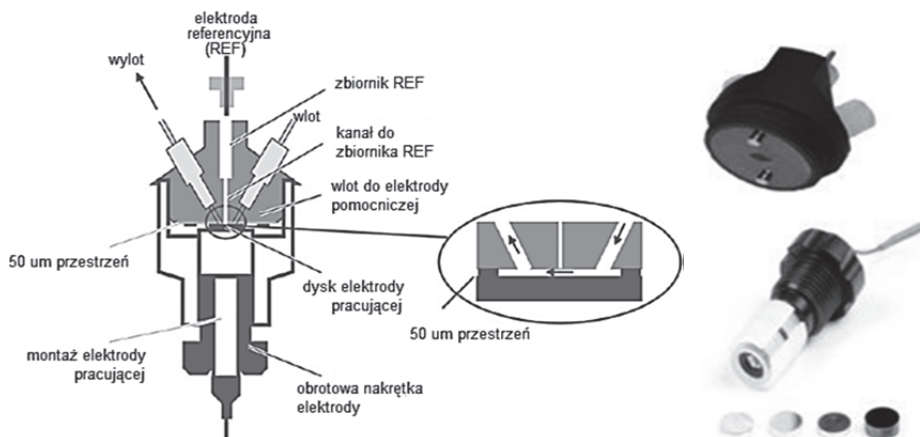
3. Badanie reaktywności kompleksów złota w warunkach fizjologicznych

Wydajność działania leku jest ściśle związana z wydajnością jego transportu, a co za tym idzie – z powinowactwem kompleksu lub jego metabolitów do białek transportujących, obecnych we krwi. Badanie trwałości i reaktywności substancji biologicznie czynnych w warunkach fizjologicznych jest niezwykle ważne. Zazwyczaj, w warunkach fizjologicznych, badane są przemiany prowadzące do aktywacji proleku, a następnie kinetyka tworzenia adduktów z białkami osocza. Identyfikacja nowych związków jest najczęściej realizowana z udziałem spektrometrów mas z jonizacją poprzez elektrozpraszanie (ESI MS). Bogaty skład płynów ustrojowych (moczu lub krwi) przysparza wiele trudności podczas procesu rozpraszania, jonizacji, rozdzielania jonów w fazie gazowej i interpretacji widm. W przypadku większości metalokompleksów, podczas interpretacji widm, z pomocą przychodzi obwiednia izotopowa, czyli specyficzny dla danego metalu układ sygnałów pochodzących od jego izotopów. Niestety złoto jest monoizotopowe, co utrudnia selekcję sygnałów do interpretacji. Etapy oczyszczania związków natomiast często prowadzą do rozpadu wielu

form i utraty informacji. Początkowe prace należy zatem prowadzić w prostych roztworach odtwarzających warunki fizjologiczne (pH, temperatura, obecność związków o właściwościach utleniających lub redukujących).

3.1. Elektrochemiczna komora reakcyjna ROXY

Komora elektrochemiczna ROXY firmy Antec służy do symulowania warunków utleniająco-redukujących panujących w organizmach żywych i powstawania potencjalnych metabolitów. Układ składa się z trzech elektrod: roboczej, na której zachodzi reakcja, odniesienia i pomocniczej. Potencjał roboczy ustala się pomiędzy elektrodą roboczą i pomocniczą. Trzecia elektroda ma kompensować efekt polaryzacji prowadzącej do destabilizacji pracy komory reakcyjnej lub komory jonizacyjnej ESI (rys. 3). Możliwe jest zatem bezpośrednie połączenie komory reakcyjnej z ESI MS, umożliwiające natychmiastową rejestrację produktów reakcji redoks.



Rys. 3. A. Przekrój komory reakcyjnej. B. Rzeczywisty wygląd komory reakcyjnej z widoczną celą pomiarową (7 μL roztworu) oraz elektrodami roboczymi – krążki wykonane z węgla, złota platyny i „magicznego diamentu” (diament na nośniku krzemowym)

4. Metody analityczne

Przygotowanie próbek metalokompleksów: Roztwór zawierający odpowiedni kompleks złota o stężeniu 10 μM przygotowywano w roztworze mrówczanu amonu o stężeniu 10 mM i pH 7,4 symulującym fizjologiczne warunki osocza krwi. Następnie do próbki dodawano aceto-

nitryl – lotny związek wspomagający proces jonizacji – tak, aby jego zawartość wynosiła 30% (v/v).

Metodyka badań: Próbkki wprowadzane były do komory reakcyjnej (a następnie do ESI MS) za pomocą pompy strzykawkowej z prędkością $10 \mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$. Parametry pracy aparatów zamieszczone w tabeli.

Tabela. Parametry pracy komory reakcyjnej ROXY i ESI MS

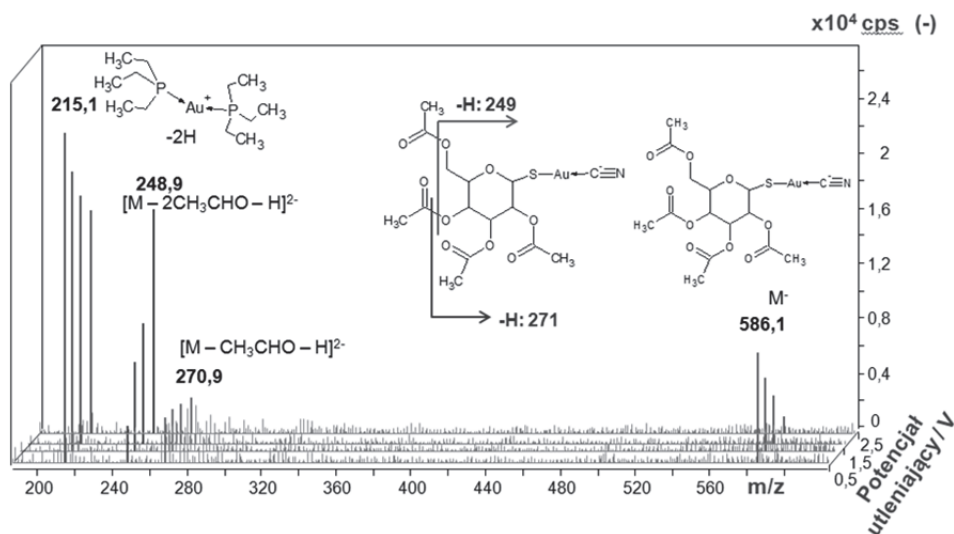
ESI QqQ MS	
Aparat	Agilent Technologies 6460 Triple Quad LC/MS Jet Stream
Temperatura gazu rozpylającego	300°C
Przepływ gazu rozpylającego	8 L · min ⁻¹
Ciśnienie gazu nebulizującego	50 psi
Temperatura gazu osłonowego	250°C
Przepływ gazu osłonowego	7 L · min ⁻¹
Napięcie na kapilarze	2500 V (tryb jonów dodatnich), 1500 V (tryb jonów ujemnych)
Napięcie końcowe	500 V
Tryb jonizacji	dodatni lub ujemny
Tryb zbierania jonów	przemiatanie
Napięcie na fragmentatorze	90 V
Komora reakcyjna ROXY	
Przepływ cieczy	10 mL · h ⁻¹
Potencjał utleniający	od 0 do 3,5 V
Potencjał redukujący	od 0 do -2,5 V
Zmiana potencjału	skokowo co 0,1 V
Elektroda robocza	„magiczny diament”

5. Wyniki badań i dyskusja

Widma mas dla próbek kompleksów złota wykonywane były w trybie jonów dodatnich i ujemnych, przy wszystkich możliwych potencjałach przykładanych w komorze reakcyjnej ROXY. Otrzymane widma oczyszczano poprzez odejmowanie tła i widm ślepych prób, a otrzymane wyniki zestawiono na wykresie wraz z propozycją interpretacji sygnałów.

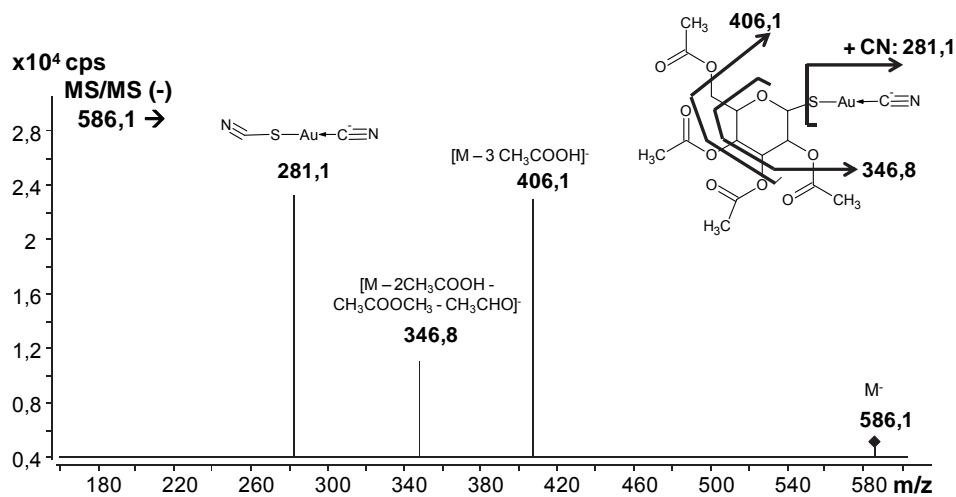
5.1. Produkty przemiany Auranofiny

W przypadku widm mas otrzymanych dla Auranofiny uzyskano cztery główne sygnały. Obserwując zmiany wysokości sygnałów, zauważa się zależność poszczególnych sygnałów od przyłożonego napięcia, co przedstawiono na rysunku 4. Sygnałowi o m/z 586 przyporządkowano kompleks złota AUF, w którym grupa trietylofosfinowa została wymieniona przez grupę nitrylową. Jest ona jednak na tyle reaktywna, że łatwo przyłącza się ponownie do złota, co można zaobserwować w postaci sygnału o m/z 215, pochodzącego od kompleksu złota z dwiema grupami trietylofosfinowymi. Mniejsze sygnały pochodzą od rozpadu podstawników grupy cukrowej Auranofiny (m/z 249 i 271), których wysokość rośnie wraz z potencjałem utleniającym. Intensywność zaś sygnału pochodzącego od kompleksu złota z dwiema grupami trietylofosfinowymi (m/z 215) maleje.

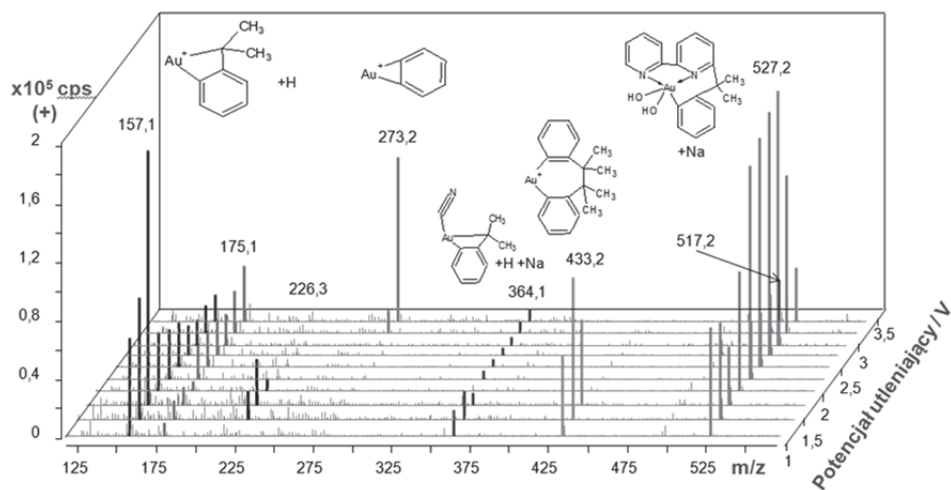


Rys. 4. Widma mas ESI MS w trybie jonów ujemnych dla roztworu Auranofiny w roztworze 10 mM mrówczanu amonu, pH 7,4 uzyskane dla potencjałów utleniających

Dla poszczególnych sygnałów przeprowadzono fragmentacje w celu potwierdzenia zaproponowanej struktury. Na rysunku 5 przedstawiono przykładowe widmo fragmentacyjne dla jonu o m/z 586, które ukazuje kolejne rozpady metabolitu Auranofiny poprzez rozpad reszty cukrowej oraz oderwanie całego pierścienia cukrowego, potwierdzając tożsamość związku.



Rys. 5. Widmo fragmentacyjne ESI MS/MS w trybie jonów ujemnych jonu macierzystego o m/z 586, potencjał w komorze reakcyjnej równy 0,5V



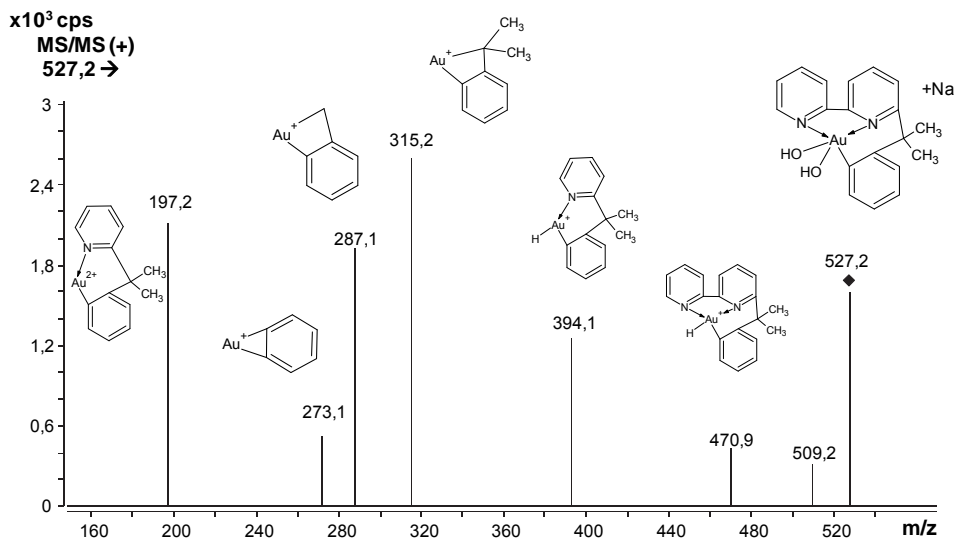
Rys. 6. Widma mas ESI MS w trybie jonów dodatnich dla roztworu AuBipyC w roztworze 10 mM mrówczanu amonu, pH 7,4 uzyskane dla potencjałów utleniających

5.2. Produkty przemiany AuBipyC

AuBipyC jest kompleksem złota na +III stopniu utlenienia. Ma on koordynacyjnie przyłączone dwie cząsteczki pirydyny oraz kowalencyjnie związany benzen, który z pirydyną łączy łańcuch alifatyczny. Dodatkowo

ma także grupę hydroksylową przy atomie złota i w efekcie kompleks ma ładunek pojedynczy dodatni, co powoduje, że sygnały są obserwowane tylko w trybie jonów dodatnich. AuBipyC jest dość trwały, rozpada się w nieznacznym stopniu, gdzie w środowisku słabo utleniającym należy spodziewać się sygnału pochodzącego od wyjściowej formy kompleksu z dodatkową grupą hydroksylową (m/z 527), co stabilizuje kompleks. W wypadku, gdy grupa hydroksylowa została odłączona, kompleks ulega rozpadowi poprzez odłączanie się cząsteczek pirydyny (m/z 157), a w środowisku silnie utleniającym odłączeniu ulegają także grupy alifatyczne (m/z 273) (rys. 6).

Dla wszystkich sygnałów otrzymano widma fragmentacyjne, a przykładowe widmo dla sygnału o m/z 527 ukazuje ścieżkę rozpadu kompleksu, potwierdzając jego tożsamość (rys. 7).



Rys. 7. Widmo fragmentacyjne ESI MS/MS jonu macierzystego m/z 527, potencjał w komorze reakcyjnej równy 3V

6. Wnioski

Zastosowanie potencjometrycznej komory reakcyjnej ROXY umożliwiło zaproponowanie form głównych metabolitów tworzonych przez kompleksy złota w różnych warunkach redoks. Różnice w budowie i stopniu utlenienia złota w badanych kompleksach powodują, iż wykazują one inną trwałość i ich reaktywność względem tworzenia kompleksów z białkami transportującymi powinna być inna.

7. Perspektywy

Dalszy plan badawczy zakłada zbadanie *in vitro* kinetyki tworzenia adduktów kompleksów złota z białkami osocza krwi ludzkiej i cytozolu komórkowego (zarówno dla zdrowych, jak i rakowych komórek). Następnie przeprowadzone zostaną badania porównawcze w celu potwierdzenia tożsamości metabolitów kompleksów złota i ich wpływ na mechanizm działania oraz skuteczność potencjalnego leku. Otrzymane wyniki w warunkach modelowych ułatwią interpretację widm otrzymanych dla próbek pochodzenia biologicznego.

Literatura

- [1] Timerbaev A.R., Pawlak K., Gabbiani C., Messori L. (2011) Recent progress in the application of analytical techniques to anticancer metallodrug proteomics, *Trends in Anal. Chem.* 30, 7.
- [2] Timerbaev A.R., Hartinger C.G., Aleksenko S.S., Keppler B.K. (2006) Interactions of antitumor metallodrugs with serum proteins: advances in characterization using modern analytical methodology, *Chem. Rev.* 106, 2224.
- [3] Gabbiani Ch., Scaletti F., Massai L., Michelucci E., Cinellud M.A., Messori L. (2012) Medicinal gold compounds form tight adducts with the copper chaperone Atox-1: biological and pharmacological implications, *Chem. Commun.* 48, 11623–11625.
- [4] Albert A., Brauckmann Ch., Blaske F., Sperling M., Engelhard C., Karst U. (2012) Speciation analysis of the antirheumatic agent Auranofin and its thiol adducts by LC/ESI-MS and LC/ICP-MS, *J. Anal. At. Spectrom.* 27, 975.
- [5] Barnard P.J., Berners-Price S.J. (2007) Targeting the mitochondrial cell death pathway with gold compounds, *Coord. Chem. Rev.* 251, 1889–1902.
- [6] Gabbiani Ch., Cinellud M.A., Maiore L., Massai L., Messori L. (2012) Chemistry and biology of three representative gold(III) compounds as prospective anticancer agents, *Inorg. Chim. Acta* 393, 115–124.

ANALIZA KOMPLEKSÓW NIKOTIANAMINY Z WYBRANYMI METALAMI ZA POMOCĄ HILIC ESI MS/MS

KATARZYNA BRAMA¹, KATARZYNA TRACZ²,
DANUTA MARIA ANTOSIEWICZ², KATARZYNA PAWLAK¹

¹ Katedra Chemii Analitycznej, Wydział Chemiczny, Politechnika Warszawska
ul. Noakowskiego 3, 00-664 Warszawa

² Instytut Biologii Eksperymentalnej i Biotechnologii Roślin,
Zakład Anatomii i Cytologii Roślin, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski
ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa

Słowa kluczowe: biokompleksy, techniki sprzężone, spektrometr mas,
cynk, kadm, miedź

Stosowane skróty:

HPLC	– wysokosprawna chromatografia cieczowa
ESI MS/MS	– tandemowy spektrometr mas z jonizacją poprzez elektrorozpraszanie
ICP MS	– spektrometr mas z plazmą indukcyjnie sprzężoną
HILIC	– chromatografia oddziaływań hydrofilowych
RPLC	– chromatografia cieczowa w odwróconym układzie faz
NA	– nikotianamina
ACN	– acetonitryl
NAS	– syntezanikotianaminy
NAAT	– transferaza nikotianaminy
PCs	– fitochelatyny
Q TOF	– detektor czasu przelotu połączony z kwadrupolem
SEC	– chromatografia wykluczania
MRM	– tryb rejestracji jonów fragmentacyjnych otrzymanych dla wybranych jonów macierzystych (<i>multiple reaction monitoring</i>)
CE	– energia kolizji

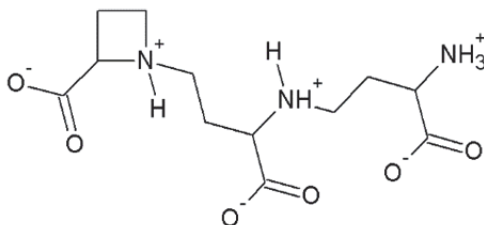
1. Wstęp

Wzrost wyjałowienia gleb i zubożenie żywności w mikroelementy spowodowały, że konieczne są coraz częściej: dywersyfikacja diety, suplementacja lub tzw. biofortyfikacja, czyli wzbogacanie żywności w substancje niezbędne do zapewnienia w pełni zbilansowanej diety człowieka [1]. Takie wzbogacanie może być dokonywane poprzez optymalizację zabiegów agrotechnicznych lub wykorzystanie roślin transgenicznych w celu selektywnego zwiększenia fitodostępności mikroelementów z gleby [2]; przy zmniejszonej akumulacji pierwiastków toksycznych. Innym rozwiązaniem jest zastosowanie roślin niejadalnych do rekultywacji gleb (fitoremediacji) lub unieruchomienia skażenia [3].

Zastosowanie roślin w celu biofortyfikacji lub fitoremediacji wymaga dokładnego poznania i zrozumienia procesów zaangażowanych w utrzymanie homeostazy metali w roślinach, do których należy pobieranie, transport dalekodystansowy, transport międzykomórkowy oraz wewnątrzkomórkowy. Jony metali są w roślinach kompleksowane przez bioligandy (u traw zwykle chelatujące fitosiderofory), które można podzielić na kilka grup ze względu na atom będący donorem elektronów [4]: tlen – małowyczkowe kwasy organiczne i flawonoidy; siarka – cysteina i peptydy zawierające cysteinę; tlen i azot – histydyna, nikotianamina i inne jej pochodne.

1.1. Rola nikotianaminy w metabolizmie metali

Nikotianamina (NA) jest niebiałkowym aminokwasem powszechnie występującym w roślinach [5, 6]. Jest syntetyzowana poprzez reakcję enzymatyczną kondensacji trzech grup amino-karboxypropylowych trzech cząsteczek S-adenozylometioniny [6]. NA w swojej budowie zawiera trzy grupy aminowe i karboksylowe (rys. 1), co daje możliwość tworzenia stabil-



Rys. 1. Struktura nikotianaminy (NA)

nych chelatów z jonami takich metali, jak: Mn, Fe, Co, Zn Ni i Cu [6]. Trwałość kompleksów z badanymi metalami jest największa przy pH powyżej 6,5 zależy też od rodzaju i stopnia utlenienia metali [5, 6].

Znaczenie NA w roślinach potwierdzono, badając rośliny pomidora zwyczajnego (*Lycopersicon esculentum* Mill.) i jego mutantu *chloronerva* niezawierającego w sobie nikotianaminy na skutek zmiany w genie *Nas* kodującym enzym – syntazę nikotianaminy [6]. U roślin tych obserwuje się sterylność, zredukowany wzrost oraz silne chlorozy międzywiązkowe młodych liści – objawy podobne do towarzyszących niedoborowi żelaza [6], które są odwracalne po wprowadzeniu nikotianaminy do rośliny [7]. Podobne objawy zaobserwowano w wypadku tytoniu, który zawierał gen syntezy *hvnat* (enzymu transferazy nikotianaminy do kwasów muigenowych) [7]. Chloroza była odwracalna tylko po podaniu żelaza razem z nikotianaminą. Wskazuje to na uczestnictwo NA w transporcie żelaza w roślinie [6]. Stwierdzono także bardzo małą zawartość enzymów zawierających miedź – dysmutazy ponadtlenkowej oraz plastocyaniny [6]. Te wyniki wskazują na bezpośredni udział NA w transporcie Cu z korzenia do pędu – najprawdopodobniej ksylemowego, ponieważ kompleks NA-Cu jest trwały także w środowisku lekko kwaśnym [5].

1.2. Techniki instrumentalne w badaniu kompleksów metali z bioligandami roślinnymi

Badanie kompleksów bioligandów z metalami (analiza specjacyjna) wymaga zastosowania metod selektywnych i czułych ze względu na małe stężenia różnorodnych kompleksów (stechiometrycznych i niestechiometrycznych) w ekstraktach roślinnych o bogatej matrycy [8–10]. Do identyfikacji związków zatem stosowane są cząsteczkowe spektrometry mas połączone z techniką rozdzielania związków (chromatografia cieczowa i elektroforeza kapilarna) – nazywane często technikami łączonymi [8, 9]. W wypadku wzbogacania kompleksów metali rozdzielanie może być realizowane w połączeniu ze spektrometrem mas z jonizacją w plazmie indukcyjnie sprzężonej (ICP MS), pozwalając na wydzielenie frakcji związków zawierających metal i różniących się masą cząsteczkową lub hydrofobowością, co pozwoliło na identyfikację kompleksu NA-Ni za pomocą ESI MS/MS w ekstraktach *Thlaspi carulescens* [8].

Nikotianamina i jej kompleksy to związki polarne. W celu umożliwienia ich detekcji za pomocą ESI MS i jednocześnie odpowiedniego rozdzielania można zastosować chromatografię oddziaływań hydrofilowych (HILIC) bez lub po wstępnym rozdzieleniu związków za pomocą SEC (dwuwymia-

rowa chromatografia). Takie postępowanie pozwoliło na identyfikację biokompleksów niklu w ekstraktach *T. cearelulescens* [9] i płynie ksylemowym *T. cearelulescens* za pomocą ESI QqTOF [10].

Jednym z większych problemów związanych z badaniem kompleksów metali z bioligandami jest ich ograniczona trwałość i współzawodnictwo pomiędzy ligandami i metalami prowadzące do ich wymiany lub zmian stechiometrii. Stąd też często badane jest powinowactwo metali do wykrytych bioligandów w warunkach *in vitro* w celu potwierdzenia możliwości tworzenia się zidentyfikowanych uprzednio kompleksów. Badania takie, w wypadku wpływu mikroelementów na trwałość kompleksu Fe-NA za pomocą ESI MS, przeprowadza się dla mieszanin substancji wzorcowych przygotowanych *in vitro* [5].

W prezentowanej pracy zastosowano rozdzielanie za pomocą HILIC oraz detekcję za pomocą tandemowego spektrometru mas ESI MS/MS do identyfikacji kompleksów nikotianaminy z kadmem, miedzią oraz cynkiem w ekstraktach korzeni i liści hydroponicznie uprawianego pomidora. Celem przeprowadzonych badań było zbadanie wpływu deficytu żelaza oraz nikotianaminy na wydajność transportu wyżej wymienionych metali do części nadziemnych rośliny.

2. Część eksperymentalna

2.1. Uprawa roślin

Pomidory uprawiano hydroponicznie przez 13 dni w czterech wariantach pożywki: (1) $\frac{1}{4}$ Knopa (warunki kontrolne), (2) $\frac{1}{4}$ Knopa bez żelaza, (3) $\frac{1}{4}$ Knopa i z dodatkiem kadmu (0,1 μM) oraz (4) $\frac{1}{4}$ Knopa bez żelaza i z dodatkiem kadmu (0,1 μM).

2.2. Przygotowanie materiału roślinnego do analiz

Rośliny, po zebraniu były dzielone na korzenie oraz liście, zamrażane w ciekłym azocie i przechowywane w temperaturze -80°C do rozpoczęcia procesu liofilizacji, który trwał dwie doby. Następnie korzenie oraz liście były ucierane na proszek w mrożdzierzu. Do próbek zawierających około 25 mg odważonego proszku dodawano 0,5 mL roztworu Tris o stężeniu 30 mM i pH 7,4 (w wypadku analiz za pomocą SEC dodawano jeszcze NaCl-, stężenie końcowe 10 mM). Próbki liści wytrząsano z roztworem ekstrahenta, natomiast próbki korzeni poddawano działaniu

ultradźwięków przez 30 min. Następnie próbki wirowano w temperaturze 4°C z prędkością 10 000 rpm przez 15 min. Roztwór z nad osadu przed analizą sączono przez sączek o wielkości porów 0,22 μm (pierwszą kroplę odrzucano).

2.3. Przygotowanie mieszanin substancji wzorcowych w warunkach *in vitro*

Kompleksy *in vitro* otrzymywano poprzez przygotowanie mieszaniny nikotianaminy o stężeniu 10 ppm z wzorcami jonów metali w stosunku molowym 1 : 1 w roztworze octanu amonu o stężeniu 10 mM i pH 7,4. Roztwory inkubowano 30 min w temperaturze 25°C.

2.4. Warunki realizacji chromatografii wykluczania i detekcji ICP MS

Do wstępnego rozdzielania kompleksów metali w ekstraktach pomidora zastosowano kolumnę Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare) podłączoną do wysokosprawnej pompy chromatograficznej model Agilent 1100 i wyposażonej w dozownik próbek o objętości 100 μL . Fazę ruchomą wprowadzaną z prędkością 0,5 $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$ stanowił roztwór Tris o stężeniu 30 mM, 10 mM NaCl i pH 7,4. Eluat z kolumny rozpylany był za pomocą rozpylacza koncentrycznego (przepływ gazu rozpylającego 1,09 $\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$) do plazmy indukcyjnie sprzężonej o mocy 1300 W spektrometru mas ICP MS (model HP7500 AT, Japonia), a jony wybranych izotopów metali (^{63}Cu , ^{66}Zn , ^{112}Cd) były sekwencyjnie rozdzielane za pomocą kwadrupolowego analizatora mas w czasie 300 ms.

2.5. Warunki chromatografii oddziaływań hydrofilowych

Kompleksy nikotianaminy, wprowadzane w postaci ekstraktu o objętości 20 μL , były oddzielane od matrycy poprzez oddziaływania hydrofilowe przy użyciu kolumny Ascentis Express HILIC z krzemionkową fazą stacjonarną. Stosowano elucję gradientową przy użyciu dwóch roztworów: (A) wodnego z octanem amonu o stężeniu 5 mM i (B) i jego mieszaniny z acetonitrylem o stosunku 5 : 95 (v/v). Stosowano następujący program gradientowy: 3 min – 100% B, 30 min – 33% B, 35 min – 33% B, 40 min – 100% B i 50 min – 100% B.

2.6. Warunki pracy tandemowego spektrometru mas z jonizacją poprzez elektrorozpraszanie (ESI MS/MS)

Identyfikacji kompleksów nikotianaminy z metalami dokonano z wykorzystaniem spektrometru mas ESI MS/MS wyposażonego w dodatkowy strumień gazu ogniskującego aerozol oraz w siedem kapilar desolwacyjnych i tunelu ogniskującego ekstrahowane jony (Jetstream i iFunnel). Wszystkie analizy na ESI MS/MS wykonywano w trybie jonów dodatnich ze względu na uzyskane wyższe sygnały. Ponieważ nikotianamina może tworzyć kompleksy z różnymi metalami, konieczne było zastosowanie selektywnego trybu pracy analizatorów mas poprzez rejestrację charakterystycznego jonu fragmentacyjnego uzyskanego dla wybranego macierzystego (MRM). Pary zostały wybrane na podstawie widm mas produktów fragmentacji jonów macierzystych otrzymanych dla kompleksów utworzonych *in vitro*. Tożsamość sygnałów zweryfikowano poprzez porównanie czasów retencji dla odtworzonych pików chromatograficznych porównywano z uzyskanymi dla ekstraktów roślinnych. Warunki pracy spektrometru mas przedstawiono w tabeli.

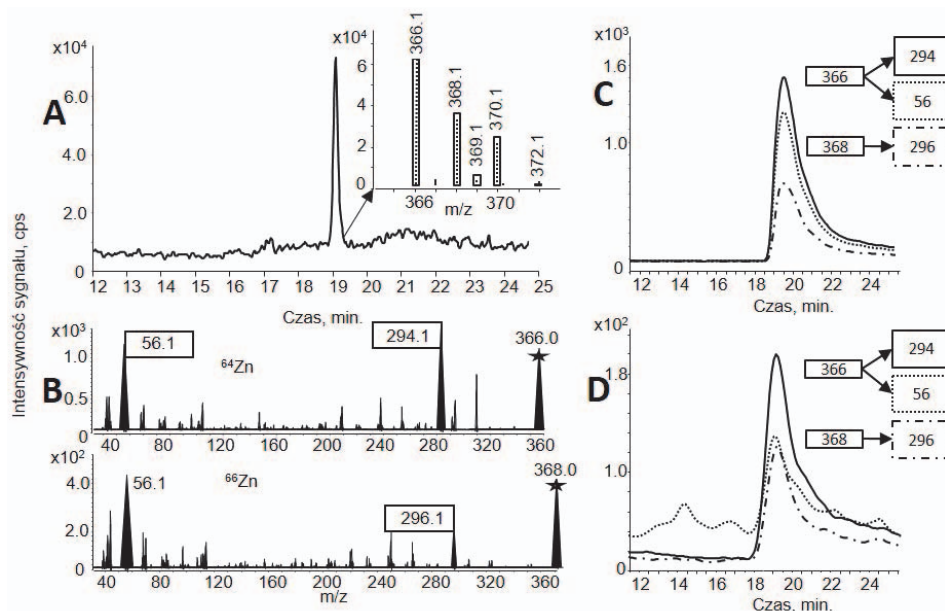
Tabela. Parametry pracy tandemowego spektrometru mas ESI MS/MS

Parametr	Wartość
Temperatura gazu	260°C
Przepływ gazu	16 L · min ⁻¹
Ciśnienie w rozpylaczu	40 psi
Temperatura gazu ogniskującego	400°C
Przepływ gazu ogniskującego	11 L · min ⁻¹
Napięcie jonizacji w trybie jonów dodatnich	2500 V
Napięcie jonizacji w trybie jonów ujemnych	2000 V
Napięcie ogniskujące aerozol	1000 V
Napięcie (w kryzje) transmisji jonów	380 V
Napięcie w strefie wyższego ciśnienia w ifunnelu	+ 200 (-150) V
Napięcie w strefie niższego ciśnienia w ifunnelu	+ 110 (-60) V

3. Wyniki i dyskusja

Na rysunku 2A przedstawiono fragment widma mas i chromatogram uzyskany w trybie przemiatania (SCAN) dla kompleksu NA z cynkiem otrzymanym *in vitro* i odtworzony dla *m/z* 366. Widmo jest zgodne z teoretycznym profilem izotopowym cynku, potwierdzając obecność cyn-

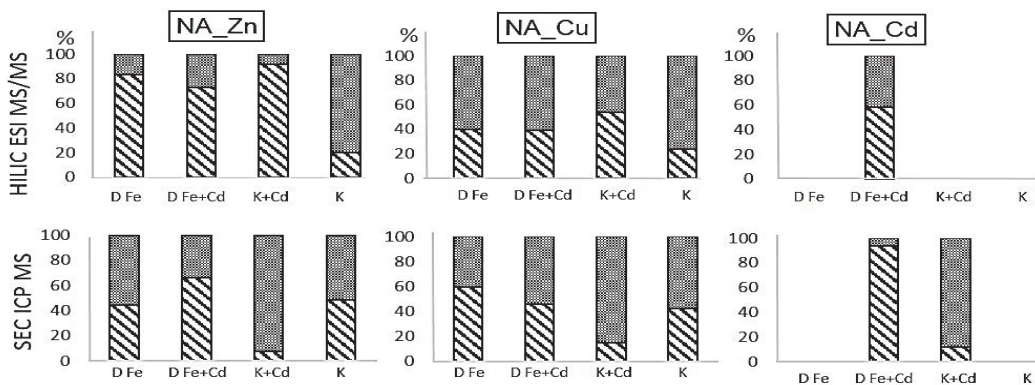
ku w związku, od którego pochodzi sygnał chromatograficzny. Jony o wartości m/z 366 oraz 368 – odpowiadające kompleksom NA- ^{64}Zn i NA- ^{66}Zn – zostały sfragmentowane. Na podstawie widm fragmentacyjnych (rys. 2B) zostały wybrane pary jonów macierzystych i otrzymanych dla nich fragmentacyjnych o największej intensywności (transmisje MRM). Dla kompleksów NA z cynkiem były to pary $366 \rightarrow 294$, $366 \rightarrow 56$ oraz $368 \rightarrow 296$.



Rys. 2. Wyniki otrzymane dla kompleksu NA-Zn za pomocą ESI MS/MS: A – chromatogram odtworzony dla m/z 366 oraz fragment widma mas (przerwane linie) zestawiony z teoretycznym profilem izotopowym cynku (prostokąty). B – widma fragmentacyjne jonów m/z 366 oraz 368 z zaznaczonymi głównymi sygnałami pochodzącymi od jonów fragmentacyjnych. C, D – chromatogramy otrzymane w trybie MRM: uzyskane dla mieszaniny wzorców (C) oraz ekstraktu liści (D)

Na rysunku 2C i D przedstawiono chromatogramy otrzymane dla poszczególnych par jonów dla kompleksów NA z cynkiem uzyskanych *in vitro* (C) oraz w ekstrakcie liści (D). Taki sam sposób postępowania wykorzystano w analizie kompleksów Cu i Cd. Wyniki uzyskane dla ekstraktów roślinnych zestawiono w postaci wykresów słupkowych (rys. 3), które odpowiadają względnym polom powierzchni sygnałów chromatograficznych dla następujących par jonów otrzymanych przy optymalnych energiach kolizji (jon macierzysty \rightarrow jon fragmentacyjny): NA-Zn $366 \rightarrow 294$ (18 eV), NA-Cu $365 \rightarrow 222$ (22 eV), NA-Cd $416 \rightarrow 217$ (30 eV).

Na podstawie wyników otrzymanych dla ekstraktów roślinnych (rys. 3) można stwierdzić, że w warunkach stresowych zawartości kompleksów NA-Me w liściach były znacząco mniejsze niż w korzeniach, zwłaszcza w porównaniu do grupy kontrolnej roślin uprawianych w warunkach korzystnych dla rozwoju. Oznacza to, że rośliny starają się zmniejszyć wydajność transportu toksycznych metali do części nadziemnej. W wypadku deficytu żelaza w pożywce reakcja jest podobna, co wskazuje na powiązanie jonów żelaza z procesem syntezy NA. Mimo to wpływ pozostałych mikroelementów, jak miedź i cynk, nie może być wykluczony, zwłaszcza że NA tworzy wykrywalne kompleksy z kadmem jedynie w warunkach deficytu żelaza.



Rys. 3. Względne pola powierzchni pików chromatograficznych otrzymanych dla kompleksów NA z Cu, Zn lub Cd w korzeniach (kreski ukośne) oraz liściach (kropki) za pomocą: HILIC ESI MS/MS i SEC ICP MS

D – deficyt, K – grupa kontrolna

Wyniki uzyskane dla kompleksów NA-Me, skorelowane z wynikami otrzymanymi za pomocą SEC ICP MS, wskazują na pozorną niezgodność. W wypadku kompleksów NA obserwuje się małą wydajność transportu jonów metali do części nadziemnej rośliny uprawianej w obecności kadmu w pożywce pełnej. Ogólna natomiast suma kompleksów metali, obserwowana za pomocą SEC ICP MS, wskazuje na intensywny transport tych metali do liści. Prawdopodobnie są to fitochelatyny, które są syntetyzowane przez rośliny w warunkach stresu kadmowego. Ciekawostką jest to, że wydajność transportu kadmu w postaci innych kompleksów do części nadziemnej rośliny także wymaga obecności żelaza w pożywce.

4. Perspektywy

Badania podstawowe nad poznaniem mechanizmów regulujących w roślinach transport jonów metali z części podziemnych do części nadziemnych są bardzo ważne w wypadku prawidłowego wykorzystania zjawiska fitoekstrakcji. W poczet takich badań można wpisać również badania prowadzone nad kompleksami NA z niektórymi metalami w pomidorze zwyczajnym. Uzyskane wyniki potwierdzają tezę, że metale są transportowane w roślinie w postaci kompleksów utworzonych przez bioligandy, których synteza jest powiązana z ilością pobieranego żelaza i nie jest to tylko nikotianamina.

Literatura

- [1] White P.J., Broadley M.R. (2008) Biofortification of crops with seven mineral elements often lacking in human diets – iron, zinc, copper, calcium, magnesium, selenium and iodine, *New Phytologist* 182, 49–84.
- [2] Zhu C., Naqvi S., Gomez-Galera S., Pelacho A.M., Capell T., Christou P. (2007) Transgenic strategies for the nutritional enhancement of plants, *Trends Plant Sci.* 12, 548–555.
- [3] Salt D.E., Blaylock M., Kumar N.P.B.A., Dushenkov V., Ensley B.D., Chet I., Raskin I. (1995) Phytoremediation: a novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants, *Biotechnology* 13, 468–474.
- [4] Alvarez-Fernandez A., Diaz-Benito P., Agadia A., Lopez-Millan A.-F., Abadia J. (2014) Metal species involved in long distance metal transport in plants, *Front. Plant Sci.* 5, 1–20.
- [5] Rellan-Alvarez R., Abadia J., Alvarez-Fernandez A. (2008) Formation of metal-nicotianamine complexes as affected by pH, ligand exchange with citrate and metal exchange. A study by electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Sp.* 22, 1553–1562.
- [6] Curie C., Cassin G., Couch D., Divol F., Higuchi K., Le Jean M., Misson J., Schikora A., Czernic P., Mari S. (2009) Metal movement within the plant: contribution of nicotianamine and yellow stripe 1-like transporters, *Ann. Bot.* 103, 1–11.
- [7] Takahashi M., Terada Y., Nakai I., Nakanishi H., Yoshimura E., Mori S., Nishizawa N.K. (2003) Role of nicotianamine in the intracellular delivery of metals and plant reproductive development, *Plant Cell* 15, 1263–1280.
- [8] Vacchina V., Mari S., Czernic P., Marques L., Pianelli K., Schaumloeffel D., Lebrun M., Łobiński R. (2003) Speciation of nickel in a hyper accumulating plant by high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry and electrospray MS/MS assisted by cloning using yeast complementation, *Anal. Chem.* 75, 2740–2745.
- [9] Ouerdane L., Mari S., Czernic P., Lebrun M., Łobiński R. (2006) Speciation of non-covalent nickel species in plant tissue extracts by electrospray Q-TOFMS/MS after

- their isolation by 2D size exclusion-hydrophilic interaction LC (SEC-HILIC) monitored by ICP-MS, *J. Anal. At. Spectrom.* 21, 676–683.
- [10] Mari S., Gendre D., Pianelli K., Ouerdane L., Łobiński R., Briat J.-F., Lebrun M., Czernic P. (2006) Root-to-shoot long-distance circulation of nicotianamine and nicotianamine-nickel chelates in metal hyper accumulator, *Thlaspi caerulescens*, *J. Exp. Bot.* 57, 4111–4122.

BADANIA ANTYKOROZYJNYCH PIGMENTÓW FOSFORANOWYCH*

KINGA ŁUCZKA¹, BARBARA GRZMIL¹, BOGUMIŁ KIC¹,
KRZYSZTOF KOWALCZYK²

Instytut Technologii Chemicznej Nieorganicznej i Inżynierii Środowiska,
Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie¹
Instytut Polimerów²
ul. Pułaskiego 10, 70-322 Szczecin
e-mail: kingaluczka@zut.edu.pl

1. Wstęp

Korozja jest zjawiskiem naturalnym, którego nie można całkowicie wyeliminować, jednak powinno się w znaczący sposób ograniczyć. Degradacja materiałów i środowiska na skutek korozji może być skutecznie obniżona poprzez umiejętne i konsekwentne jej zapobieganie. Głównie poprzez zastosowanie metod ochrony przeciwkorozyjnej oraz właściwy dobór materiałów. Kwestia odpowiedniego zabezpieczania konstrukcji stalowych przed korozją jest problemem dotyczącym nie tylko wytwórców, ale także inwestorów, projektantów, firm wykonujących powłoki antykorozyjne oraz dostawców sprzętu wykorzystywanego do tych prac. W skali globalnej korozja powoduje niszczenie ogromnych ilości stali (10–25 mln ton rocznie). Badania wykazały, że 20% energii w skali światowej i średnio 4,2% globalnego PKB jest tracone każdego roku z powodu korozji [1]. Zgodnie z doniesieniami naukowców, stosując odpowiednie zabezpieczenia antykorozyjne, w tym powłoki, można zredukować całkowite wydatki związane z korozją o 25–30%.

Korozję można ograniczyć, stosując inhibitory zmniejszające szybkość korozji w wyniku zahamowania procesu anodowego i/lub katodowego [2]. Wyróżnia się inhibitory anodowe, katodowe oraz o działaniu mieszanym. Do tych pierwszych zalicza się aniony nieorganiczne: fosforany(V), krzemiany, azotany(V), chromiany(VI) oraz organiczne, np. benzoesany. Poli-

* Projekt sfinansowany ze środków Narodowego Centrum Nauki (nr TANGO1/266477/NCBR/2015).

fosforany(V) natomiast należą do inhibitorów o działaniu mieszanym [3]. Dla skutecznej ochrony antykorozyjnej maszyn, aparatów i konstrukcji stalowych eksploatowanych w warunkach atmosferycznych stosuje się głównie lakierowe powłoki ochronne, powodujące odcięcie dostępu tlenu i wody do powierzchni podłoża metalowego. Zakłada się, że tylko powłoki zawierające inhibitory korozji zapewniają efektywną ochronę antykorozyjną stali. Powłoka taka ma właściwości barierowe i hamujące procesy korozyjne [4]. Inhibitory wprowadza się do powłok ochronnych w niewielkim stężeniu. Powinny one nie tylko spowalniać proces korozji, ale i być przyjazne dla środowiska [5]. Nieustannie poszukuje się nowych, skutecznych pigmentów antykorozyjnych, które przyczyniłyby się do podwyższenia odporności materiałów i urządzeń na działanie warunków atmosferycznych, a co za tym idzie – wydłużyły ich żywotność i zredukowały ilość odpadów [6].

Względy ekologiczne spowodowały, że od pigmentów antykorozyjnych oczekuje się nie tylko doskonałych właściwości ochronnych, ale również braku toksyczności dla organizmów żywych (w tym wodnych) zarówno na etapie otrzymywania, jak i stosowania gotowego produktu. Ponadto pożąda się, aby takie pigmenty mogły być wprowadzane zarówno do farb wodorozcieńczalnych, jak i układów rozpuszczalnikowych zawierających spoiwa epoksydowe, alkidowe, poliuretanowe, chlorokauczukowe, poliwinylowe, akrylowe, z poli(octanu winylu) oraz aby farby przygotowane z ich udziałem były trwałe/stabilne w czasie przechowywania. Do stosowanych aktualnie ekologicznych pigmentów antykorozyjnych zalicza się m.in.: borany (borokrzemiany, metaboran, boran cynku), molibdeniany(VI) (zasadowy molibdenian(VI) cynku, zasadowy molibdenian(VI) wapnia i cynku), ferryty (cynku i wapnia), tlenek wapnia, pył cynkowy oraz fosforany(V) [7]. Dwa ostatnie stanowią najliczniejszą grupę środków aplikowanych w ciekłych oraz proszkowych materiałach powłokowych.

Celem pracy było otrzymanie fosforanów(V) glinu modyfikowanych amonem, wapniem i molibdenem oraz zbadanie ich przydatności jako pigmentów antykorozyjnych.

2. Część doświadczalna

W badaniach dotyczących otrzymywania antykorozyjnych pigmentów fosforanowych zastosowano planowanie doświadczeń dla planu frakcyjnego trójwartościowego 3(k-p) oraz Metodę Powierzchni Odpowiedzi (RSM, *Response Surface Methodology*). Metoda ta jest zbiorem statystycznych i analitycznych technik obliczeniowych użytecznych w trakcie

prac eksperymentalnych w celu otrzymania produktu o jak najlepszych właściwościach. RSM pozwala wyznaczyć badane czynniki, które w istotny sposób wpływają na wartość analizowanych zmiennych zależnych [8]. Zmienne parametrami procesu (zmienne niezależne) były: x_1 – czas reakcji (90 ± 30 min), x_2 – stosunek molowy $\text{Ca}^{2+} : \text{PO}_4^{3-}$ w substratach (0,3 : 1; 0,4 : 1; 0,5 : 1). W tabeli 1 zamieszczono analizowane zmienne niezależne (x_{1-2}) oraz zależne (y_{1-8}) określające właściwości fizykochemiczne otrzymanych produktów.

Tabela 1. Otrzymywanie antykorozyjnych pigmentów fosforanowych – plan eksperymentów

Akronim	Zmienne rzeczywiste (niezależne)		Zmienne zależne
	x_1	x_2	
	Stosunek molowy $\text{Ca}^{+2} : \text{PO}_4^{-3}$ w substratach	Czas [min]	
AACMP1	0,5 : 1	60	y_1 – zawartość Al [% mas] y_2 – zawartość Ca [% mas] y_3 – zawartość NH_3 [% mas] y_4 – zawartość Mo [% mas] y_5 – zawartość P_2O_5 [% mas] y_6 – powierzchnia właściwa [m^2/g] y_7 – liczba olejowa [g/100 g] y_8 – wielkość ziarna [nm]
AACMP2		90	
AACMP3		120	
AACMP4	0,4 : 1	60	
AACMP5		90	
AACMP6		120	
AACMP7	0,3 : 1	60	
AACMP8		90	
AACMP9		120	

Celem założonego planu frakcyjnego trójwartościowego było otrzymanie pigmentów antykorozyjnych o zróżnicowanych właściwościach fizykochemicznych oraz zbadanie istotnych czynników mających wpływ na analizowane parametry i znalezienie odpowiednich wartości wejściowych umożliwiających otrzymanie produktu o oczekiwanym składzie chemicznym i fazowym. Wyniki uzyskane z przeprowadzonych doświadczeń zestawiono w tabeli 2.

W badaniach stosowano surowce o czystości odczynnikowej: $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18\text{H}_2\text{O}$, CaCO_3 , wodny roztwór amoniaku (25% mas. NH_3). Proces otrzymywania antykorozyjnych pigmentów fosforanowych prowadzono w szklanym reaktorze, w temperaturze 23°C , przy stałej prędkości mieszania. Sumaryczne stężenie soli we wszystkich doświadczeniach wynosiło 40% mas. W każdym wypadku pH mieszaniny reakcyjnej doprowadzano do $\text{pH} = 7$, a następnie po odpo-

wiednim czasie, wytracony osad oddzielano przez filtrację od roztworu macierzystego i przemywano trzykrotnie wodą, przy stosunku fazy ciekłej do fazy stałej jak 3 : 1. Osad suszono w temperaturze 70°C przez 3 h.

Tabela 2. Właściwości fizykochemiczne otrzymanych fosforanów

Akronim	Zawartość [% mas]					Powierzchnia właściwa S_{BET} [m ² /g]	Liczba olejowa [g oleju para-finowego/100 g]	Wielkość ziarna [nm]
	Al	Ca	NH ₃	Mo	P ₂ O ₅			
AACMP1	11,0	8,4	1,2	1,1	29,3	105	107	263
AACMP2	11,6	8,7	0,9	1,5	27,7	87	106	255
AACMP3	11,5	8,7	0,8	1,4	29,7	76	114	285
AACMP4	11,5	6,8	1,1	0,8	28,2	70	99	278
AACMP5	12,7	6,9	1,2	0,7	29,2	109	116	223
AACMP6	10,9	6,0	1,2	0,9	27,9	59	109	245
AACMP7	12,0	5,8	1,4	0,6	30,2	85	109	277
AACMP8	13,3	5,9	1,7	0,6	30,3	96	107	262
AACMP9	11,9	5,8	1,5	0,7	26,8	75	115	260

3. Stosowane metody analityczne

W otrzymanych produktach oznaczano zawartość glinu, molibdenu i wapnia metodą spektrometryczną ICP-AES (Optima 5300DV, Perkin Elmer), fosforanów spektrofotometryczną wanadowo-molibdianową [9] oraz amoniaku przy użyciu jonoselektywnej elektrody Orion typ 11–35 [10]. Do określenia składu fazowego produktów wykorzystano rentgenowską analizę dyfrakcyjną (dyfraktometr X'Pert PRO Philips, promieniowanie CuK α). Powierzchnię właściwą S_{BET} wyznaczono metodą niskotemperaturowej adsorpcji i desorpcji azotu (Micrometrics Quadrasorb SI Quantachrome Instrument). Liczbę olejową oznaczono według normy PN-EN ISO 787-5 [11]. Wielkość ziarna otrzymanych materiałów wyznaczono za pomocą laserowego mikroskopu elektronowego (Keyence VK-9710k Colour 3D Laser Scanning Microscope, Canada).

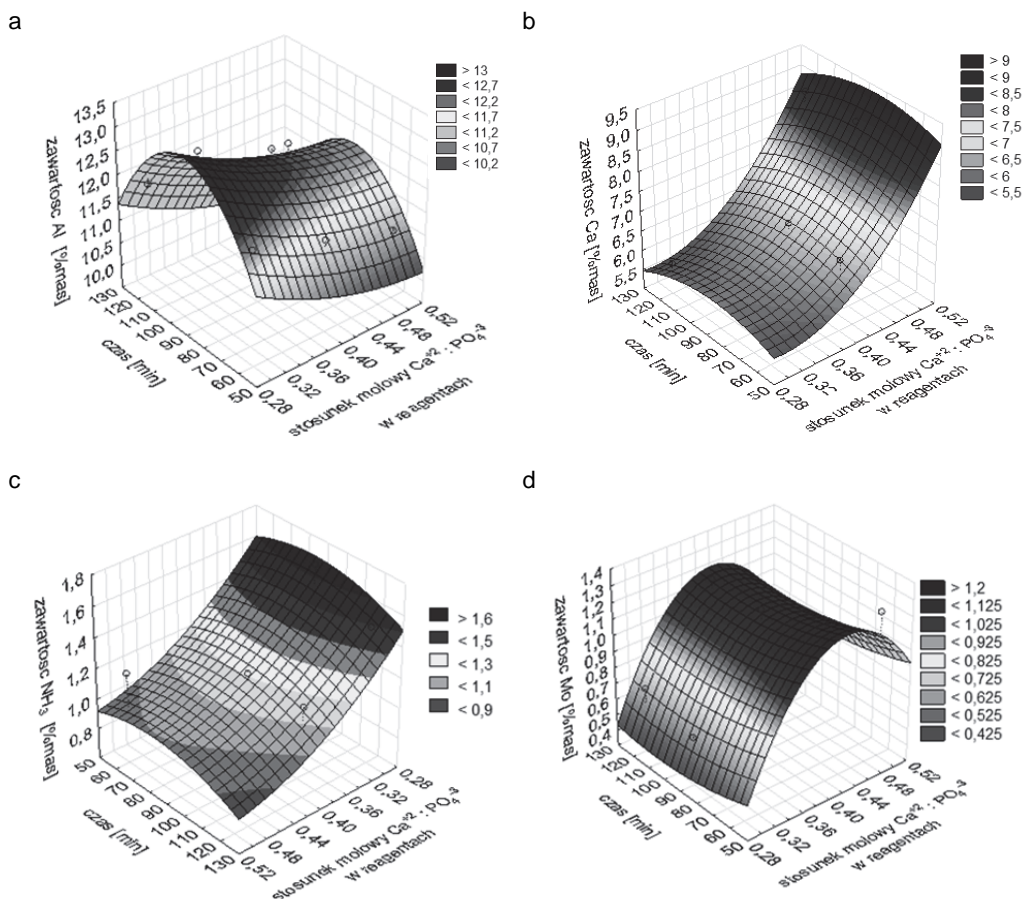
Antykorozyjne właściwości modyfikowanych fosforanów(V) glinu względem stali węglowej (zimnowalcowa typu CR1) badano metodą polaryzacji potencjodynamicznej. W tym celu przygotowywano ekstrakty wodne badanych fosforanów(V). Otrzymywano je w wyniku rozpuszczania fosforanów (2,5 g/100 g 3,5% mas. wodnego roztworu chlorku sodu) w czasie 22 h (z dwukrotnym wytrząsaniem w odstępie 20 h) i oddziele-

nia na wirówce (MLW typ K23D, Engelsdorf, 10 min, 5000 obr./min) fazy stałej od fazy ciekłej. Jako elektrolit odniesienia stosowano 3,5% mas. roztwór chlorku sodu. W celach porównawczych przygotowano także ekstrakt komercyjnego antykorozyjnego pigmentu fosforanowego dwuwodnego fosforanu(V) cynku FC-M2 i fosforanu(V) glinu i cynku FAC (Złoty Stok Antykorozja Sp. z o.o. w Złotym Stoku).

4. Dyskusja i wyniki

Analiza składu fazowego otrzymanych pigmentów wykonana metodą rentgenowskiej analizy dyfrakcyjnej wykazała obecność molibdenianu(VI) wapnia, węglanu wapnia i fazy amorficznej. Opierając się na badaniu składu chemicznego, stwierdzono, że uzyskane produkty zawierały azot, glin, wapń, molibden i fosfor w zróżnicowanej ilości (tab. 2). Zawartość w nich glinu mieściła się w przedziale 10,9% mas. ÷ 13,3% mas., wapnia 5,8% mas. ÷ 8,7% mas, natomiast molibdenu 0,6% mas. ÷ 1,5% mas., a azotu amonowego oscylowała w zakresie 0,8 ÷ 1,7% mas. NH_3 . Zawartość fosforu wynosiła od 26,8% mas. P_2O_5 ÷ 30,3% mas. P_2O_5 . Stracone fosforany(V) znacząco różniły się nie tylko składem chemicznym, ale i właściwościami fizycznymi. Powierzchnia właściwa S_{BET} otrzymanych pigmentów mieściła się w przedziale 59 ÷ 109 m^2/g , natomiast liczba olejowa w zakresie 99 ÷ 16 g oleju parafinowego/100 g pigmentu. Wielkość ziarna mieściła się w przedziale 223 ÷ 285 nm.

Stosując metodę powierzchni odpowiedzi (RSM), wyznaczono położenie punktu ekstremum dla badanych zmiennych zależnych (rys. 1). Analizując wykresy przestrzenne, stwierdzono, że fosforany charakteryzujące się najwyższą zawartością glinu, otrzymano po czasie reakcji 90 min i przy stosunku molowym reagentów $\text{Ca}^{+2} : \text{PO}_4^{-3}$ równym 0,3 : 1 (rys. 1a). Najwyższą zawartość wapnia zaobserwowano przy stosunku molowym $\text{Ca}^{+2} : \text{PO}_4^{-3}$ w substratach równym 0,3 : 1. W tym wypadku nie odnotowano wpływu czasu procesu na ten parametr (rys. 1b). Pigmenty charakteryzujące się najwyższą zawartością azotu otrzymano przy stosunku molowym $\text{Ca}^{+2} : \text{PO}_4^{-3}$ w substratach równym 0,3 : 1. Odnotowano również nieznaczny wpływ czasu reakcji na tą zmienną (rys. 1c). Na podstawie wykresu powierzchni odpowiedzi można stwierdzić, że zawartość molibdenu była najwyższa przy stosunku molowym w substratach $\text{Ca}^{+2} : \text{PO}_4^{-3}$ równym 0,4 : 1 (rys. 1d). Najniższą zawartością fosforu charakteryzowały się pigmenty stracone w czasie 120 min oraz stosunku molowym $\text{Ca}^{+2} : \text{PO}_4^{-3}$ w substratach wynoszącym 0,4 : 1 (rys. 1e).

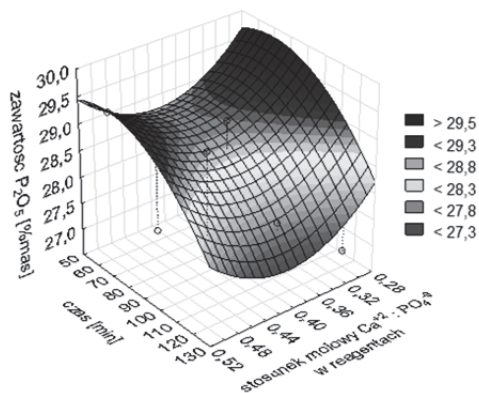


Rys. 1. Wykres powierzchni odpowiedzi przedstawiający wpływ stosunku molowego $\text{Ca}^{2+} : \text{PO}_4^{3-}$ węgla, liczbę olejową

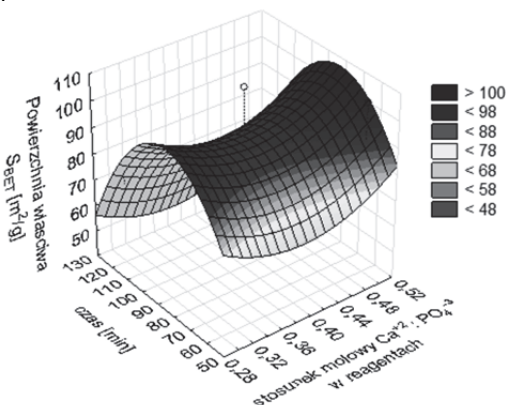
Fosforany(V) o najwyższej powierzchni właściwej strącono, zachowując czas reakcji równy 90 min przy stosunku molowym $\text{Ca}^{2+} : \text{PO}_4^{3-}$ jak 0,5 : 1 (rys. 1f). Przy stosunku molowym substratów $\text{Ca}^{2+} : \text{PO}_4^{3-}$ równym 0,4 : 1 otrzymano pigmenty o najniższej liczbie olejowej po niższym czasie syntezy – 60 min, a o najmniejszej wielkości ziarna w czasie 90 min (rys. 1g–h).

W tabeli 3 zestawiono wyniki badań właściwości antykorozyjnych ekstraktów uzyskanych z otrzymanych materiałów w wodnym roztworze chlorku sodu. Porównano je do dwuwodnego fosforanu(V) cynku FC-M2 i fosforanu(V) glinu i cynku FAC (Złoty Stok Antykorozyja Sp. z o.o. w Złotym Stoku).

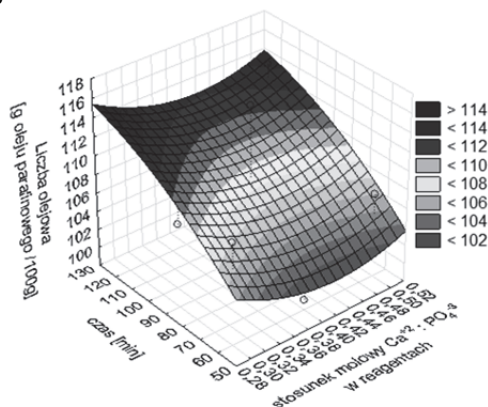
e



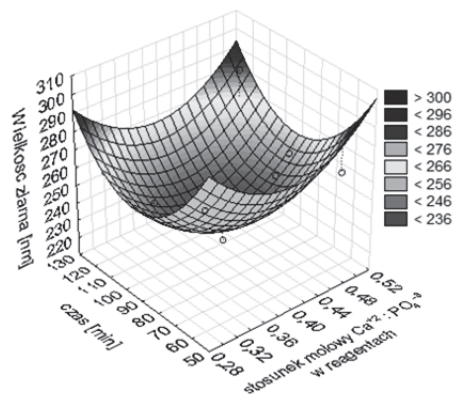
f



g



h



w substratach oraz czasu na zawartość Al, Ca, NH_3 , Mo, P_2O_5 [% mas], powierzchnię właściwą oraz wielkość ziarna

Najniższą korozję, w odniesieniu do otrzymanych fosforanów(V) glinu modyfikowanych amonem, wapniem i molibdenem, zaobserwowano w przypadku badania ekstraktu pigmentu strąconego w eksperymencie AACMP1 (gęstość prądu korozyjnego $2,53 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, szybkość korozji $0,029 \text{ mm}/\text{rok}$). Zarejestrowany potencjał korozyjny był najniższy i wyniósł -791 mV . Najniższą efektywność inhibitowania korozji wyznaczono w odniesieniu do fosforanu(V) zastosowanego w doświadczeniu AACMP7 (-186%). Nie dopatrzono się żadnej zależności między właściwościami chemicznymi testowanych fosforanów i efektywnością inhibitowania korozji stali w badaniach potencjodynamicznych.

Tabela 3. Potencjał, prąd korozyjny i szybkość korozji podłoża stalowego w wodnych ekstraktach zawierających badane pigmenty fosforanowe

Napełniacz		Gęstość prądu korozyjnego [$\mu\text{A}/\text{cm}^2$]	Potencjał korozyjny [mV vs. SCE]	Szybkość korozji [mm/rok]	Efektywność [%]
Brak	NaCl	2,17	-799	0,025	-
Pigmenty komercyjne	FAC	1,1	-725	0,013	49
	FC-M2	1,2	-796	0,014	45
Otrzymane pigmenty	AACMP1	2,53	-791	0,029	-17
	AACMP2	2,57	-779	0,030	-118
	AACMP3	2,48	-786	0,029	-114
	AACMP4	3,43	-774	0,040	-158
	AACMP5	3,88	-782	0,045	-179
	AACMP6	2,57	-775	0,030	-118
	AACMP7	4,04	-781	0,047	-186
	AACMP8	3,07	-781	0,036	-141
	AACMP9	2,28	-752	0,027	-105

5. Wnioski

Przeprowadzone badania umożliwiają dobór sposobu prowadzenia procesu w kierunku otrzymania fosforanów(V) glinu modyfikowanych amonem, molibdenem i wapniem, o oczekiwanych właściwościach fizykochemicznych i antykorozyjnych. Najwyższa uzyskana efektywność inhibitowania korozji z wykorzystaniem omówionych fosforanów wynosiła -17%, ale była znacznie niższa niż porównywalnych komercyjnych.

6. Perspektywy

Realizowane są badania w kierunku uzyskania pigmentów o korzystniejszych właściwościach antykorozyjnych.

Literatura

- [1] Dias S.A.S., Lamaka S.V., Nogueira C.A., Diamantino T.C., Ferreira M.G.S. (2012) Sol-gel coatings modified with zeolite fillers for active corrosion protection of AA2024, *Corros. Sci.* 62, 153–162.

-
- [2] Hao Y., Liu F., Han E., Anjum S., Xu G. (2013) The mechanism of inhibition by zinc phosphate in an epoxy coating, *Corros. Sci.* 69, 77–86.
- [3] Wranglén G. (1985) *Podstawy korozji i ochrony metali*, WNT, Warszawa.
- [4] Głuszko M., Szymański W. (2009) *Ochrona przed korozją* 4–5, 146–151.
- [5] Sastri V.S. (2011) *Green corrosion inhibitors: theory and practice*, John Wiley and Sons, Inc, Hoboken New Jersey, 180–181.
- [6] Łuczka K., Grzmił B., Michalkiewicz B., Kowalczyk K. (2015) Studies on obtaining of aluminium phosphates modified with ammonium, calcium and molybdenum, *J. Ind. Eng. Chem.* 23, 257–264.
- [7] Spychaj T., Spychaj S. (1996) *Farby i kleje wodorozcieńczalne*, WNT, Warszawa.
- [8] Box G.E.P., Hunter J.S., Hunter W.G. (2005) *Statistics for Experimenters*, Wiley-Interscience, Hoboken, NJ.
- [9] Minczewski J., Marczenko Z. (2005) *Chemia analityczna*, Wyd. Nauk. PWN, Warszawa.
- [10] Orion Ammonia Electrode, *Instruction manual* (2003) Thermo Electron Corporation, Cambridgeshire.
- [11] Polska Norma, *Ogólne metody badań pigmentów i wypełniaczy – Oznaczanie liczby olejowej*, PN-EN ISO 787-5: 1995.

ISBN 978-83-232-2989-6



9 788323 229896