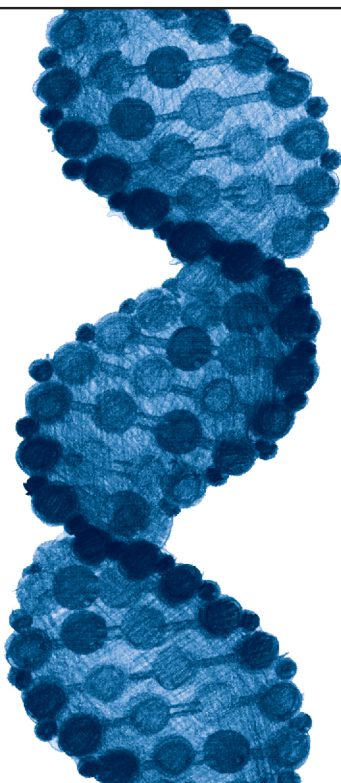


NA POGRANICZU CHEMII I BIOLOGII

TOM XXXIV



WYDAWNICTWO
NAUKOWE UAM

NA POGRANICZU
CHEMII I BIOLOGII

UNIwersytet IM. ADAMA MICKIEWICZA W POZNANIU

NA POGRANICZU CHEMII I BIOLOGII

TOM XXXIV

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

Publikacja dofinansowana przez Wydział Chemii UAM

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

Redaktor: Aleksandra Ratajczak

Redaktor techniczny: Dorota Borowiak

Łamanie komputerowe: Eugeniusz Strykowski

Projekt okładki: Ewa Wąsowska

ISBN 978-83-232-2988-9

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. 20,50. Ark. druk. 17,375.

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

SPIS TREŚCI

Przedmowa	7
Część pierwsza: BIOLOGIA CHEMICZNA	
MARTA RACHWAŁAK, TOMASZ JAKUBOWSKI, JOANNA ROMANOWSKA Nowe trendy w projektowaniu pronukleotydów anti-HIV	11
SZYMON KOWALSKI, IWONA INKIELEWICZ-STĘPNIAK Katelicyny – naturalne antybiotyki peptydowe	29
PATRYCJA MROWIEC, MAGDALENA RAPP, HENRYK KORONIAK Synteza oraz transformacje pochodnych kwasów fosfonowych	47
MONIKA BILSKA-MARKOWSKA, HENRYK KORONIAK Iminocukry: mimetyki węglowodanów będące inhibitorami glikozydaz – charakterystyka i znaczenie	71
TOMASZ JAKUBOWSKI, MARTA RACHWAŁAK, JOANNA ROMANOWSKA Chemia <i>H</i> -fosfonianów w syntezie związków biologicznie aktywnych	101
MATEUSZ KUPRIANOWICZ, HANNA WÓJTOWICZ-RAJCHEL Izoksazolidynowe pochodne C ⁵ -podstawionych uracyli. Synteza i zahamowana inwersja na atomie azotu w świetle NMR i obliczeń metodami DFT	113
DOROTA JARMUŻEK, DONATA PLUSKOTA-KARWATKA Przemiany fotochemiczne statyn	131
JAN LICA, MAJUS MISIAK, ANDRZEJ SKŁADANOWSKI Leukemiogeneza oraz współczesne metody terapii przeciwnowotworowych na przykładzie ostrej białaczki szpikowej – AML	155
MAGDALENA WIELGOSIŃSKA, EWELINA ZIELIŃSKA, KAROLINA NISKA, MAGDALENA GÓRSKA, MICHAŁ WOŹNIAK Nowoczesne metody zwalczania biofilmu bakteryjnego jamy ustnej	175

Część druga: NANOBIO MEDYCYNA

EWELINA ZIELIŃSKA, KAROLINA NISKA, DOROTA MEHRHOLZ, DAGMARA LUBOWIECKA, IWONA INKIELEWICZ-STĘPNIAK Zastosowanie nanocząstek metali w terapii przeciwnowotworowej	191
EWELINA ZIELIŃSKA, KAROLINA NISKA, DOROTA MEHRHOLZ, IWONA INKIELEWICZ-STĘPNIAK, DAGMARA LUBOWIECKA Zastosowanie nanocząstek metali i tlenków metali w dermatologii i kos- metyce	205
KAROLINA NISKA, EWELINA ZIELIŃSKA, DAGMARA LUBOWIECKA, IWONA INKIELEWICZ-STĘPNIAK Wpływ nanocząstek metali i tlenków metali na komórki skóry	225
KATARZYNA PYSZKA, IWONA INKIELEWICZ-STĘPNIAK Nanotechnologia i nanocząstki jako potencjalna broń w walce z nowo- tworem kości	239
EWELINA GRONCZEWSKA, JACEK J. KOZIOŁ, ALICJA DEFORT Uwalnianie leku z nanocząstek magnetycznych otaczanych chitozanem, poli(tlenkiem etylenu) i dekstranem	257

PRZEDMOWA

Niniejszy XXXIV tom jest zbiorem artykułów serii *Na pograniczu chemii i biologii*. Zawiera on 14 artykułów podzielonych na dwie części: biologia chemiczna i nanobiomedycyna.

W części dotyczącej biologii chemicznej znajdują się artykuły omawiające przemiany kwasów fosfonowych, iminocukrów, zasad heterocyklicznych oraz statyn. Znajduje się tam również charakterystyka i właściwości antybiotyków peptydowych, a także nowe terapie antynowotworowe.

Drugi rozdział obejmuje zagadnienia, które należą do nanobiomedycyny. Ten nowy obszar badawczy pokazuje charakterystykę i wykorzystanie nanocząstek w biofizyce, biologii molekularnej, kosmetyce oraz onkologii.

Artykuły te będą niewątpliwie pomocne w tworzeniu trwałych podstaw wiedzy niezbędnej do zrozumienia funkcjonowania żywej komórki.

Książkę tę kierujemy do studentów i młodszych pracowników nauki.

Henryk Koroniak
Jan Barciszewski

Redaktorzy *Na pograniczu chemii i biologii*

Część pierwsza



**BIOLOGIA
CHEMICZNA**

NOWE TRENDY W PROJEKTOWANIU PRO-NUKLEOTYDÓW ANTY-HIV

MARTA RACHWALAK, TOMASZ JAKUBOWSKI,
JOANNA ROMANOWSKA

Instytut Chemii Bioorganicznej, Polska Akademia Nauk
ul. Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań
e-mail: joarom@ibch.poznan.pl

Hasła do zapamiętania: AIDS, HIV, nukleozydo-5'-difosforan, prolek, pro-nukleotydy

Wykaz skrótów:

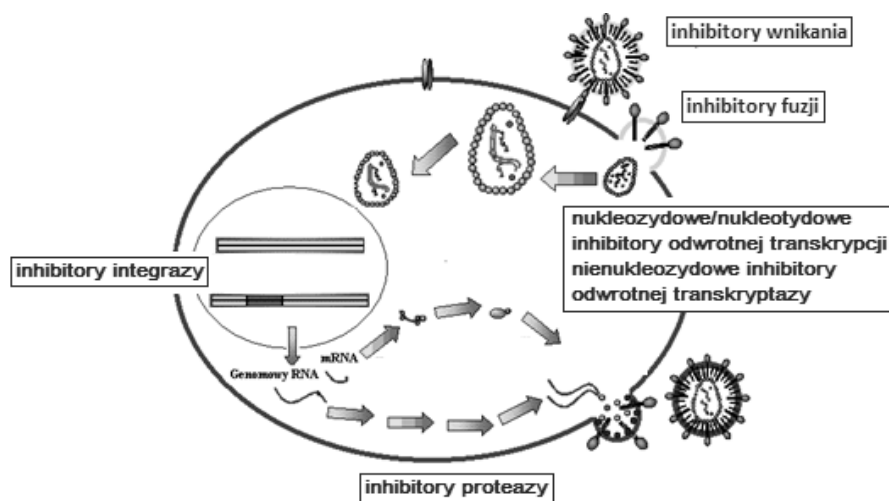
- AIDS – zespół nabytego upośledzenia odporności
(ang. *acquired immunodeficiency syndrome*)
- ART – terapia antyretrowirusowa (ang. *antiretroviral therapy*)
- AZT – 3'-azydo-3'-deoksytymidyna
- CC₅₀ – stężenie cytotoksyczne (ang. *cytotoxic concentration*)
- ddN – 2',3'-dideoksynukleozyd
- EC₅₀ – stężenie efektywne (ang. *effective concentration*)
- FBS – surowica z płodów bydłych (ang. *fetal bovine serum*)
- FDA – Urząd ds. Leków i Żywności
(ang. *Food and Drug Administration*)
- HAART – wysoce aktywna terapia antyretrowirusowa
(ang. *highly active antiretroviral therapy*)
- HIV – ludzki wirus upośledzenia odporności
(ang. *human immunodeficiency virus*)
- NDP – nukleozydo-5'-difosforan
- NMP – nukleozydo-5'-monofosforan
- NNRTIs – nienukleozydowe inhibitory odwrotnej transkryptazy
(ang. *non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors*)
- NRTIs – nukleozydowe inhibitory odwrotnej transkrypcji
(ang. *nucleoside reverse transcriptase inhibitors*)
- NTP – nukleozydo-5'-trifosforan
- RT – odwrotna transkryptaza (ang. *reverse transcriptase*)
- TMP – 5'-monofosforan tymidyny

1. Wstęp

Początek epidemii wirusa HIV przypada na lata 80. XX wieku. Od tego czasu, wirusem zostało zakażonych około 78 milionów ludzi na całym świecie, a 39 milionów zmarło wskutek AIDS, czyli ostatniego stadium zakażenia wirusem HIV, charakteryzującego się wyniszczeniem układu odpornościowego i brakiem możliwości obrony organizmu przed najmniejszą nawet infekcją. Według danych, jakie podaje portal www.aids.gov, obecnie 35 milionów ludzi żyje z wirusem HIV, a liczba zakażonych z roku na rok maleje (w 2013 r. 2,1 miliona ludzi zostało zainfekowanych; liczba ta jest o wiele niższa od tej z 2001 r., kiedy to wynosiła 3,4 miliona). Dobre wyniki i prognozy w leczeniu osób zakażonych spowodowane są coraz lepszą profilaktyką anti-HIV oraz większymi możliwościami dostępu do terapii. Pomimo to dotychczas nie udało się wynaleźć skutecznej szczepionki czy leku powodującego całkowitą eliminację HIV z organizmu chorego, co stanowi jedno z najpoważniejszych wyzwań współczesnej medycyny i chemii medycznej. Dlatego stale poszukuje się nowych leków, prowadząc równocześnie badania nad ulepszaniem leków już istniejących.

2. Strategie w projektowaniu leków anti-HIV

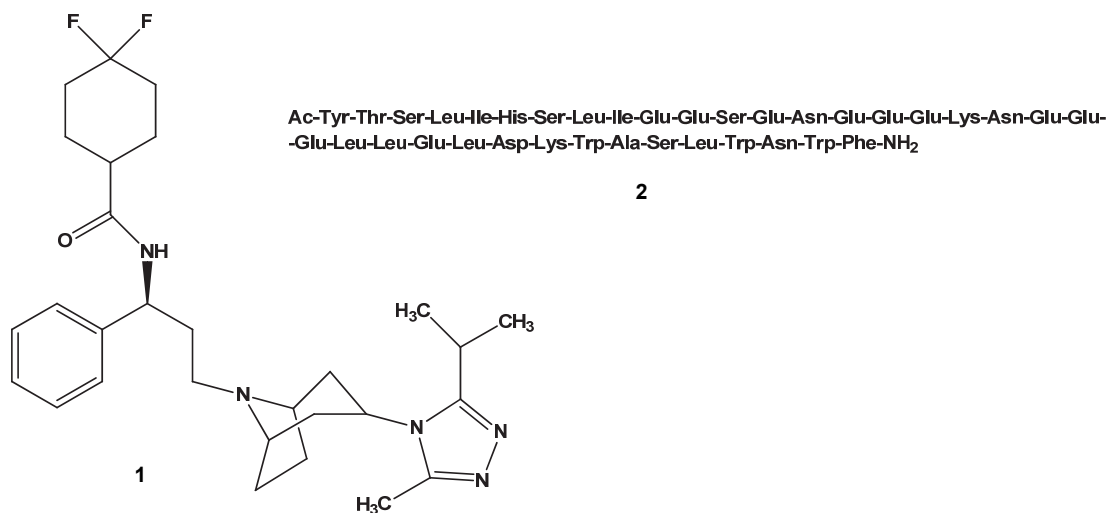
Wirus HIV należy do grupy retrowirusów, których cykl życiowy opiera się na procesie odwrotnej transkrypcji przeprowadzanej przez enzym – odwrotną transkryptazę. Znajomość mechanizmów molekularnych



Rys. 1. Schemat przedstawiający przykładowe strategie leczenia anti-HIV

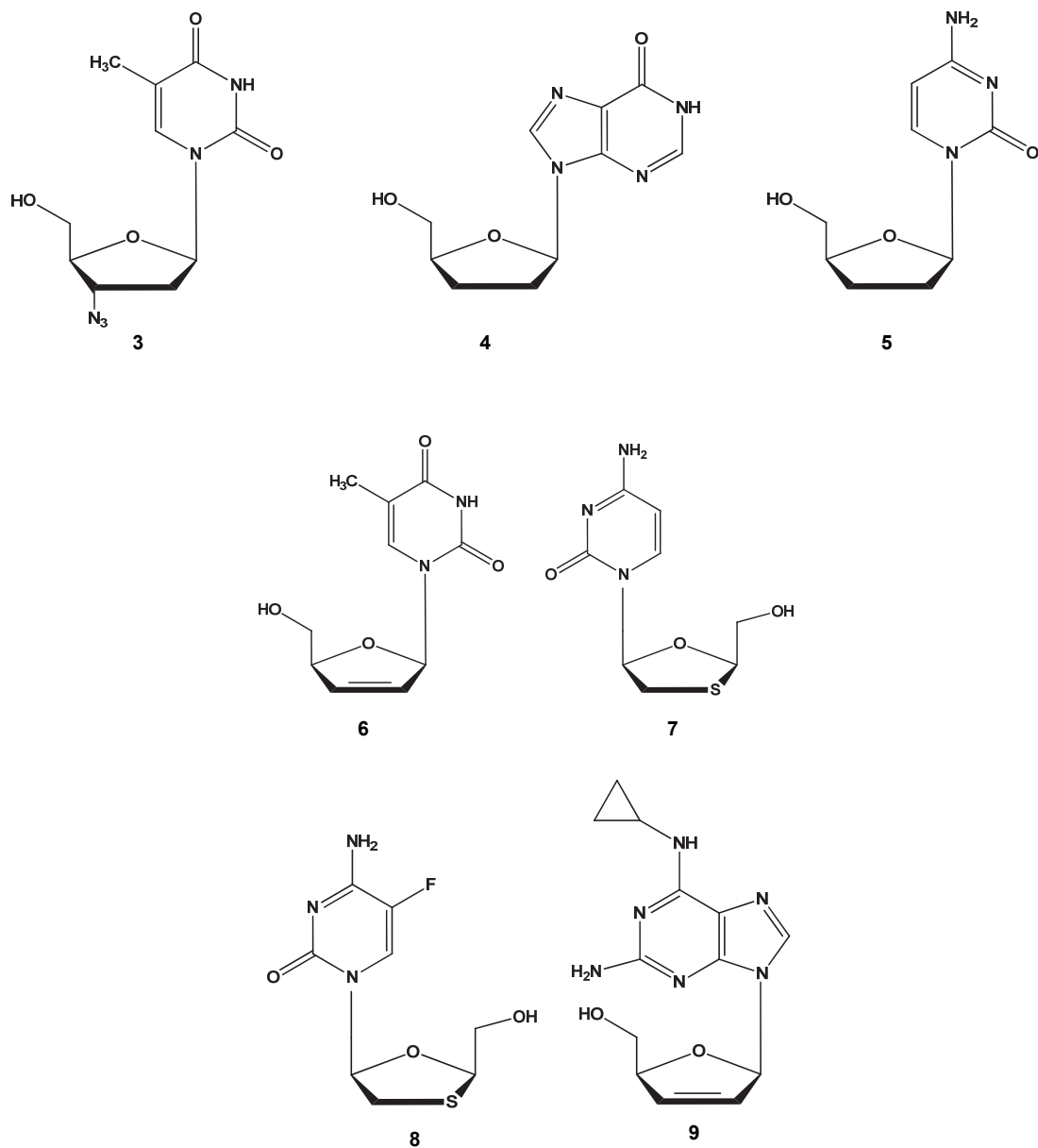
każdego z etapów cyklu życiowego wirusa pozwala wskazać potencjalne cele działania leków antywirusowych, gdyż na poszczególnych etapach można potencjalnie interweniować. Kluczowe dla replikacji HIV etapy – przyłączenie i wniknięcie do komórki, odwrotna transkrypcja, integracja, ekspresja materiału genetycznego oraz składanie cząstek wirusowych – stanowią bowiem potencjalne cele leków antyretrowirusowych (Rys. 1) [1].

Inhibitory wnikania i fuzji – FDA dopuściła do stosowania klinicznego w 2007 r. pierwszy lek hamujący wnikanie HIV do komórek, opóźniający wystąpienie objawów AIDS – marawirok (Celsentri®, Rys. 2-1). Natomiast pierwszym uznanym przez FDA (w 2003 r.) i jak dotąd jedynym inhibitorem fuzji jest enfuwirtyd (T-20, pentafuzyd, Fuzeon®, Rys. 2-2).



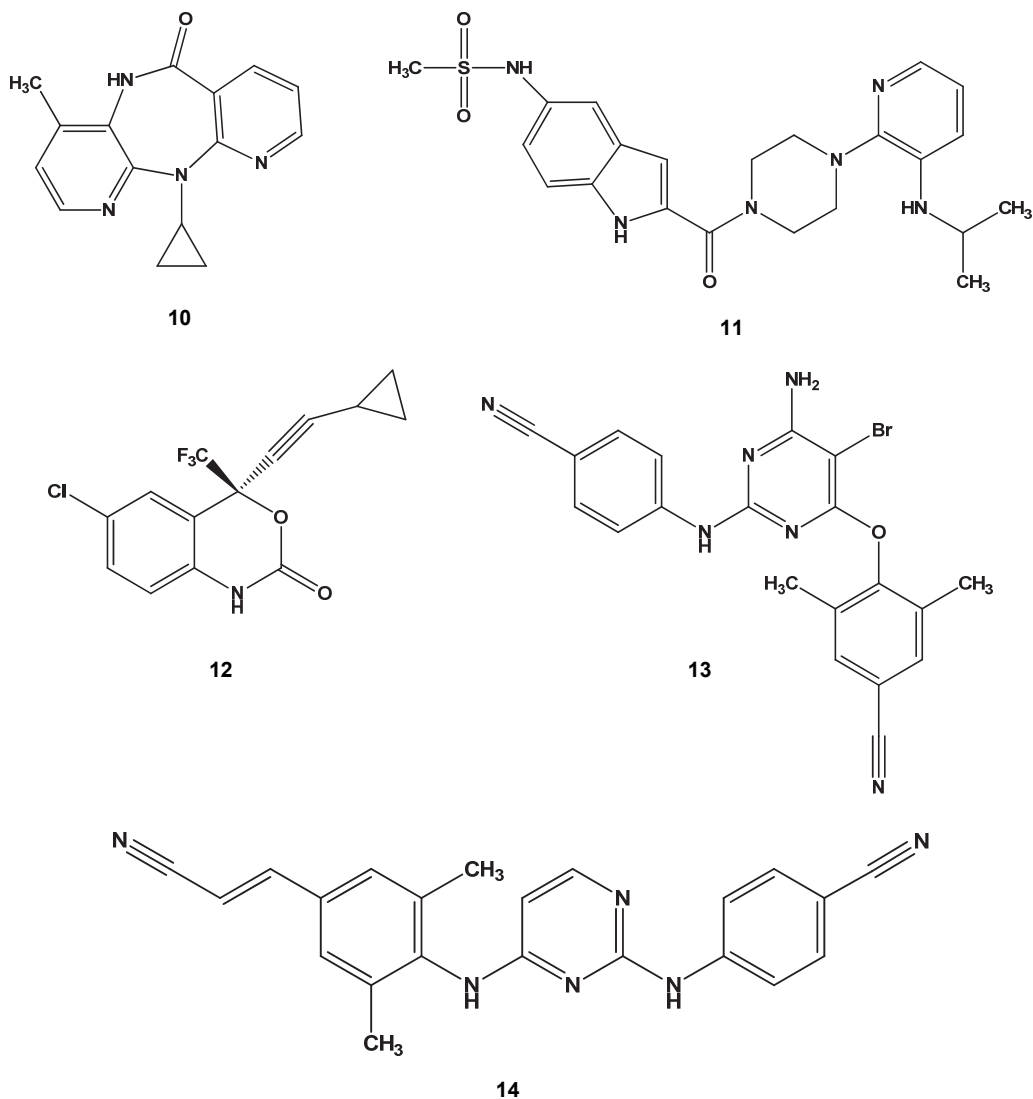
Rys. 2. Inhibitor wiązania – 1 (marawirok) i fuzji – 2 (enfuwirtyd) HIV-1

Nukleozydowe inhibitory odwrotnej transkrypcji (NRTIs) – tę klasę związków stanowią analogi nukleozydów – 2',3'-dideoksynukleozydy, spośród których 3'-azydo-3'-deoksytymidyna (AZT, zidowudyna, Retrovir®) (Rys. 3-3) była pierwszym uznanym przez FDA lekiem na AIDS. Obecnie w leczeniu stosuje się kilka innych analogów, przedstawionych na Rys. 3 [2].



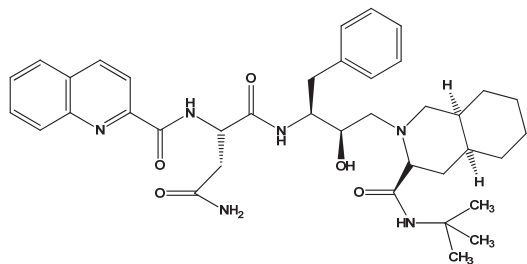
Rys. 3. Struktura chemiczna analogów nukleozydów, inhibitorów odwrotnej transkrypcji; **3** – 3'-azydo-3'-deoksytymidyna (AZT, zidowudyna); **4** – 2',3'-dideoksyinozyna (ddI, didanozyna, Videx®); **5** – 2',3'-dideoksytydyna (ddC, zalcitabina, Hivid®); **6** – 2',3'-didehydro-3'-deoksytymidyna (d4T, stawudyna, Zerit®); **7** – L-3'-tia-2',3'-dideoksytydyna (3TC, lamiwudyna, Epivir®); **8** – 5-fluoro-L-3'-tia-2',3'-dideoksytydyna (FTC, emtricitabina, Emtriva®); **9** – 2',3'-didehydro-2',3'-dideoksy-2-amino-6-cyklopropyloaminopurynorybonukleozyd (ABC, abacavir, Ziagen®)

Nienukleozydowe inhibitory odwrotnej transkryptazy (NNRTIs) – pięć nienukleozydowych inhibitorów RT zostało dopuszczonych przez FDA do stosowania klinicznego. Wzory strukturalne tych związków zostały przedstawione na Rys. 4.

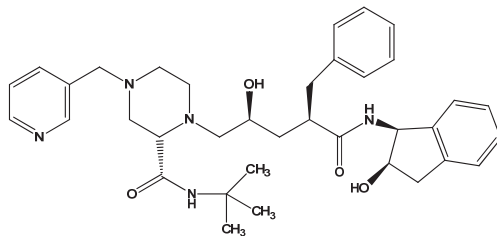


Rys. 4. Uznane przez FDA NNIRT HIV-1; **10** – newirapina (NVP, Viramune®); **11** – delawurdyna (DLV, Rescriptor®); **12** – efawirenz (EFV, Sustiva®); **13** – etrawiryina (Intelence®); **14** – rilpiwiryna (Edurant®)

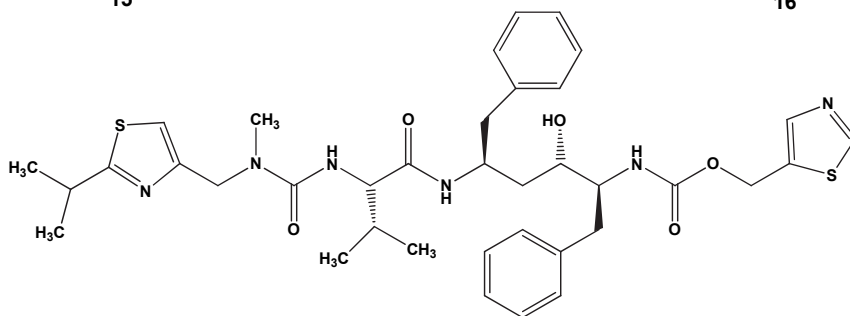
Inhibitory proteazy – do tej grupy leków należą związki chemiczne przedstawione na Rys. 5.



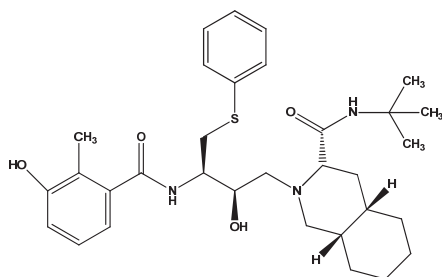
15



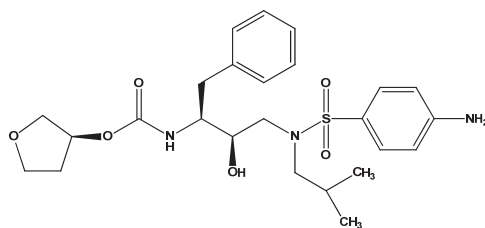
16



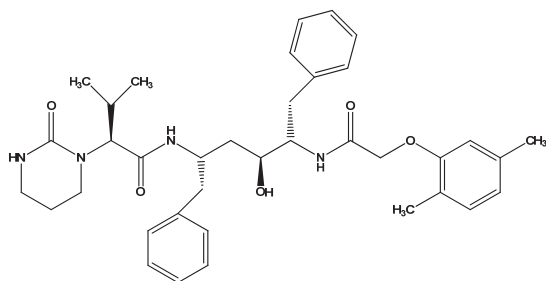
17



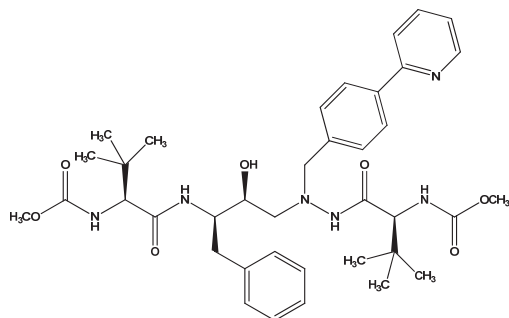
18



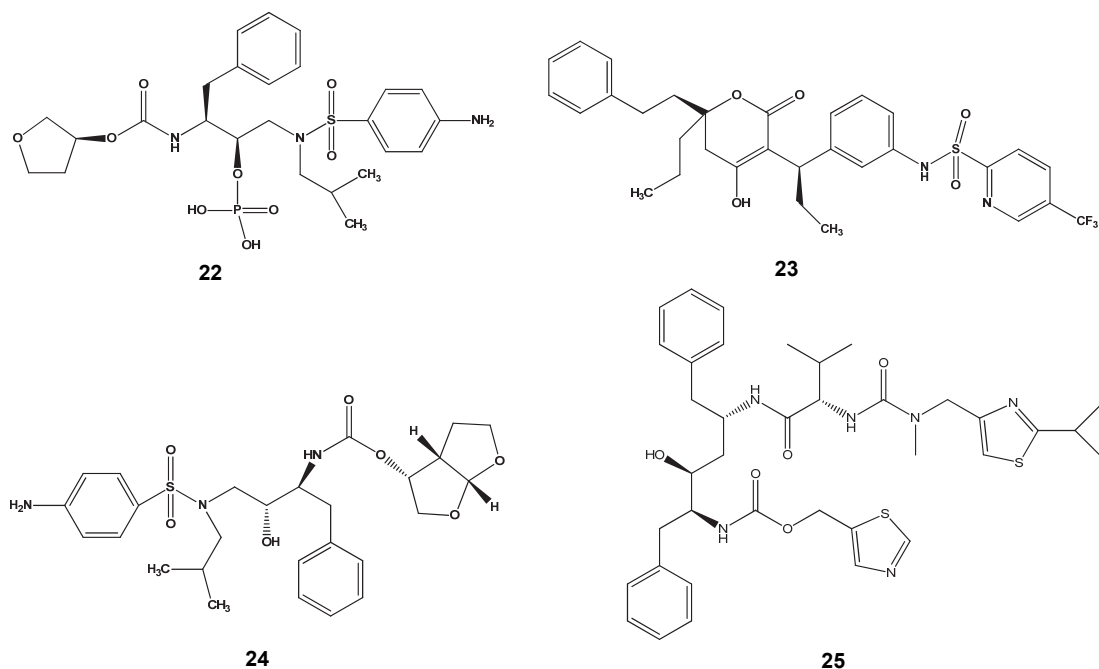
19



20



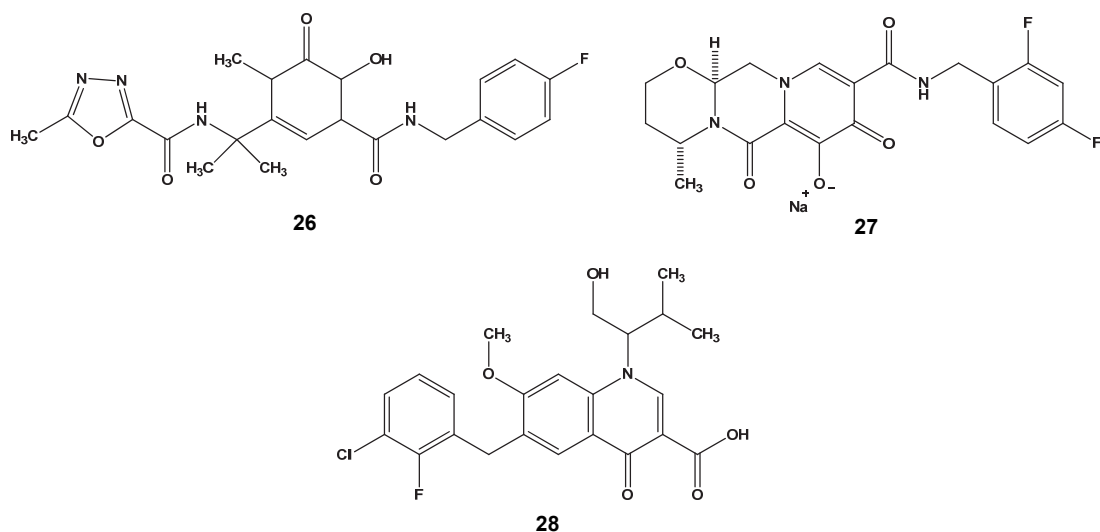
21



Rys. 5. Uznane przez FDA inhibitory proteazy wirusa HIV-1; **15** – saquinawir (SQU, Invirase®/Fortovase®); **16** – indinawir (IDV, Crixivan®); **17** – ritonawir (RTV, Norvir®); **18** – nelfinawir (NFV, Viracept®); **19** – amprenawir (APV, Agenerase®, zaprzestano produkcji); **20** – lopinawir (LPV, Kaletra®); **21** – atazanawir (ATV, Reyataz®); **22** – fosamprenawir (Fos-APV, Lexiva®); **23** – tipranawir (TPV, Aptivus®); **24** – darunawir (DRV, Prezista®); **25** – ritonawir (RTV, Norvir®)

Inhibitory integrazy – obecnie na rynku farmaceutycznym znaleźć można trzy leki tego rodzaju, zatwierdzone do użytkowania przez FDA (Rys. 6).

Politerapia HAART – polega na jednoczesnym stosowaniu przez pacjenta co najmniej trzech leków przeciwwirusowych, najczęściej według schematu: dwa nukleozydowe inhibitory syntezy DNA i jeden nienukleozydowy inhibitor proteazy lub inhibitor odwrotnej transkryptazy. Aby zmniejszyć liczbę tabletek przyjmowanych przez osobę zakażoną wirusem, do użycia zostały zatwierdzone (przez FDA) leki, które są kombinacją NRTIs, m.in.: Combivir® (lamiwudyna, zidowudyna), Epzicom® (abacawir, lamiwudyna), Trizivir® (abacawir, zidowudyna, lamiwudyna). Terapia HAART zapobiega powstawaniu lekooporności oraz obniża toksyczność podawanych leków. W rezultacie u pacjentów poddanych leczeniu techniką HAART obserwuje się zahamowanie replikacji wirusa do stanu niewykrywalności.



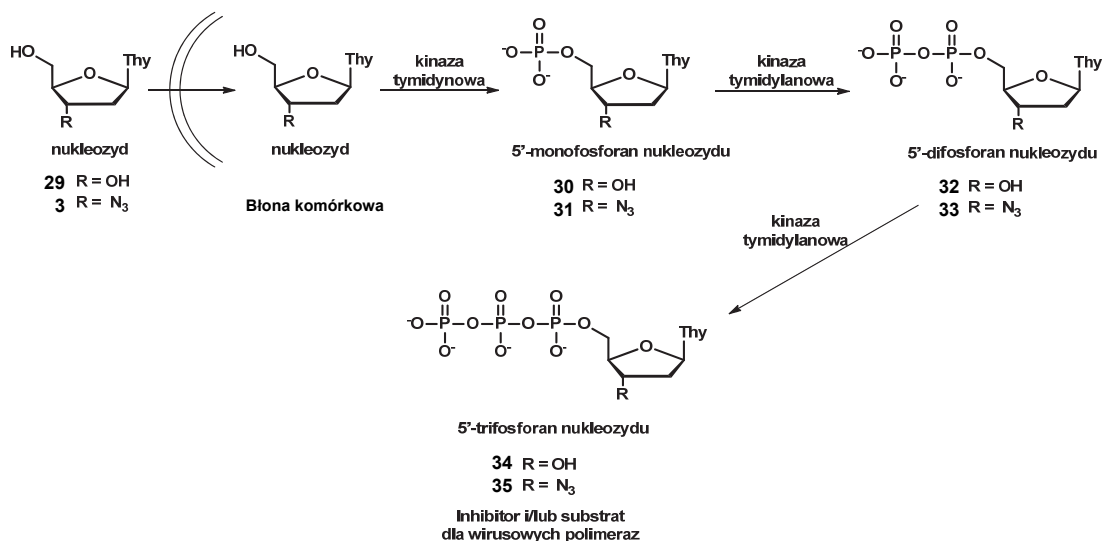
Rys. 6. Inhibitory integrazy HIV-1; **26** – raltegrawir (RAL, Isentress®); **27** – doluterawir (DTG, Tivicay®); **28** – elwitegrawir (EVG, Vitekta®)

3. Pronukleotydy anty-HIV

Odwrotna transkryptaza HIV odpowiedzialna jest za transkrypcję wirusowego RNA na cDNA, który po integracji z DNA gospodarza staje się macierzą dla nowych kopii wirusowego RNA. Przerwanie procesu transkrypcji hamuje zatem replikację wirusa i chroni przed AIDS. Fakt ten wykorzystano do syntezy szeregu proleków, analogów nukleozydów – 2',3'-dideoksynukleozydów, które *per se* nie wykazują aktywności antywirusowej, natomiast w organizmie po chemicznych lub/i enzymatycznych przemianach uwalniają aktywne leki wywołujące pożądany efekt terapeutyczny (Rys. 7).

Aby spełnić swoją funkcję w hamowaniu odwrotnej transkrypcji HIV, AZT oraz i inne analogi 2',3'-dideoksynukleozydów po wnikięciu do komórki muszą zostać ufosforylowane do nukleozydo-5'-trifosforanów (Rys. 7). Podczas pierwszej fosforylacji nukleozydu (**3** i/lub **29**), utworzony zostaje 5'-monofosforan nukleozydu, NMP (**30** i/lub **31**) z udziałem kinazy tymidynowej, która odpowiada za syntezę 5'-monofosforanu tymidyny, naturalnie występującej w komórce, a proces odbywa się przy zbliżonym powinowactwie obu substratów do tego enzymu. Wyraźne różnice kinetyczne pojawiają się w dalszych etapach fosforylacji przez kinazy tymidylanowe. AZTMP dwukrotnie silniej wiąże się z tym enzymem niż TMP,

lecz jego przekształcenie do NDP **33** i NTP **35** jest znacznie wolniejsze [3]. W związku z tym AZTMP wysyca enzym i blokuje syntezę 5'-trifosforanu tymidyny, potrzebnego do syntezy DNA gospodarza. Kumulacja AZTMP jest głównym powodem toksyczności tego ddN. Do innych ograniczeń stosowania AZT należą tworzące się w innych ścieżkach katabolicznych jego toksyczne produkty: 5'-*O*-glukuronian 3'-aminotymidyny oraz 3'-aminotymidyna, które znacznie pomniejszają jego terapeutyczną efektywność [4, 5].



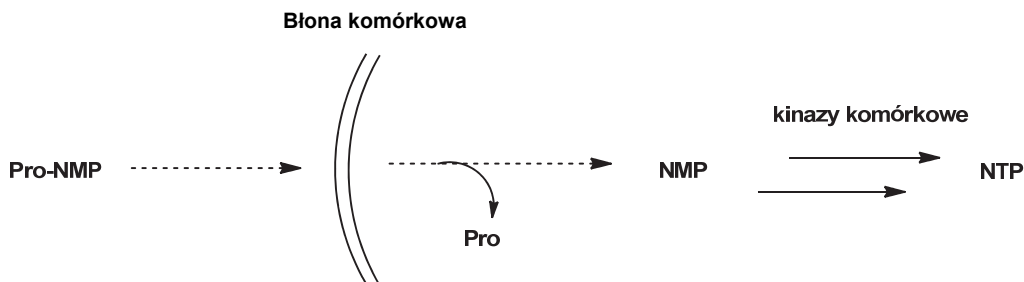
Rys. 7. Wewnątrzkomórkowy metabolizm nukleotydów

Skuteczność działania 2',3'-dideoksynukleotydów jako inhibitorów odwrotnej transkrypcji HIV-1 zależy przede wszystkim od skuteczności ich fosforylacji przez kinazy komórkowe do odpowiednich 5'-trifosforanów **35** (Rys. 7), które są biologicznie aktywną formą, zdolną do inhibicji procesu odwrotnej transkrypcji. Niestety związki te są niekiedy słabymi substratami dla tych enzymów, w związku z tym ich użyteczność terapeutyczna znacznie spada.

Szlaki metaboliczne innych 2',3'-dideoksynukleotydów okazały się jeszcze bardziej złożone. 2',3'-dideoksyurydyna (Rys. 3-5) jest nieaktywna w blokowaniu infekcji HIV – nie jest ona substratem kinaz komórkowych i nie może być przekształcona w ddUMP [6], natomiast 5'-trifosforan-2',3'-dideoksyurydyny jest bardzo efektywnym i selektywnym inhibitorem RT

HIV. W przypadku innego analogu nukleozydu, d4T (Rys. 3-6), fosforylacja do jego 5'-monofosforanu przez kinazę tymidynową zachodzi niemal 500 razy wolniej w porównaniu z AZT (Rys. 3-3), gdyż d4T ma znacznie mniejsze powinowactwo do tego enzymu. Właśnie ten etap fosforylacji kształtuje jego aktywność anti-HIV, ponieważ następne fosforylacje z udziałem kinazy tymidylanowej i tworzenie d4TDP i d4TTP zachodzą znacznie szybciej [7]. Ta ścisła zależność od kinaz komórkowych, występowanie lekoopornych mutacji oraz efekty uboczne wywoływane przez nukleozydowe inhibitory odwrotnej transkrypcji powodują, że związki te, choć skuteczne, to nie są idealnymi terapeutykami przeciwko HIV.

W związku z ograniczeniami stosowania 2',3'-dideoksynukleozydów w celach terapeutycznych, zrodziła się koncepcja pronukleotydów, które zaprojektowano po to, aby omijać pierwszy, kluczowy i zarazem często najbardziej chimeryczny etap fosforylacji analogu nukleozydu w komórce. W związku z tym, prolek miałby być nukleotydem zawierającym grupy maskujące na reszcie fosforanowej, które w komórce zostają usunięte (na skutek hydrolizy chemicznej i/lub enzymatycznej) i uwolniony zostaje nukleozydo-5'-monofosforan, który dalej jest fosforylowany do di-, a następnie do biologicznie aktywnego 5'-trifosforanu (Rys. 8) [8].

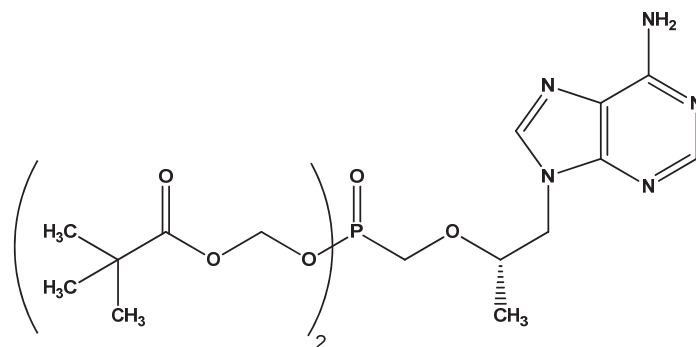


Rys. 8. Mechanizm działania pronukleotydów

Spełnienie koncepcji pronukleotydu stanowi niemałe wyzwanie. Związki te muszą spełniać kilka, często sprzecznych ze sobą, kryteriów; powinny być

- (i) wysoce lipofilowe,
- (ii) rozpuszczalne w wodzie,
- (iii) stabilne w warunkach fizjologicznych,
- (iv) muszą wnikać do komórek,
- (v) powinny być przekształcane chemicznie lub/i enzymatycznie w odpowiednie nukleotydy, a następnie 5'-trifosforany [9].

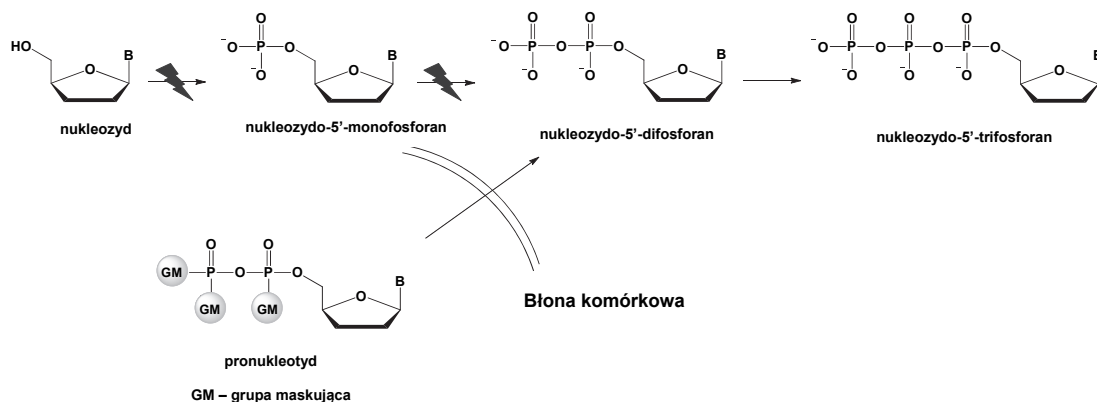
Te i inne wymagania spowodowały, że jak dotąd jedynie jeden pronukleotyd, tenofovir, Viread® (Rys. 9) [10], został dopuszczony przez FDA do stosowania klinicznego.



Rys. 9. Tenofovir, Viread®

3.1. Nukleozydo-5'-difosforany

W związku z powyższym, zrozumiałym wydaje się fakt, że chemicy podejmują się syntezy nowych pronukleotydów. Podstawowe różnice w podejściu bazują na metodach dostarczania i uwalniania (na drodze enzymatycznej lub chemicznej) 5'-fosforanów w komórce [11]. Spośród licznych pronukleotydowych koncepcji anti-HIV, najliczniejszą stanowią związki posiadające w swej strukturze AZT jako antywirusowy analog ddN. Jednak, jak wspomniano wcześniej, w przypadku tego 2',3'-dideoksy-

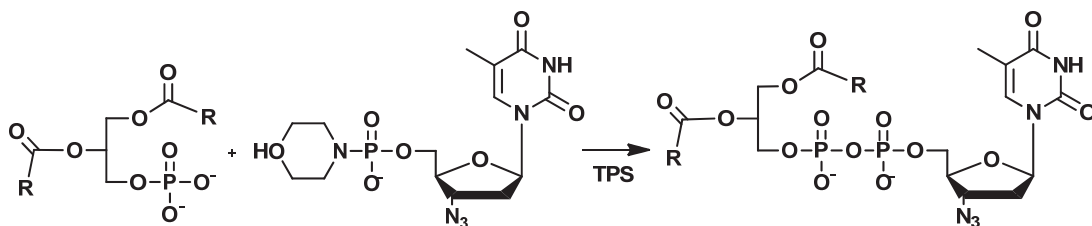


Rys. 10. Nowe idee w projektowaniu pronukleotydów anti-HIV – nukleozydo-5'-difosforany

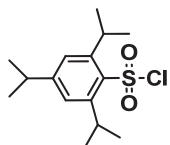
nukleozydu (Rys. 7-3), największy problem występuje z fosforylacją nie do mono-, ale do difosforanu. W związku z tym, powstała idea, by otrzymywać blokowane na resztach fosforanowych nukleozydo-5'-difosforany, które po wnikięciu do komórki będą uwalniały NDP, który w krótszym czasie zostanie przekształcony w aktywny biologicznie NTP (Rys. 10).

Jako grupy maskujące reszty fosforanowej nukleozydu stosowano wiele różnorodnych struktur, których głównym zadaniem jest zwiększenie lipofilowości związku po to, aby mógł on przenikać błony komórkowe, a wewnątrz komórki ulegać metabolizmowi do nukleozydo-5'-difosforanu i w końcu do aktywnego 5'-trifosforanu.

Hostetler et al. wykorzystali do tego celu reszty glicerydowe, w rezultacie otrzymując różne diglicerydowe nukleozydodifosforany (Rys. 11) [12].



TPS = chlorek triizopropylobenzenuosulfonowy

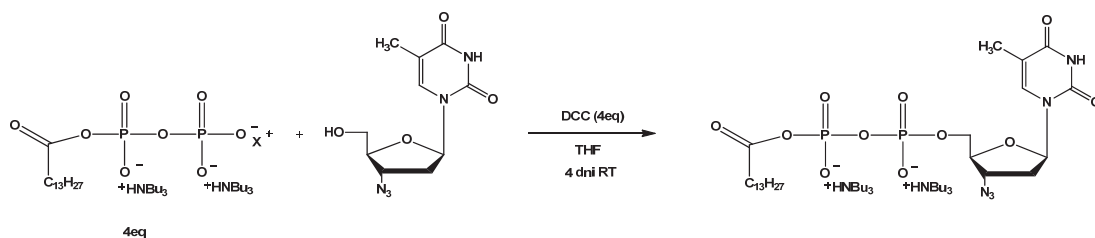


R = C₁₅H₃₁

Rys. 11. Schemat syntezy diglicerydowych pochodnych nukleozydodifosforanów według koncepcji Hostetlera (na przykładzie AZT)

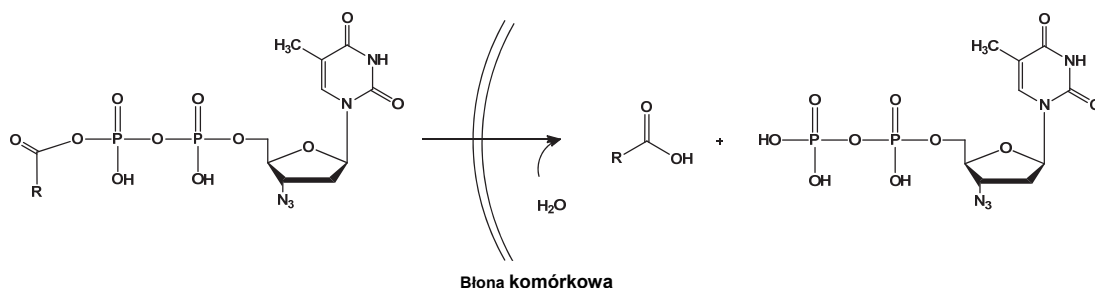
Grupa glicerylowa miała posłużyć zwiększeniu lipofilowości, a tym samym ułatwieniu transportu substancji przez błonę komórkową. Jednak w wyniku hydrolizy tych związków uzyskiwano mieszaninę monofosforanów, zamiast pożądanego nukleozydodifosforanu [12].

Kolejną, zaproponowaną przez Huynh-Dinha, strategią wykorzystywaną do otrzymywania NDP była synteza acylowych pochodnych nukleozydodifosforanów (Rys. 12) [13].



Rys. 12. Synteza acylowych pochodnych nukleozydodifosforanów według koncepcji Huynh-Dinha (na przykładzie AZT)

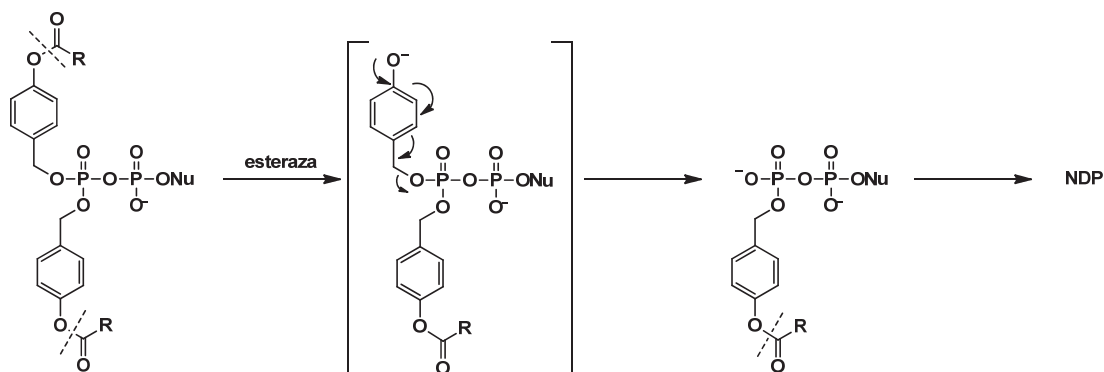
Nukleotydy te zawierały grupy zbudowane z długich łańcuchów reszt kwasów tłuszczowych maskujące atom P_{β} , które zwiększały lipofilowość związku, a przez to umożliwiały jego wydajny transport przez błony komórkowe (Rys. 13) [13]. Jednakże, również w tym przypadku, w kulturach komórkowych obserwowano rozpad NDP do odpowiednich NMP.



Rys. 13. Mechanizm uwalniania nukleozydo-5'-difosforanów syntetyzowanych przez Huynh-Dinha (na przykładzie AZT)

Struktury zaproponowane przez Hostetlera czy Huynh-Dinha, mimo że były związkami lipofilowymi, to jednak nie dostarczały do komórek pożądanego produktu hydrolizy grup maskujących – nukleozydo-5'-difosforanu.

Meier et al. zaproponowali estryfikację reszty fosforanowej P_{β} NDP grupami bis(acyloksybenzylowymi), które miałyby neutralizować ładunki ujemne reszty fosforanowej. Cała koncepcja uwalniania nukleozydo-5'-difosforanu w komórce oparta została na inicjowanym enzymami rozpadzie grupy acylowej przyłączonej do reszty fenylowej, co z kolei prowadzi do destabilizacji wiązania benzylofosfoestrowego i usunięcia, w wyniku 1,6-eliminacji, pierwszej grupy benzylowej maskującej resztę fosforo-



Nu = nukleozyd (d4T lub AZT)

R = alkil lub fenyl

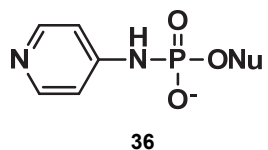
Rys. 14. Enzymatyczne uwalnianie NDP w komórkach (wg koncepcji Meiera)

wą P_B. Po wygenerowaniu monoestru konieczne jest powtórzenie obu etapów, po których uwolniony zostaje nukleozydo-5'-difosforan (Rys. 14) [14].

W tej klasie związków otrzymano zarówno symetryczne pochodne acylowe (alifatyczne lub aromatyczne), jak i asymetryczne (R¹ – krótki łańcuch alkilowy, R² – długi łańcuch), które pozwalały modulować trwałość i lipofilowość grupy maskującej. Analiza HPLC potwierdziła, że obydwa typy związków uwalniały w komórce nukleozydo-5'-difosforan. Przeprowadzono również badania biologiczne tych pochodnych, na podstawie których stwierdzono wyższe aktywności antywirusowe niż odpowiednich analogów 2',3'-dideoksynukleozydów (AZT i d4T) [14].

3.1.1. Pochodne amidofosforanowe nukleozydo-5'-difosforanów

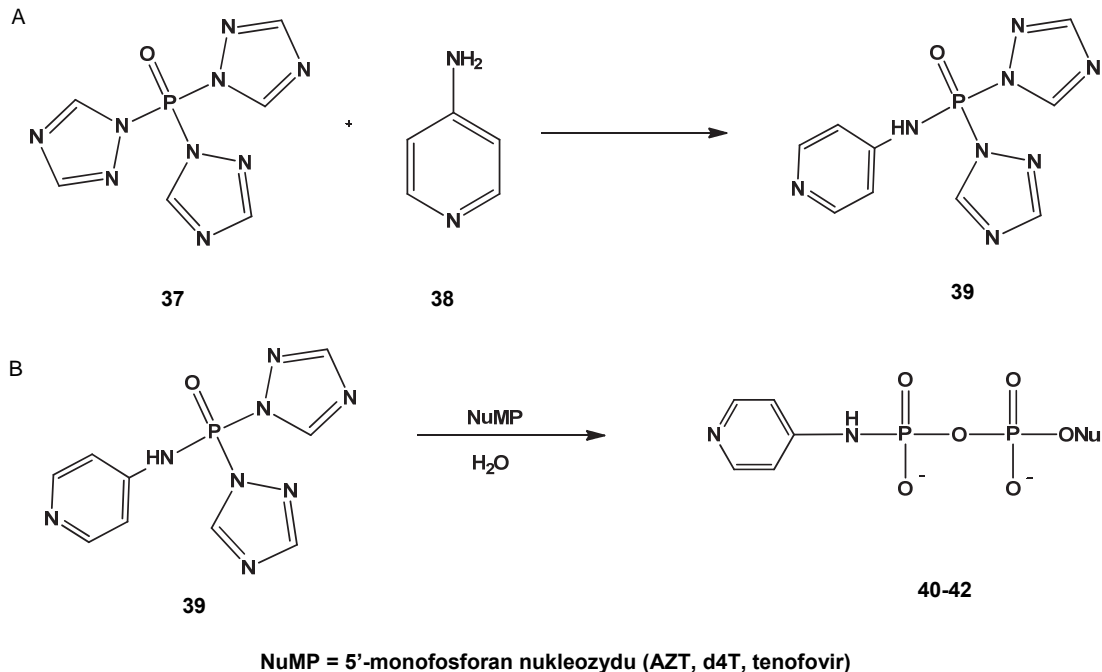
W ostatnim czasie na szczególną uwagę zasługują otrzymane przez Kraszewskiego i współpr. *N*-aryloamidofosforanowe pochodne AZT. Wszystkie te związki wykazywały bardzo wysoki potencjał antywirusowy, spośród których pochodna 4-aminopirydynylova (Rys. 15-36) posiadała zarówno bardzo wysoką aktywność przeciwwirusową (EC₅₀ = 0,0011 μM), jak i bardzo niską cytotoksyczność (CC₅₀ >> 200 μM) [9].



Nu = nukleozyd

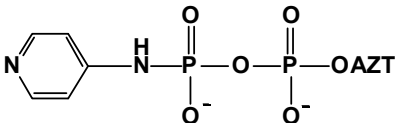
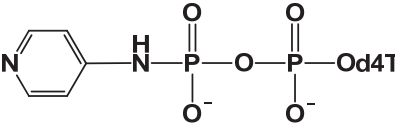
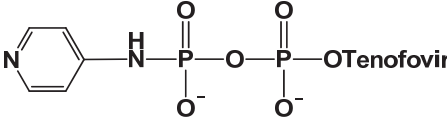
Rys. 15. Pochodna 4-aminopirydylowa amidofosforanu diestru

Te zachęcające wyniki badań stały się przesłanką, aby zaprojektować pierwsze nukleozydo-5'-difosforany, w których zastosowano 4-aminopirydynylowe grupy maskujące (Rys. 16-**40-42**). Wykorzystano w tym celu tristriazolid fosforu **37**, który w reakcji z równomolową ilością 4-aminopirydyny **38** w dioksanie, w temperaturze pokojowej prowadził do produktu **39** (Rys. 16-A) [9]. Otrzymany ditriazolido-4-pirydynyloamidofosforan został następnie z powodzeniem zastosowany jako czynnik fosforylujący 5'-monofosforany (AZTMP, d4TMP oraz tenofovir), co w konsekwencji prowadziło do otrzymania nukleozydo-5'-difosforanów **40-42** (Rys. 16-B).



Rys. 16. Otrzymywanie pochodnych 4-aminopirydylowych nukleozydo-5'-difosforanów

Tabela 1. Wyniki aktywności antywirusowej pochodnych 4-aminopirydylowych nukleozydo-5'-difosforanów

Związek	EC ₅₀ [μM]	CC ₅₀ [μM]	SI ₅₀
	< 0,01	> 356	35 600
	0,12	> 71	592
	2,3	> 92	40

Badania wykonała A. Dąbrowska w Narodowym Instytucie Leków.

Zbadano aktywność biologiczną otrzymanych związków, a wyniki tych badań zamieszczono w Tab. 1.

Wszystkie otrzymane pochodne 4-aminopirydynylowe nukleozydo-5'-difosforanów posiadają aktywność antywirusową, spośród których najwyższy potencjał anti-HIV posiada pochodna AZT. Uderzającą właściwością tego związku jest jego bardzo niska cytotoksyczność i wysoki indeks selektywności, co z pewnością czyni ten związek dobrym kandydatem na pronukleotyd anti-HIV.

Niestety badając, za pomocą HPLC, drogi rozpadu w kulturach komórkowych [RPMI/FBS 9:1 (v/v), 37°C] otrzymanych związków stwierdzono, że substancje te nie generują oczekiwanych nukleozydo-5'-difosforanów. Jednak rozpad otrzymanych 4-aminopirydynylowych nukleozydo-5'-difosforanów prowadzi do uwolnienia nukleozydo-5'-monofosforanu, co potwierdza pronukleotydowy mechanizm działania zaprojektowanych związków.

4. Perspektywy

Synteza kolejnej generacji pronukleotydów anti-HIV – nukleozydo-5'-difosforanów – stanowi duże wyzwanie – projektowane związki muszą spełniać nie tylko liczne kryteria stawiane pronukleotydowi, ale również dostarczać w wyniku hydrolizy (chemicznej lub/i enzymatycznej) do komórek nukleozydo-5'-difosforan. Prace nad syntezą nukleozydo-5'-

-difosforanów posiadających różne lipofilowe grupy maskujące, projektowane jako potencjalne pronukleotydy anty-HIV, są nadal przedmiotem intensywnych badań licznych laboratoriów na świecie.

Literatura

- [1] Romanowska J. (2009) *Synteza i niektóre właściwości arylnukleozydofosforanów i ich analogów jako nowych, potencjalnych pronukleotydów anty-HIV*, rozpr. dokt., PAN, Poznań.
- [2] De Clercq E. (2004) Anti-HIV chemotherapy: current state of the art, *Med. Chem. Res.* 13, 6/7, 439–478.
- [3] Balzarini J. (1994) Metabolism and mechanism of antiretroviral action of purine and pyrimidine derivatives, *Pharm. World Sci.* 16, 113–126.
- [4] Cretton E.M., Xie M.-Y., Bevan R.J., Goudgaon N.M., Schinazi R.F., Sommadossi J.P. (1991) Catabolism of 3'-azido-3'-deoxythymidine in hepatocytes and liver microsomes, with evidence of formation of 3'-amino-3'-deoxythymidine, a highly toxic catabolite for human bone marrow cells, *Mol. Pharm.* 39, 258–266.
- [5] De Miranda P., Good S.S. (1992) Species differences in the metabolism and disposition of antiviral nucleoside analogues: 2. Zidovudine, *Antiv. Chem. & Chemoth.* 3 (2), 65–77.
- [6] Hao Z., Cooney D.A., Farquhar D., Perno C.F., Zhang K., Masood R., Wilson W., Hartman N.R., Balzarini J., Johns D.G. (1990) Potent DNA chain termination activity and selective inhibition of human immunodeficiency virus reverse transcriptase by 2',3'-dideoxyuridine-5'-triphosphate, *Mol. Pharmacol.* 37, 157–163.
- [7] Ho H.T., Hitchcock M.J.M. (1989) Cellular pharmacology of 2',3'-dideoxy-2',3'-dideoxythymidine, a nucleoside analog active against human immunodeficiency virus, *Antimicrob. Agents Chemother.* 33, 844–849.
- [8] Meier C. (1998) Pro-Nucleotides – Recent Advances in the Design of Efficient Tools for the Delivery of Biologically Active Nucleoside Monophosphates, *Synlett* 3, 233–242.
- [9] Romanowska J., Sobkowski M., Szymańska-Michałak A., Kołodziej K., Dąbrowska A., Lipniacki A., Piasek A., Pietrusiewicz Z.M., Figlerowicz M., Guranowski A., Boryski J., Stawiński J., Kraszewski A. (2011) Aryl *H*-Phosphonates 17: (N-Aryl)phosphoramidates of Pyrimidine Nucleoside Analogues and Their Synthesis, Selected Properties, and Anti-HIV Activity, *J. Med. Chem.* 54, 6482–6491.
- [10] Antoniou T., Park-Wyllie L.Y., Tseng A.L. (2003) Tenofovir: A Nucleotide Analog for the Management of Human Immunodeficiency Virus Infection, *Pharmacotherapy* 1, 29–43.
- [11] Piosik M., Gołbiewska J., Romanowska J. (2014) Strategie w projektowaniu pronukleotydów anty-HIV, w: *Na pograniczu chemii i biologii*, red. H. Koroniak, J. Barciszewski, Wyd. Nauk. UAM, Poznań, tom XXXII, 81–106.
- [12] Hostetler K.Y., Stuhmiller L.M., Lenting H.B.M., van den Bosch H., Richman D.D. (1990) Synthesis and antiretroviral activity of phospholipid analogs of azidothymidine and other antiviral nucleosides, *J. Biol. Chem.* 265, 6112–6117.
- [13] Bonnaffe D., Dupraz B., Ughetto-Monfrin J., Namane A., Huynh Dinh T. (1995) Synthesis of acyl pyrophosphates. Application to the synthesis of nucleotide lipophilic prodrugs, *Tetrahedron Letters* 36, 4, 531–534.
- [14] Weinschenk L., Schols D., Balzarini J., Meier Ch. (2015) Nucleoside diphosphates prodrugs: nonsymmetric DiPPro-Nucleotides, *J. Med. Chem.* 58, 6114–6130.

KATELICYDINY – NATURALNE ANTYBIOTYKI PEPTYDOWE

SZYMON KOWALSKI, IWONA INKIELEWICZ-STĘPNIAK

Katedra i Zakład Chemii Medycznej, Gdański Uniwersytet Medyczny
ul. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk
e-mail: szymon.kowalski2707@gmail.com; iinkiel@gumed.edu.pl

Hasła do zapamiętania: katelicydiny, naturalne antybiotyki, propeptyd, układ odpornościowy, aktywność przeciwdrobnoustrojowa, oporność bakterii

Wykaz skrótów:

AMPs	– peptydy przeciwdrobnoustrojowe (ang. <i>antibiotic peptides</i>)
CD14	– antygen różnicowania komórkowego 14 (ang. <i>cluster of differentiation 14</i>)
cDNA	– komplementarny DNA (ang. <i>complementary DNA</i>)
LPS	– lipopolisacharyd (ang. <i>lipopolysaccharide</i>)
NMR	– spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (ang. <i>nuclear magnetic resonance</i>)
PAGE	– elektroforeza w żelu poliakrylamidowym (ang. <i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
RSV	– wirus syncytialny nabłonka oddechowego (ang. <i>respiratory syncytial virus</i>)
VV	– wirus ospy (ang. <i>vaccinia virus</i>)

1. Wstęp

Ziemia jest planetą zdominowaną przez mikroorganizmy. Są one w stanie przeżyć w tak ekstremalnych warunkach, jak gorące gejzery Parku Yellowstone czy lodowate wody u wybrzeży Antarktydy. W związku z tym, wyższe organizmy eukariotyczne narażone są na nieustanny kontakt z drobnoustrojami. Pomimo to potrafią one żyć w pełnej harmonii z otaczającymi je bakteriami, wirusami czy grzybami. Zawdzięczają to

skutecznym sposobom obrony, które w toku ewolucji ulegały znacznym modyfikacjom i udoskonaleniom.

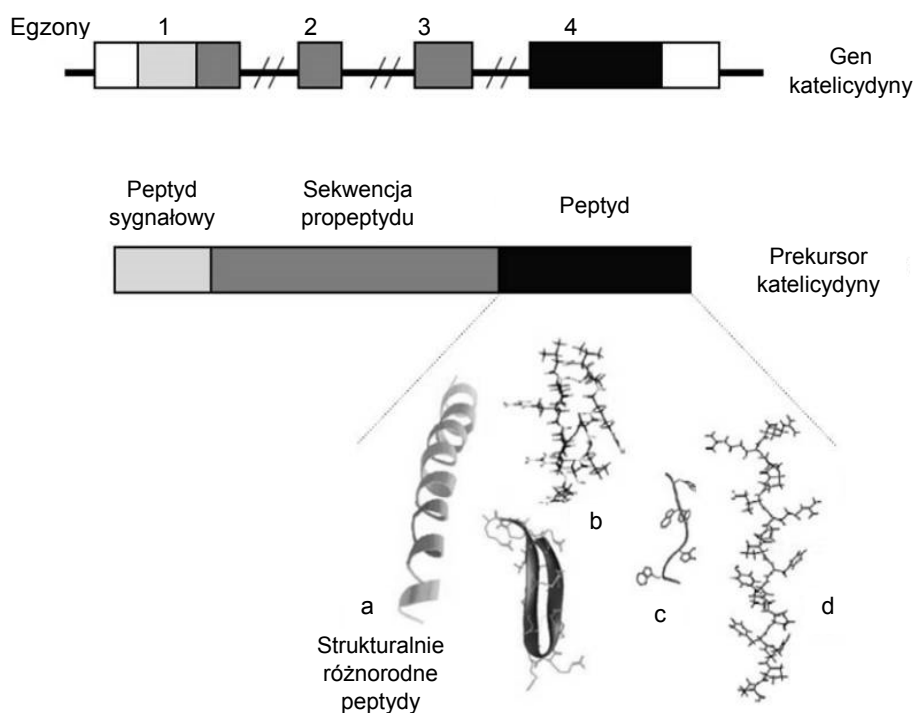
We wczesnym etapie infekcji, mechanizm obronny gospodarza wykorzystuje różnice strukturalne i funkcjonalne pomiędzy patogenem a organizmem zainfekowanym. Różnice te czynią drobnoustroj selektywnie wrażliwym na przeciwdrobnoustrojowe substancje wytwarzane przez organizm gospodarza, takie jak: reaktywne utleniacze, enzymy lityczne, cząsteczki formujące pory czy molekuly wiążące się z substancjami odżywczymi, niezbędnymi dla mikroorganizmu. Jedną z grup substancji wytwarzanych przez organizmy kręgowców, bezkręgowców i roślin są przeciwdrobnoustrojowe peptydy (AMPs). Umownie są one definiowane jako polipeptydowe substancje, kodowane przez geny, syntetyzowane na rybosomach i składające się z poniżej 100 reszt aminokwasowych. Ta definicja pozwala odróżnić je od większości antybiotyków peptydowych produkowanych przez bakterie i grzyby, których synteza odbywa się poprzez specjalne szlaki metaboliczne i które często składają się z aminokwasów niebiałkowych. Jedną z głównych grup peptydów przeciwdrobnoustrojowych są katelicydyny.

2. Genetyka i budowa chemiczna katelicydyny

Katelicydyny zostały odkryte podczas badania aktywności przeciwdrobnoustrojowej lizatów bydłych neutrofilii [1]. Wraz z kolejnymi badaniami katelicydyny zostały odkryte u królika [2], człowieka [3], owcy [4], myszy [5], konia [6] oraz u wielu innych gatunków ssaków, w tym ostatnio u psa [7]. Ich obecność stwierdzono również u takich organizmów, jak krab czy losoś atlantycki [8].

Katelicydyny są syntetyzowane oraz przechowywane w komórkach, w postaci propeptydu. Składa się on z około 30-aminokwasowej sekwencji sygnałowej, 94–144-aminokwasowej domeny katelinowej oraz 12–100-aminokwasowego peptydu właściwego. Geny katelicydyn zbudowane są z czterech egzonów. Pierwsze trzy z nich odpowiadają peptydowi sygnałowemu, natomiast ostatni koduje właściwy peptyd o aktywności przeciwdrobnoustrojowej. Generalnie region 5' jest znacznie bardziej konserwatywny w stosunku do sekwencji kodującej aktywny peptyd, zarówno dla odcinków eksonowych, jak i intronowych. Konserwatywna struktura organizacji genów i wysokie podobieństwo sekwencyjne regionów 5' wspierają teorię, że wszystkie ssące katelicydyny powstały z tego samego prekursora genu. Kolejnym dowodem na wspólne pochodzenie jest sąsiednia lokalizacja genów na chromosomie owiec i świń. Klaster jedenastu genów

katelicydyn na tym samym regionie bydłęcego chromosomu 22q24 wyznacza w ten sposób locus, które zostało nazwane CATHL@. Klaster ośmiu genów katelicydyn został zmapowany na owczym chromosomie 19. Liczba różnych genów katelicydyn świni i cDNA wskazuje, że są one porównywalne wielkością z genami bydła. Uderzającym zaskoczeniem jest fakt, że ludzie posiadają tylko jeden gen katelicydyny (CAMP), który zlokalizowany jest na trzecim chromosomie. Jest on homologiczny do mysiego chromosomu 9 i świńskiego chromosomu 13, które zawierają kolejno gen mCRAMP i PR-39 [9] (Rys. 1).



Rys. 1. Schematyczne przedstawienie budowy genu i peptydu katelicydyn. Dojrzałe peptydy obejmują struktury α -helikalne (a), struktury bogate w cysteinę (b), tryptofan (c) i prolinę (d) [9]

Cząsteczki katelicydyn można podzielić na dwie części: koniec N zawierający domenę „kateliny” oraz koniec C odpowiedzialny za aktywność biologiczną. Sekwencja końca N wykazuje dużą konserwatywność międzygatunkową w przeciwieństwie do wysoce zmiennej sekwencji końca C [10]. Katelicydyny stanowią zarówno cząsteczki liniowe, jak i cykliczne. Róż-

norodność pod względem wielkości cząsteczek i składu sekwencji w obrębie katelicydyn jest znacznie większa niż w innych rodzinach peptydów przeciwdrobnoustrojowych. W katelicydynach stwierdzono obecność trzeciorzędowych struktur, takich jak α -helisa czy β -kartka, z których niektóre bogate są w prolinę, tryptofan lub cysteinę [10]. Najbardziej powszechne są liniowe peptydy zawierające strukturę α -helikalną. Występują w niemal każdym organizmie ssaczym, posiadając od 23 do 40 reszt aminokwasowych. Peptydy te jednak różnią się od α -helikalnych peptydów owadów, płazów czy ryb [11]. Inne liniowe katelicydyny zawierają w swojej strukturze peptyd, indolicydynę, która składa się z 13 reszt aminokwasowych, zawierających 3 regularnie rozmieszczone reszty proliny i znaczne ilości tryptofanu. Pozostałą część tego typu katelicydyn stanowi sekwencja bogata w prolinę, zawierająca od 39 do 80 reszt aminokwasowych. Sposoby rozmieszczenia proliny są różne w poszczególnych peptydach – tworzą powtarzalne motywy. Przykładem katelicydyn charakteryzujących się tego typu budową są: PR-39, Bac5, Bac7. Badania strukturalne PR-39 i Bac5 odkryły poliprolinową helisę, która prawdopodobnie jest czynną biologicznie konformacją tych peptydów [9]. Cykliczne katelicydyny obejmują protegryny i dodekapeptyd. Protegryny są grupą 5 peptydów o wielkości 16–18 reszt aminokwasowych. Charakteryzują się dwoma wewnętrznymi mostkami disulfidowymi oraz amidowym końcem C. Spektroskopia NMR protegryny PG-1 wykazała obecność dwuniciowej, antyrównoległej β -kartki. W obrębie struktury można wyróżnić centralny obszar hydrofobowy oraz dwa hydrofilowe końce. Dodekapeptyd zawiera dwie reszty cysteiny. Przypuszczano, że w strukturze obecna jest pętla składająca się z 12 reszt aminokwasowych stabilizowana przez mostek disulfidowy, jednak spektroskopia mas i SDS-PAGE wykazały powstawanie dipeptydu stabilizowanego poprzez międzycząsteczkowe wiązanie disulfidowe [9, 12].

3. Rola i występowanie

Przeciwdrobnoustrojowe peptydy, do których zalicza się katelicydyny, stanowią ważny element wrodzonego układu odpornościowego. Pełnią one rolę cząsteczek efektorowych, służąc jako pierwsza linia obrony przed mikroorganizmami na powierzchni skóry, nabłonka wyściełającego jelita oraz nabłonka układu oddechowego. Biosynteza AMPs odbywa się w krążących leukocytach. Stanowią one główne komórki efektorowe wrodzonej odpowiedzi immunologicznej. Ponadto synteza przeciwdrobn-

ustrojowych peptydów odbywa się w komórkach skóry i nabłonka układu oddechowego, dróg moczowo-płciowych i przewodu pokarmowego. Organizm ludzki już w okresie płodowym chroniony jest przez AMPs, które obecne są w mazi płodowej i płynie owodniowym [13]. Większość prac badawczych została poświęcona badaniom ekspresji jedynej ludzkiej katelicydyny LL-37. Wykazano wysoki poziom mRNA w komórkach nabłonkowych gruczołów podśluzówkowych i dróg oddechowych oraz obecność peptydu LL-37 w płynie płucnym [14]. Inne badania potwierdziły obecność tego peptydu w jamie ustnej [15]. Istnieją również dowody na zaangażowanie ludzkiej katelicydyny w męskim układzie rozrodczym. Została ona wykryta w osoczu nasienia w wysokich stężeniach (ok. 86,5 mg/ml) oraz wykazano jej powinowactwo do plemników [16]. Ostatnie badania dowodzą jej obecności w nabłonku spojówki i rogówki, gdzie stanowi część wrodzonego mechanizmu obronnego oka przed patogenami [17].

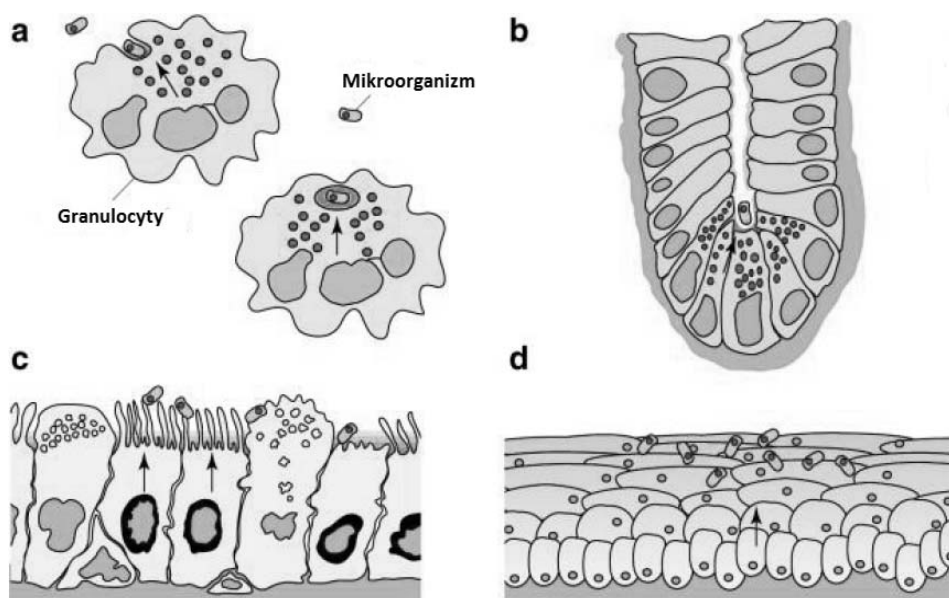
Biosynteza katelicydyn odbywa się przede wszystkim w ziarnistościach swoistych neutrofilii i tam też są przechowywane. Ludzka katelicydyna hCAP-18 (będąca propeptydem katelicydyny LL-37) obecna jest również w komórkach złuszczonego nabłonka, plazmie nasiennej, w najądrzach, a także w keratynocytach podczas stanów zapalnych skóry oraz subpopulacjach monocytów i limfocytów [18, 19]. Dojrzałe peptydy są uwalniane z propeptydu za pomocą enzymów: elastazy i proteinazy 3. Nieaktywne katelicydyny przechowywane są w wydzielniczych granulach. Podczas fagocytozy następuje ich fuzja z granulami zawierającymi elastazy, powodując wytworzenie aktywnych cząstek. Następnie aktywne peptydy przedostają się do wakuoli powstałej we wnętrzu granulocytu w wyniku pochłonięcia patogenu. Niewykorzystane cząsteczki są wydzielane na zewnątrz komórki do cieczy międzykomórkowej, gdzie dalej zabijają mikroorganizmy chorobotwórcze lub hamują ich wzrost [20, 21].

Wiele peptydów przeciwdrobnoustrojowych roślin i bezkręgowców przypomina zarówno strukturą, jak i funkcją swoje odpowiedniki w organizmach kręgowców. Rośliny, jak i bezkręgowce indukują syntezę AMPs w odpowiedzi na infekcję. Ścieżki sygnalizacyjne, które pośredniczą w tej odpowiedzi, są podobne do ostrej fazy odpowiedzi u wyższych organizmów eukariotycznych. Stosują również podobne regulatory transkrypcyjne. U kręgowców synteza jest albo konstytutywna albo indukowana przez makrocząsteczki pochodzenia mikrobiologicznego oraz cytokiny [21]. Podobnie jak u kręgowców, również u owadów nabłonek jelitowy i inne nabłonki okrywające wydzielają AMPs [22]. W roślinach peptydy przeciwdrobnoustrojowe występują w nasionach, z których uwalniane są w procesie kiełkowania, a także w liściach i innych strukturach [23].

Oprócz właściwości przeciwdrobnoustrojowych, katelicydyny wykazują szereg innych aktywności. Owcza katelicydyna SMAP29 wiąże się z cząsteczką LPS, a także posiada możliwość wiązania innych endotoksyn i zapobiegania endotoksemii. Właściwości te wykazano na szczurzych modelach [24]. Stwierdzono również, że świński peptyd bogaty w prolinę, PR-39, działa kardioprotekcyjnie w stosunku do szczurów z uszkodzonym układem sercowo-naczyniowym [25]. Inna świńska katelicydyna, protegryna-1, okazała się ważna w procesie gojenia ran na modelu świńskiej skóry [26]. Wysokie stężenie ludzkiego peptydu przeciwdrobnoustrojowego, LL-37, wykazano na ranie skórnej, z maksymalnym stężeniem po 48 godzinach [27]. W przeprowadzonych badaniach stwierdzono również, że katelicydyny działają chemotaktycznie na neutrofile i komórki T, powodują degranulację mastocytów i uwalnianie histaminy, aktywują komórki dendrytyczne, hamują oksydazę neutrofilei, a także uczestniczą w naprawie uszkodzeń i działają proangiogennie [20]. Badając mechanizm neutralizacji endotoksyn przez katelicydyny CAP18 i CAP11, przeprowadzone na modelach zwierzęcych i liniach komórkowych, można wywnioskować, że peptydy te blokują wiązanie LPS z komórkami CD14+, co skutkuje zahamowaniem wytwarzania cytokin przez te komórki [28].

Większość bakterii w przewodzie pokarmowym człowieka to komensale, jednak układ pokarmowy narażony jest na nieustanne ataki ze strony patogenów dostarczanych wraz z zanieczyszczonym pożywieniem. Nabłonek śluzówki jelita cienkiego, który posiada znaczne ilości kosmków i krypt, jest idealnym miejscem do wnikania mikroorganizmów chorobotwórczych. Komórki nabłonkowe jelita, do których zaliczamy komórki kubkowe, enterocyty oraz komórki nabłonkowe tworzące podstawę krypt Lieberkuhna (zwane również komórkami Panetha), odgrywają istotną rolę w ochronie przed czynnikami chorobotwórczymi. Komórki Panetha poprzez wydzielanie peptydów przeciwdrobnoustrojowych uczestniczą w ochronie komórek pnia krypt. Kontrolują również rodzaj i liczbę bakterii komensalnych, a także wykrywają patogeny oraz uczestniczą w odpowiedzi immunologicznej [29]. Katelicydyny odgrywają bardzo istotną rolę podczas procesu gojenia ran w przewodzie pokarmowym, a dokładniej w procesie naprawy uszkodzonej śluzówki. Stwierdzono silną ekspresję ludzkiej katelicydyny LL-37 i mysiej mCRAMP podczas gojenia się uszkodzonego nabłonka u ludzi i myszy. Indukcja angiogenezy przez te peptydy podkreśla ich potencjalną rolę w procesie regeneracji uszkodzonej tkanki [30]. W tym kontekście zasugerowano, że mechanizm gojenia, powodowany przez te peptydy, może zachodzić poprzez modyfikację czynnika wzrostu i interakcję z receptorem, chociaż pełny mechanizm działa-

nia, za pomocą którego katelicydyny uczestniczą w tym procesie, nie został wyjaśniony. Ostatnie badania pokazują, że szczurza katelicydyna wspomaga gojenie wrzodów żołądka u szczurów poprzez indukcję proliferacji komórek i angiogenezy. Sam peptyd stymuluje komórki nabłonkowe żołądka hodowane *in vitro* poprzez transaktywację α -zależnego nabłonkowego czynnika wzrostu, który jest powiązany ze szlakiem indukującym proliferację komórek żołądka [31]. Kolejną cechą katelicydyn jest zdolność modulowania stanu zapalnego tkanki poprzez zmianę odpowiedzi cytokin i chemotaksję komórek zapalnych w chorych tkankach. Najnowsze badania na modelu mysim wykazały, że bakteryjne DNA podwyższają poziom ekspresji peptydów przeciwdrobnoustrojowych poprzez receptor Toll-podobny oraz aktywację mitogenem kinaz białkowych w śluzówce okrężnicy [32] (Rys. 2).



Rys. 2. Regulacja syntezy i uwalniania peptydów przeciwdrobnoustrojowych. (a) W komórkach fagocytarnych, takich jak granulocyty, granulki z AMP uwalniają swoją zawartość do wakuoli, które zawierają mikroorganizmy. (b) Komórki jelit Panetha i inne komórki nabłonka jelit bogate w granulki; wydzielanie granulek odbywa się przez bodźce nerwowe lub specyficzne cząsteczki drobnoustrojów. (c) W komórkach nabłonka, które nie zawierają granulek, ale są zdolne do syntezy i wydzielania konstytutywnego albo indukowanego przez bodźce zapalne za pośrednictwem czynnika jądrowego kB. (d) W niewydzielniczych komórkach nabłonka stanowiącego barierę mechaniczną. Peptydy po syntezie akumulowane są wewnątrz komórki i uwalniane konstytutywnie lub w wyniku stymulacji cytokinami i makrocząsteczkami drobnoustrojów [21]

4. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa

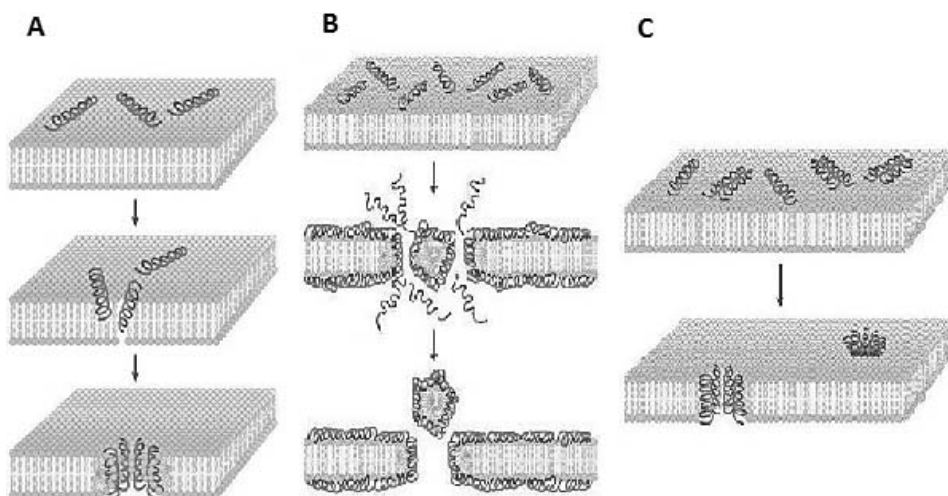
Zdolność katelicydyn do hamowania wzrostu drobnoustrojów jest ich najważniejszą funkcją. Testy przesiewowe są stosowane do identyfikacji katelicydyn z takich próbek biologicznych, jak: wysięk z rany czy płyn powstały w wyniku płukania płuc. Peptydy są izolowane za pomocą metod chromatograficznych, a uzyskane frakcje badane są na aktywność przeciwdrobnoustrojową. Podczas testów *in vitro* większość peptydów powodowała szybkie zabijanie szerokiego spectrum mikroorganizmów w mikromolowych i submikromolowych stężeniach [9]. Z badań przy użyciu skaningowej i transmisyjnej mikroskopii elektronowej wynika, że katelicydyny królika CAP18 oraz owcy SMAP29 zabijają bakterię *Pseudomonas aureginosa* przy stężeniu peptydu 10 µg/ml w ciągu 15–90 minut [33].

Istnieją jednak pewne ograniczenia w porównywaniu aktywności przeciwdrobnoustrojowej *in vitro* z właściwościami antybiotycznymi *in vivo*. Peptydy przeciwdrobnoustrojowe reprezentują jedynie pojedynczy element złożonej sieci biologicznej, uczestniczącej w obronie organizmu gospodarza i regulacji komórkowej. Badania przesiewowe brały jedynie pod uwagę aktywność pojedynczych cząsteczek, podczas gdy kilka rodzajów peptydów i innych substancji biologicznych może współpracować w celu zwiększenia aktywności przeciwmikrobiologicznej. Jest coraz więcej dowodów wskazujących na działanie synergistyczne AMPs z większymi polipeptydami, których aktywność przeciwdrobnoustrojowa związana jest z działaniem enzymatycznym (np. lizozym) lub których aktywność zależy od obecności makrocząsteczek bakteryjnych [34]. Zaobserwowano również synergistyczne oddziaływanie dwóch AMPs pochodzących ze skóry żaby [35]. Z tego powodu wyniki uzyskane *in vitro* mogą mieć tylko częściowe znaczenie dla stwierdzenia aktywności tych cząstek do zabijania mikroorganizmów *in vivo*. Znajomość mikrośrodków, w których występują katelicydyny, jest niezbędna do zrozumienia ich aktywności w środowisku biologicznym. Peptydy przeciwdrobnoustrojowe, w tym katelicydyny, wykazują działanie przeciwdrobnoustrojowe wobec bakterii Gram-ujemnych i Gram-dodatnich, drożdży, grzybów oraz pewnych wirusów i pierwotniaków. Nawet drobne modyfikacje struktury peptydów mogą znacznie wpływać na ich aktywność, dlatego bardzo istotnym elementem dalszych badań jest poznanie zależności pomiędzy strukturą a działaniem tej klasy związków [21].

Ogólna zasada działania katelicydyn, podobnie jak i innych peptydów przeciwdrobnoustrojowych, polega na dezintegracji błony komórkowej drobnoustrojów, wobec których peptydy te są aktywne. AMPs nie działają

natomiast na komórki gospodarza. Zjawisko to można wyjaśnić analizując budowę błon komórkowych gospodarza i drobnoustrojów. Większość fosfolipidów tworzących błonę komórkową patogennych mikroorganizmów ma charakter kwaśny, w przeciwieństwie do katelicydyn, które stanowią kationowe peptydy, tak jak pozostałe AMPs. Oddziaływania elektrostatyczne pomiędzy katelicydynami a ujemnie naładowanymi fosfolipidami błony komórkowej mikroorganizmu umożliwiają ścisłe, równoległe przyleganie peptydów przeciwdrobnoustrojowych oraz zakotwiczenie ich w błonie komórkowej, a także neutralizację ładunku błony.

Kolejnym etapem po przyłączeniu peptydu do błony jest zmiana struktury drugo- i trzeciorzędowej peptydu. Zmienia on orientację względem błony na prostopadłą i wbudowuje się w dwuwarstwę lipidową, tworząc transmembranowy kanał. Mechanizm ten znany jest jako model tworzenia „toroidalnych porów” [36]. W przypadku bakterii Gram-ujemnych, peptyd jest w stanie przeniknąć przez błonę zewnętrzną. Model „toroidalnych porów” jest tylko jednym z prawdopodobnych mechanizmów działania katelicydyn. Badania pojedynczych peptydów wskazują na heterogenność oddziaływań z błonami komórkowymi. Innym mechanizmem oddziaływania jest model „klepek beczki” (ang. *barrel stave*) [37]. W mechanizmie tym peptydy gromadzą się na kształt „klepek beczki”. Niepolarne części wyścielają lipidy błony, natomiast hydrofilowa wewnętrzna powierzchnia tworzy szczelinę. Kolejnym mechanizmem jest model dywanowy [38]. W przypadku tego modelu peptydy nie wbudowują się



Rys. 3. Model toroidalnych porów (A), model dywanowy (B) i model „klepek beczki” (ang. *barrel stave*) (C) jako mechanizmy działania przeciwdrobnoustrojowego katelicydyn [10]

w dwuwarstwą lipidową lecz pozostają w konformacji równoległej do błony komórkowej, pokrywając szczelnie jej powierzchnię. W wyniku nacisku peptydów na błonę dochodzi do załamania jej konstrukcji i wyciekania składników cytoplazmy. Wszystkie przedstawione mechanizmy wywołują podobny efekt: uszkodzenie błony, jej dezintegrację oraz depolaryzację. Końcowym efektem jest śmierć drobnoustroju [39] (Rys. 3).

Jak pokazują ostatnie badania, istnieją również inne mechanizmy działania przeciwdrobnoustrojowego oprócz fizycznej dezintegracji błony komórkowej. Związane są one z działaniem wewnątrzkomórkowym, takim jak: hamowanie syntezy ścian komórkowych i białek, hamowanie aktywności enzymów oraz wiązanie kwasów nukleinowych [40]. Jako przykład mogą posłużyć katelicydyny: PR-39, PR-26 i indolicydyna. Mają one wpływ na syntezę białek drobnoustroju. Indukują degradację niektórych białek koniecznych do replikacji DNA patogennych drobnoustrojów [33].

Mechanizm leżący u podstaw działania przeciwwirusowego katelicydyn pozostaje w dużej mierze nieznany. Z badań przeprowadzonych na wirusach VV i RSV wynika, że peptydy oddziałują bezpośrednio z wirusem [41, 42], jednak wpływ na wirusy bezotoczkowe wskazuje na dodatkowe mechanizmy działania. Interesujący jest fakt, że działanie przeciwwirusowe zaobserwowano również, gdy komórki były traktowane aktywnym peptydem, który został usunięty przed infekcją wirusem. Efekt ten może sugerować, że w wyniku kontaktu komórek z katelicydyną nastąpiła indukcja stanu przeciwwirusowego wynikająca z immunostymulujących właściwości badanych peptydów [43]. Stwierdzono, że proteoglikany, a w szczególności siarczan heparanu, które mają charakter anionowy i występują na powierzchni komórek, biorą udział w adhezji niektórych wirusów do komórek gospodarza [44]. Peptydy przeciwdrobnoustrojowe, które są obdarzone ładunkiem dodatnim, na zasadzie oddziaływań elektrostatycznych i kompetycji blokują wiązanie wirusów z powierzchnią komórki docelowej. Stwierdzono m.in., że ludzka katelicydyna LL-37 wiąże się z proteoglikanami, hamując przyłączenie się wirusa do komórki gospodarza [45].

Inne badania stwierdzają odmienny mechanizm działania przeciwwirusowego. Niektóre peptydy w sposób bezpośredni wiążą się z otoczką wirusa, powodując jej zniszczenie, analogicznie do niszczenia błony komórkowej bakterii. Kolejnym mechanizmem jest regulowanie aktywności szlaków sygnałowych oraz wpływ na ekspresję genów zarówno wirusowych, jak i komórkowych. Mechanizm ten może potwierdzać fakt, iż stwierdzono m.in. dla LL-37, że jest ona w stanie przenikać przez błonę komórkową, jak i przez błonę jądrową [46].

5. Mechanizm oporności

Rozwój oporności bakterii na peptydy przeciwdrobnoustrojowe, w tym na katelicydyny, jest zjawiskiem stosunkowo rzadkim. Opisano kilka mechanizmów, które są odpowiedzialne za zjawisko oporności [47]. Wzrost zawartości fosfatydylocholiny w ścianie komórkowej *Haemophilus influenzae* spowodował zmniejszoną podatność na działanie ludzkiej katelicydyny LL-37 [48]. Celem takiej modyfikacji jest zmiana ładunku netto ściany komórkowej bakterii, a mianowicie zmiana anionowych składników na cząsteczki kationowe. *Pseudomonas aeruginosa* jest w stanie zmienić strukturę lipopolisacharydów przymocowanych do zewnętrznej błony. Ta modyfikacja endotoksyny, jaką jest LPS, zmniejsza wrażliwość tych bakterii na peptydy przeciwdrobnoustrojowe [49]. Zmiana ładunku ściany komórkowej bakterii Gram-ujemnych zachodzi również w wyniku acylacji lipidu A lipopolisacharydu. Związana z tym oporność na katelicydyny spowodowana jest przez redukcję płynności błony zewnętrznej, co skutkuje zwiększeniem oddziaływań hydrofobowych między wzrastającą liczbą acylowanych cząsteczek lipidu A [50].

W przypadku bakterii Gram-dodatnich, takich jak np. *Staphylococcus aureus*, zmiana ładunku ściany komórkowej odbywa się poprzez wbudowywanie D-alaniny do kwasów lipoteichojowych lub L-lizyny do fosfatydyloglicerolu [51]. Ponadto *S. aureus* jest w stanie wytwarzać stafylokinazy (serynowe proteinyazy), które uwalniają AMP z leukocytów, a następnie wiążą się z nimi, tworząc kompleksy, czego skutkiem jest całkowita neutralizacja peptydów [52]. Szczepy *Staphylococcus*, które wytwarzają metaloproteinazę (zwaną aureolizyną), są mniej wrażliwe na działanie ludzkiej katelicydyny LL-37 [52]. Niektóre szczepy, takie jak *Klebsiella pneumoniae*, wytwarzają otoczki polisacharydowe, które chronią je przed działaniem peptydów przeciwdrobnoustrojowych [20].

Kolejnym przykładem oporności jest mechanizm wytworzony przez bakterie *Yersinia enterocolitica*. Dotyczy on zmiany wytwarzania białek błony zewnętrznej i jest związany z obecnością plazmidu [33]. *Neisseria gonorrhoeae* wykorzystuje pompy transportowe (wyrzutowe) powodujące usuwanie katelicydyn, unikając przez to gromadzenia się tego peptydu wewnątrz komórki bakteryjnej [53]. Inne szczepy, takie jak *Proteus mirabilis* czy *Streptococcus pyogenes*, zawierają proteazy, które mają zdolność degradacji katelicydyny LL-37 [54]. Natomiast pozakomórkowe proteazy uwalniane przez *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* i *Streptococcus faecalis* degradują w ludzkim organizmie proteoglikany macierzy zewnątrzkomórkowej. Powoduje to uwalnianie polianionowej cząsteczki siarczanu dermatanu, która ma zdolność hamowania aktywności

ności AMPs [55]. *Shigella* stosuje swoistą strategię, która polega na obniżeniu wytwarzania LL-37 już na poziomie mRNA w komórkach nabłonkowych okrężnicy [56]. Dla niektórych wymienionych patogenów odkryto mutanty izogeniczne, które wykazują *in vitro* zwiększoną wrażliwość na katelicydyny w porównaniu z dzikimi szczepami rodzicielskimi. Badania tych mutantów na modelach zwierzęcych dostarczyły wyników, które sugerują, że jedynie sama oporność na katelicydyny przyczynia się do zjadliwości szczepów. Mutanty Dlt⁻ i MprF⁻, będące mutantami *S. aureus*, które nie posiadają w ścianie komórkowej D-alaniny i L-lizyny, są bardziej podatne na działanie katelicydyn *in vitro*. Oba mutanty są łatwiej fagocytowane przez neutrofile i są mniej zdolne do wywołania infekcji u myszy [57]. Jedno z badań zjadliwości *Streptococcus pyogenes* przedstawiło problem z innej perspektywy. Bakterie te są zwykle wrażliwe na ludzką katelicydynę LL-37 i myszą CRAMP, jednak mutanty odporne można otrzymać w wyniku działania odpowiednimi dawkami peptydów. Po podskórnym podaniu mysim modelom opornych mutantów *S. pyogenes* stwierdzono szybko rozprzestrzeniającą się martwicę tkanki skórnej, podczas gdy w szczepie dzikim obserwowano jedynie małe miejscowe owrzodzenia [58].

Należy zwrócić uwagę, że bakteriom jest niezwykle trudno zmienić strukturę czy skład ich błony komórkowej w celu obrony przed działaniem peptydów przeciwdrobnoustrojowych. Dodatkowe utrudnienie powoduje różnorodność AMPs syntetyzowanych w przyrodzie przez wiele odległych ewolucyjnie gatunków. Mechanizmy oporności bakterii kształtowały się od milionów lat, dlatego nie jest niczym szczególnym pojawienie się po upływie dłuższego czasu oporności na niektóre peptydy. Porównując ją z szybkością indukowania oporności np. na penicyliny, można stwierdzić, że oporność bakterii na katelicydyny pojawia się zdecydowanie powoli.

6. Perspektywy

Z uwagi na wzrastający problem lekooporności drobnoustrojów na istniejące leki w ostatnich dekadach, udało się uzyskać jedynie kilka klas nowych antybiotyków. Wiele różnorodnych struktur peptydów przeciwdrobnoustrojowych, odkrytych w różnych środowiskach biologicznych, rokowało optymistycznie, że niektóre z tych związków będą użyteczne jako środki terapeutyczne. Główny problem w rozwoju tej klasy antybiotyków dotyczy m.in. penetracji tkanki (dystrybucji), potencjalnej toksyczności i kosztów produkcji [21]. Nowe spojrzenie na przeciwwirusowy po-

tencjał katelicydyn sugeruje, że peptydy te mogą być ważnym docelowym elementem systemu obrony przeciwwirusowej i dodatkowo stanowić szablony do syntezy nowych analogów przeciwwirusowych. Pozostaje jednak kilka ważnych aspektów, którymi należy zająć się w przyszłości. Jednym z nich jest identyfikacja nowych peptydów przeciwdrobnoustrojowych. Kolejnym jest analiza funkcji biologicznych AMPs. Poza eksperymentami *in vitro*, które są pierwszym etapem oceny funkcji peptydów przeciwdrobnoustrojowych, konieczne jest również szersze podejście obejmujące genetyczne modele zwierzęce. Na skutek tego możliwa będzie interpretacja danych uzyskanych *in vitro* w odniesieniu do całego organizmu. Również istotną sprawą jest ocena roli peptydów w przebiegu chorób; badania te mogą nam dostarczyć cennych informacji na temat ich patogenez. Ostatnim, równie ważnym aspektem jest rozwój peptydów przeciwdrobnoustrojowych, w tym katelicydyn, jako potencjalnych leków [59].

Badano możliwość zastosowania terapii genowej w celu zwiększenia poziomu ekspresji katelicydyn, jednak nastąpił niewielki postęp w tym kierunku [60]. PG-1 (protegryna świni) daje 100% ochronę przed infekcjami spowodowanymi przez dootrzewnowe wstrzyknięcie *P. aeruginosa*, *S. aureus* i opornych na metycylinę *S. aureus* w badaniach przedklinicznych u szczurów [61]. Owce katelicydyny SMAP29 i SMAP34 są potencjalnymi kandydatami do stosowania w leczeniu ludzi z infekcją bakteryjną i obniżoną odpornością. Peptyd SMAP29 okazał się wysoce skuteczny przeciwko infekcji powodującej spadek nawilżania powierzchni dróg oddechowych u pacjentów z mukowiscydozą, również przy wysokim stężeniu NaCl [62]. Może zatem być stosowany jako cząsteczka wiodąca do projektowania syntetycznych antybiotyków peptydowych zachowujących swoją aktywność nawet przy wysokim stężeniu soli NaCl.

Wiele raportów na temat produkcji i aktywności syntetycznych peptydów przeciwdrobnoustrojowych pojawia się jedynie w literaturze patentowej. Naukowcy starają się uzyskać peptydy o krótszej sekwencji niż naturalne wzorce, z taką samą a nawet wyższą aktywnością przeciwdrobnoustrojową. Przykładowo, peptyd będący pochodną indolicydyny, składający się z 14 reszt aminokwasowych, wykazywał szerokie spektrum aktywności przeciwbakteryjnej [63]. Podobnie syntetyczny peptyd Rev4, również zaprojektowany na bazie indolicydyny, wykazywał szerokie spektrum działania przeciwdrobnoustrojowego oraz zwiększoną odporność na proteazy [64].

Jedną ze strategii użycia AMPs jest ich synergistyczne działanie z konwencjonalnymi antybiotykami lub wykorzystanie ich immunostymulującego działania. Przewiduje się również zastosowanie peptydów przeciwdrobnoustrojowych jako środków neutralizujących endotoksy-

ny [65]. Główną zaletą AMPs jest ich szerokie spektrum aktywności przeciwdrobnoustrojowej i szybkość działania, jednak wysokie koszty syntezy, badań i produkcji ograniczają ich zastosowanie. Również podatność na proteolizę, obniżona aktywność w soli fizjologicznej, surowicy oraz wrażliwość na pH, a także zakłócenie funkcji biologicznej (np. angiogenezy) powinny być brane pod uwagę przy ich ewentualnej aplikacji terapeutycznej [39].

Potrzebne są dalsze badania katelicydyn, określające ich profil transkryptyczny, szczególnie w momentach zakażenia organizmu. Ma to na celu zbadanie ich roli podczas infekcji. Ponadto istnieje potrzeba opracowania modeli mysich, u których geny kodujące peptydy przeciwdrobnoustrojowe ulegają nadekspresji albo zostają całkowicie wyciszone, w celu zbadania ich wpływu na fizjologię zwierząt. Można w ten sposób określić ich wpływ na prawidłowe funkcjonowanie organizmu. Pożądane są również inne modele zwierzęce, np. kozy czy bydła. Ponadto podstawowa wiedza na temat zależności struktura/aktywność pozwoli lekarzom i naukowcom wykorzystać różnorodne funkcje biologiczne tych peptydów na rzecz poprawy diagnostyki i terapii medycznej [39].

Literatura

- [1] Romeo D., Skerlavaj B., Bolognesi M., Gennaro R. (1988) Structure and bactericidal activity of an antibiotic dodecapeptide purified from bovine neutrophils, *J. Biol. Chem.* 263, 9573–9575.
- [2] Larrick J.W., Morgan J.G., Palings I., Hirata M., Yen M.H. (1991) Complementary DNA sequence of rabbit CAP18 a unique lipopolysaccharide binding protein, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 179, 170–175.
- [3] Larrick J.W., Hirata M., Balint R.F., Lee J., Zhong J., Wright S.C. (1995) Human CAP18: a novel antimicrobial lipopolysaccharide-binding protein, *Infect. Immun.* 63, 1291–1297.
- [4] Bagella L., Scocchi M., Zanetti M. (1995) cDNA sequences of three sheep myeloid cathelicidins, *FEBS Lett.* 376, 225–228.
- [5] Popsueva A.E., Zinovjeva M.V., Visser J.W., Zijlmans J.M., Fibbe W.E., Belyavsky A.V. (1996) A novel murine cathelin-like protein expressed in bone marrow, *FEBS Lett.* 391, 5–8.
- [6] Scocchi M., Bontempo D., Boscolo S., Tomasinsig L., Giulotto E., Zanetti M. (1999) Novel cathelicidins in horse leukocytes, *FEBS Lett.* 457, 459–464.
- [7] Sang Y., Ortega M.T., Rune K., Xiau W., Zhang G., Soulages J.L., Lushington G.H., Fang J., Williams T.D., Blecha F., Melgarejo T. (2007) Canine cathelicidin (K9CATH): Gene cloning, expression, and biochemical activity of a novel pro-myeloid antimicrobial peptide, *Dev. Comp. Immunol.* 31, 1278–1296.
- [8] Chang C.I., Zhang Y.A., Zou J., Nie P., Secombes C.J. (2006) Two cathelicidin genes are present in both rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Atlantis salmon (*Salmo salar*), *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 185–195.

- [9] Zanetti M. (2012) The Role of Cathelicidins in the Innate Host Defenses of Mammals, *Curr. Issues Mol. Biol.* 7, 179–196.
- [10] Weistroffer L.P. (2007) *Cathelicidins: a history and current knowledge with experimental data on the antimicrobial and cytotoxic activities of SMAP29 and congeners*, Theses and Dissertations, University Iowa, 5–12.
- [11] Tossi A., Sandri L., Giangaspero A. (2000) Amphipathic, alpha-helical antimicrobial peptides, *Biopolymers* 55, 4–30.
- [12] Gennaro R., Zanetti M. (2000) Structural features and biological activities of the cathelicidin-derived antimicrobial peptides, *Biopolymers* 55, 31–49.
- [13] Kuźniak M., Szymankiewicz M. (2012) Ludzka katelicydyna LL-37 – białko przeciwmikrobowe i jego rola w układzie odporności wrodzonej u noworodków, *Perinatol. Neonatol. Ginekol.* 4, 206–211.
- [14] Bals R., Wang X., Wu Z., Freeman T., Bafna V., Zasloff M., Wilson J.M. (1998) Human beta-defensin 2 is a salt-sensitive peptide antibiotic expressed in human lung, *J. Clin. Invest.* 102, 874–880.
- [15] Murakami M., Ohtake T., Dorschner R.A., Gallo R.L. (2002) Cathelicidin antimicrobial peptides are expressed in salivary glands and saliva, *J. Dent. Res.* 81, 845–850.
- [16] Malm J., Sorensen O., Persson T., Frohm-Nilsson M., Johansson B., Bjartell A., Lilja H., Stahle-Backdahl M., Borregaard N., Egesten A. (2000) The human cationic antimicrobial protein (hCAP-18) is expressed in the epithelium of human epididymis, is present in seminal plasma at high concentrations, and is attached to spermatozoa, *Infect. Immun.* 68, 4297–4302.
- [17] Gordon Y.J., Huang L.C., Romanowski E.G., Yates K.A., Proske R.J., McDermott A.M. (2005) Human cathelicidin (LL-37), a multifunctional peptide, is expressed by ocular surface epithelia and has potent antibacterial and antiviral activity, *Curr. Eye Res.* 30, 385–394.
- [18] De Smet K., Contreras R. (2005) Human antimicrobial peptides: defensins, cathelicidins and histatins, *Biotechnol. Lett.* 18, 1337–1347.
- [19] Serensen O.E. (2005) The human cathelicidin hCAP-18, *Dan. Med. Bull.* 52, 1–10.
- [20] Witkowska D., Bartyś A., Gamian A. (2008) Defensyny i katelicydyny jako naturalne antybiotyki peptydowe, *Postępy Hig. Med. Dośw.* 62, 694–707.
- [21] Ganz T., Lehrer R. (1999) Antibiotic peptides from higher eukaryotes: biology and applications, *Mol. Med. Today* 5, 292–297.
- [22] Richman A., Kafatos F.C. (1996) Immunity to eukaryotic parasites in vector insects, *Curr. Opin. Immunol.* 8, 14–19.
- [23] Fritig B., Heitz T., Legrand M. (1998) Antimicrobial proteins in induced plant defense, *Curr. Opin. Immunol.* 10, 16–22.
- [24] Giacometti A., Cirioni O., Ghiselli R., Mocchegiani F., D'Amato G., Circo R., Orlando F., Skerlavaj B., Silvestri C., Saba V., Zanetti M., Scalise G. (2004) Cathelicidin peptide sheep myeloid antimicrobial peptide-29 prevents endotoxin-induced mortality in rat models of septic shock, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 169, 187–194.
- [25] Ikeda Y., Young L.H., Scalia R., Ross C.R., Lefer A.M. (2001) PR-39, a proline/arginine-rich antimicrobial peptide, exerts cardioprotective effects in myocardial ischemia-reperfusion, *Cardiovasc. Res.* 49, 69–77.
- [26] Cole A.M., Shi J., Ceccarelli A., Kim Y.H., Park A., Ganz T. (2001) Inhibition of neutrophil elastase prevents cathelicidin activation and impairs clearance of bacteria from wounds, *Blood* 97, 297–304.

- [27] Heilborn J.D., Nilsson M.F., Kratz G., Weber G., Sorensen O., Borregaard N., Stahle-Backdahl M. (2003) The cathelicidin anti-microbial peptide LL-37 is involved in re-epithelialization of human skin wounds and is lacking in chronic ulcer epithelium, *J. Invest. Dermatol.* 120, 379–389.
- [28] Andra J., Gutschmann T., Garidel P., Brandenburg K. (2006) Mechanisms of endotoxin neutralization by synthetic cationic compounds, *J. Endotoxin. Res.* 12, 261–277.
- [29] Bevins C.L. (2004) The Paneth cell and innate immune response, *Curr. Opin. Gastroenterol.* 20, 572–580.
- [30] Koczulla R., von Degenfeld G., Kupatt C., Krötz F., Zahler S., Gloe T., Issbrücker K., Unterberger P., Zaiou M., Lebherz C., Karl A., Raake P., Pfosser A., Boekstegers P., Welsch U., Hiemstra P.S., Vogelmeier C., Gallo R.L., Clauss M., Bals R. (2003) An angiogenic role for the human peptide antibiotic LL-37/hCAP-18, *J. Clin. Invest.* 111, 1665–1672.
- [31] Chow Chuen J.Y., Li J.Z., Ka Kei Wu W., Cho Chi Hin (2013) Cathelicidin a potential therapeutic peptide for gastrointestinal inflammation and cancer, *World J. Gastroenterol.* 19, 2731–2735.
- [32] Koon H.W., Shih D.Q., Chen J., Bakirtzi K., Hing T.C., Law I., Ho S., Ichikawa R., Zhao D., Xu H., Gallo R., Dempsey P., Cheng G., Targan S.R., Pothoulakis C. (2011) Cathelicidin signaling via the Toll-like receptor protects against colitis in mice, *Gastroenterology* 141, 1852–1863.
- [33] Brogden K.A. (2005) Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?, *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 238–250.
- [34] Bals R., Wang X., Zasloff M., Wilson J.M. (1998) The peptide antibiotic LL-37/hCAP-18 is expressed in epithelia of the human lung where it has broad antimicrobial activity at the airway surface, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 9541–9546.
- [35] Westerhoff H.V. et al. (1995) Functional synergism of the magainins PGLa and magainin-2 in *Escherichia coli*, tumor cells and liposomes, *Eur. J. Biochem.* 228, 257–264.
- [36] Matsuzaki K., Murase O., Fujii N., Miyajima K. (1996) An antimicrobial peptide, magainin 2, induced rapid flip-flop of phospholipids coupled with pore formation and peptide translocation, *Biochemistry* 35, 11361–11368.
- [37] Yang L., Harroun T.A., Weiss T.M., Ding L., Huang H.W. (2001) Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores, *Biophys. J.* 81, 1475–1485.
- [38] Ladokhin A.S., White S.H. (2001) ‘Detergent-like’ permeabilization of anionic lipid vesicles by melittin, *Biochim. Biophys. Acta* 1514, 253–260.
- [39] Kościuczuk E.M., Lisowski P., Jarczak J., Strzałkowska N., Józwick A., Horbańczuk J., Krzyżewski J., Zwierzchowski L., Bagnicka E. (2012) Cathelicidins: family of antimicrobial peptides. A review, *Mol. Biol. Rep.* 39, 10957–10970.
- [40] Brogden K.A. (2005) Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?, *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 238–250.
- [41] Dean R.E., O’Brien L.M., Thwaite J.E., Fox M.A., Atkins H., Ulaeto D.O. (2010) A carpet-based mechanism for direct antimicrobial peptide activity against vaccinia virus membranes, *Peptides* 31, 1966–1972.
- [42] Currie S., Gwyer Findlay E., McHugh B., et al. (2013) The human cathelicidin LL-37 has antiviral properties against respiratory syncytial virus, *PLoS ONE* 8, e73659.
- [43] Barlow P.G., Findlay E.G., Currie S.M., Davidson D.J. (2014) Antiviral potential of cathelicidins, *Future Microbiol.* 9, 55–73.
- [44] Spillman D. (2001) Heparan sulphate: anchor for viral intruders?, *Biochimie* 83, 811–817.

- [45] Mistry N., Drobni P., Näslund J., Sunkari V.G., Jenssen H., Evander M. (2007) The anti-papillomavirus activity of human and bovine lactoferricin, *Antiviral Res.* 75, 258–265.
- [46] Lau Y., Rozek A., Scott M.G., Goosney D.L., Davidson D.J., Hancock R.E.W. (2005) Interaction and cellular localization of the human host defense peptide LL-37 with lung epithelial cells, *Infect. Immun.* 73, 583–591.
- [47] Peschel A. (2002) How do bacteria resist human antimicrobial peptides?, *Trends Microbiol.* 10, 179–186.
- [48] Lysenko E.S., Gould J., Bals R., Wilson J.M., Weiser J.N. (2000) Bacterial phosphorylcholine decreases susceptibility to the antimicrobial peptide LL-37/hCAP18 expressed in the upper respiratory tract, *Infect. Immun.* 68, 1664–1671.
- [49] Ernst R.K., Yi E.C., Guo L., Lim K.B., Burns J.L., Hackett M., et al. (1999) Specific lipopolysaccharide found in cystic fibrosis airway *Pseudomonas aeruginosa*, *Science* 286, 1561–1565.
- [50] Gunn J.S., Ryan S.S., Van Velkinburgh J.C., Ernst R.K., Miller S.I. (2000) Genetic and functional analysis of a PmrA-PmrB-regulated locus necessary for lipopolysaccharide modification, antimicrobial peptide resistance, and oral virulence of *Salmonella enterica* serovar typhimurium, *Infect. Immun.* 68, 6139–6146.
- [51] Peschel A. (2002) How do bacteria resist human antimicrobial peptides?, *Trends Microbiol.* 10, 179–186.
- [52] Jin T., Bokarewa M., Foster T., Mitchell J., Higgins J., Tarkowski A. (2004) *Staphylococcus aureus* resists human defensins by production of staphylokinase, a novel bacterial evasion mechanism, *J. Immunol.* 172, 1169–1176.
- [53] Shafer W.M., Qu X., Waring A.J., Lehrer R.I. (1998) Modulation of *Neisseria gonorrhoeae* susceptibility to vertebrate antibacterial peptides due to a member of the resistance/nodulation/division efflux pump family, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 1829–1833.
- [54] Schmidtchen A., Frick I.M., Andersson E., Tapper H., Björck L. (2002) Proteinases of common pathogenic bacteria degrade and inactivate the antibacterial peptide LL-37, *Mol. Microbiol.* 46, 157–168.
- [55] Lehrer R.I., Ganz T. (2002) Cathelicidins: a family of endogenous antimicrobial peptides, *Curr. Opin. Hematol.* 9, 18–22.
- [56] Nizet V., Gallo R.L. (2003) Cathelicidins and innate defense against invasive bacterial infection, *Scand. J. Infect. Dis.* 35, 670–676.
- [57] Collins L.V., Kristian S.A., Weidenmaier C., Faigle M., et al. (2002) *Staphylococcus aureus* strains lacking D-alanine modifications of teichoic acids are highly susceptible to human neutrophil killing and are virulence attenuated in mice, *J. Infect. Dis.* 186, 214–219.
- [58] Nizet V., Ohtake T., Lauth X., Trowbridge J., Rudisill J., Dorschner R.A., et al. (2001) Innate antimicrobial peptide protects the skin from invasive bacterial infection, *Nature* 414, 454–457.
- [59] Bals R., Wilson J.M. (2003) Cathelicidins – a family of multifunctional antimicrobial peptides, *Cell. Mol. Life Sci.* 60, 711–720.
- [60] Rogan M.P., Gerghy P., Greene C.M., O’Neill S.J., Taggart C.C., McElvaney N.G. (2006) Antimicrobial proteins and polypeptides in pulmonary innate immunity, *Respir. Res.* 7, 7–29.
- [61] Reddy K.V., Yedery R.D., Aranha C. (2004) Antimicrobial peptides: promises and promises, *Int. J. Antimicrob. Agents.* 24, 536–547.

- [62] Travis S.M., Anderson N.N., Forsyth W.R., Espiritu C., Conway B.D., Greenberg E.P., McCray P.B. Jr, Lehrer R.I., Welsh M.J., Tack B.F. (2000) Bactericidal activity of mammalian cathelicidin-derived peptides, *Infect. Immun.* 68, 2748–2755.
- [63] Hancock R.E.W., Chapple D.S. (1999) Peptide antibiotics. Mini-review, *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 1317–1323.
- [64] Li Q., Lawrence C.B., Maelor Davies H., Everett N.P. (2002) A tridecapeptide possesses both antimicrobial and protease-inhibitory activities, *Peptides* 23, 1–6.
- [65] Gordon Y.J., Romanowski E.G., McMermott A.M. (2005) A review of antimicrobial peptides and their therapeutic potential as anti-infective drugs, *Curr. Eye Res.* 30, 505–515.

SYNTEZA ORAZ TRANSFORMACJE POCHODNYCH KWASÓW FOSFONOWYCH

PATRYCJA MROWIEC, MAGDALENA RAPP,
HENRYK KORONIAK

Wydział Chemii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza
ul. Umultowska 89b, 61-614 Poznań
e-mail: patrycja.mrowiec@amu.edu.pl, magdrapp@amu.edu.pl,
koroniak@amu.edu.pl

Hasła do zapamiętania: α -fluorofosfoniany, α -hydroksyfosfoniany, aminofosfoniany, fluorowanie nukleofilowe, fluorowanie elektrofilowe, reakcje: Michaelisa–Arbuzowa, Michaelisa–Beckera, Abramowa i Pudovika

Wykaz skrótów:

ATP	– 5'-trifosforan adenozyiny
Bn	– grupa benzylowa
Boc	– grupa <i>tert</i> -butyloksykarbonylowa
Cbz	– grupa benzyloksykarbonylowa
DAST	– trifluorek dietyloaminoiarki
DFMBA	– <i>N,N</i> -dietylo- α,α -difluoro-(<i>m</i> -metylobenzylo)amina
syntaza EPSP	– syntaza 5-enolopirogroniano-szikimowo-3-fosforanowa
Et	– grupa etylowa
EtO	– grupa etoksylowa
FPPS	– syntazy difosforanu farnesyli
HIV	– wirus zespołu nabytego braku odporności
Hlg	– atom fluorowca (Cl, Br lub I)
HMDS	– heksametylodisilazan
<i>i</i> -Bu	– grupa izobutylowa
LPA	– kwas lizofosfatydowy
Me	– grupa metylowa
MeO	– grupa metoksylowa
NFOBS	– <i>N</i> -fluoro- <i>o</i> -benzenodisulfonimid
NFPMS	– <i>N</i> -fluoroperfluorometanosulfonimid
NFSI	– <i>N</i> -fluorobenzenosulfonimid

Nu	– nukleofil
Ph	– grupa fenylowa
PNP	– fosforylaza nukleozydów purynowych
RT	– temperatura pokojowa
S3P	– 3-fosforan kwasu szikimowego
THF	– tetrahydrofuran
uPA	– aktywator plazminogenu typu urokinazy
W	– wydajność reakcji

1. Wstęp

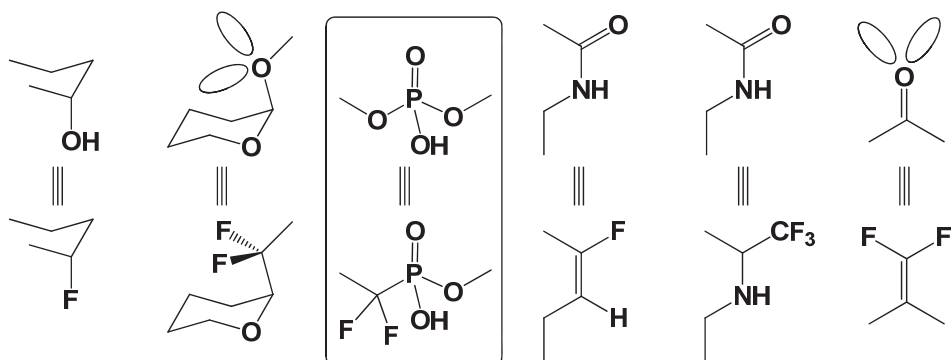
Pochodne estrów kwasów fosfonowych są doskonałymi analogami fosforanów powszechnie występujących w organizmach żywych i biorących udział w wielu ważnych procesach biologicznych. Estry kwasów fosforowych są składnikami fosfolipidów, nukleotydów, w tym ATP (nośnika energii chemicznej) wykorzystywanego w metabolizmie komórek, a także kwasów nukleinowych przechowujących informacje genetyczne. Ze względu na podobieństwo fosfonianów do fosforanów, a także obecność w estrach kwasów fosfonowych wiązania P–C, odpornego na działanie czynników chemicznych, hydrolizę przez fosfatazy, rozkład termiczny i fotolizę, organiczne pochodne fosfonianów są wartymi przebadania, doskonałymi kandydatami na leki. Ich odporność na biodegradację sprawia, że są one wbudowywane we fragmenty biomolekuł stających się w ten sposób inhibitorami pewnych szlaków biosyntezy. Co więcej, pochodne kwasu fosfonowego można stosunkowo łatwo poddać modyfikacjom [1–4].

2. Związki fluoroorganiczne

Fluor to „mały atom o wielkim *ego*” [5], którego wartość promienia Van der Waalsa (1,47 Å) mieści się pomiędzy odpowiednimi wartościami atomu wodoru (1,20 Å) oraz atomu tlenu (1,52 Å). Z tego względu atom fluoru może zastępować atom wodoru w cząsteczce związku organicznego bez wywoływania znaczących zmian w wielkości tej cząsteczki. Jednakże fluor jest najbardziej elektroujemnym pierwiastkiem układu okresowego (3,98 w skali Paulinga), co w konsekwencji prowadzi do tworzenia silnych wiązań z innymi pierwiastkami. Z tej przyczyny wiązanie C–F jest silnie spolaryzowane, ma znaczny charakter jonowy, jest krótkie i trwałe (energia wiązania C–F wynosi 486 kJ/mol, podczas gdy wiązania C–H 415 kJ/mol, a C–C 332 kJ/mol). Co więcej, trzy wolne pary elektro-

nowe atomu fluoru znajdują się bardzo blisko jądra i są mało reaktywne. Powyższe właściwości tłumaczą odporność związków fluoroorganicznych na działanie kwasów, zasad oraz czynników utleniających. Ponadto posiadają one dużą odporność termiczną, a w porównaniu z odpowiadającymi im węglowodorami – niższe temperatury wrzenia i większą gęstość [3, 6].

Związki fluoroorganiczne znajdują szerokie zastosowanie w wielu różnych dziedzinach, począwszy od leków i środków agrochemicznych po zaawansowane materiały czy polimery. Stwierdzono, że cząsteczki związków chemicznych zawierające w swojej strukturze atom fluoru posiadają korzystne właściwości fizykochemiczne, takie jak zwiększona stabilność i hydrofobowość. Ponadto atom fluoru może wywierać wpływ na konformacje cząsteczek organicznych i pozytywnie oddziaływać na kierunek reakcji. Znane są związki fluoroorganiczne, które zyskały znaczenie w leczeniu nowotworów (np. eniluracyl, fludarabina), infekcji HIV (np. alamifovir), a także zakażeniach grzybiczych (np. osflukonazol) [2, 6].



Rys. 1. Potencjalne możliwości modyfikacji związków organicznych atomem/atomami fluoru odpowiadające danym grupom funkcyjnym

Aby uzyskać lepsze powinowactwo do miejsca aktywnego enzymu, odpowiednie grupy funkcyjne zastąpiono grupami zawierającymi atom(y) fluoru, podobnymi pod względem sterycznym lub elektronowym (Rys. 1). Tak otrzymane związki fluoroorganiczne mogą być rozpoznawane przez enzym jako substraty i wiążąc się z nimi, prowadzić do hamowania ich działania. Przykładowo atom fluoru sterycznie zbliżony jest do atomu wodoru (mały rozmiar), jednak elektronowo – do grupy hydroksylowej (podobna polarność). Podobnie wykorzystano wpływ atomu(ów) fluoru przy użyciu α -fluoroalkilowych pochodnych kwasów fosfonowych jako inhibitorów różnego rodzaju kinaz czy fosforylaz [3].

Tabela 1. Wpływ obecności atomu fluoru na właściwości kwasowo-zasadowe i geometrię cząsteczki pochodnych fosforanowych / fosfonianowych

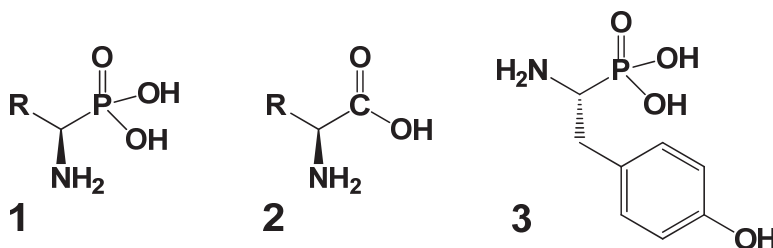
Struktura związku				
Wartość pKa ₂	6,45	7,65	6,20	5,64
Wartość kąta C-X-P	118,7°	112,1°	113,2°	116,5°

X = O, CH₂, CHF lub CF₂

Zastąpienie charakteryzującego się stosunkowo wysoką elektroujemnością mostkowego atomu tlenu (C–O–P) w fosforanie grupą CH₂, prowadzące do otrzymania ugrupowania (C–CH₂–P), powoduje znaczną zmianę polarności wiązania, właściwości kwasowo-zasadowych oraz geometrii cząsteczki. Okazało się jednak, że wprowadzenie jednego atomu fluoru, prowadzące do otrzymania α-fluoroalkilowych pochodnych kwasów fosfonowych, wpływa na wartość pKa₂ (6,20), zbliżając ją do wartości pKa₂ odpowiednich fosforanów (6,45) – Tab. 1. Natomiast wprowadzenie dwóch atomów fluoru, prowadzące do otrzymania α,α-difluoroalkilowych pochodnych, wpływa na wartość kąta C–CF₂–P (116,5°), zbliżając ją do wartości kąta C–O–P w fosforanach (118,7°). Przedstawione zmiany właściwości wynikające z wprowadzenia atomu fluoru do cząsteczki zostały wykorzystane w syntezie nowych leków [1–4].

3. Pochodne kwasów aminofosfonowych jako analogi aminokwasów

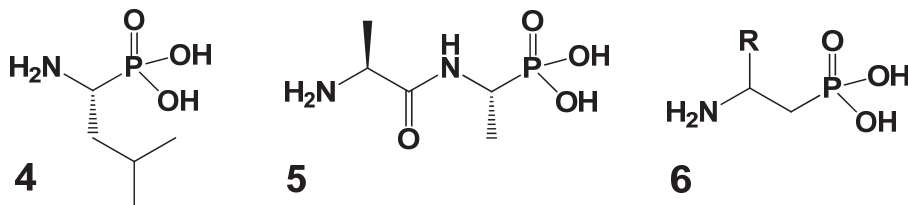
Kwasy fosfonowe zawierające grupę aminową w pozycji α (**1**) i ich pochodne są ważnymi analogami aminokwasów (**2**) będących podstawową jednostką budulcową białek (Rys. 2). Mimo że tetraedryczna grupa fosfonowa (–P(O)(OR)₂) różni się kształtem od płaskiej i mniej obszernej grupy karboksylowej (–COOH) oraz kwasowością (kwas fosfonowy jest znacznie bardziej kwasowy) i zajmowaną objętością w przestrzeni (atom fosforu ma większy promień atomowy niż węgiel), obie grupy funkcyjne często wykazują podobne właściwości. Z tego względu kwasy α-aminoalkilofosfonowe mogą być rozpoznawane przez enzymy lub receptory jako fałszywe substraty lub inhibitory [7–9].



Rys. 2. Struktura analogu kwasu α -aminoalkilofosfonowego, aminokwasu oraz fosfotyrozyny

Liczne kwasy α -aminoalkilofosfonowe, także fluorowane, ich estry i analogi peptydów wykazują szereg różnorodnych właściwości biologicznych. Niektóre z nich to produkty naturalne; przykładem jest fosfotyrozyna (**3**, Rys. 2) będąca kluczowym składnikiem np. wykazujących działanie hipotensyjne tripeptydów. Pochodne kwasów α -aminoalkilofosfonowych znalazły zastosowanie m.in. jako inhibitory takich enzymów, jak: syntazy (np. proteazy HIV), fosfatazy (np. białkowej fosfatazy tyrozynowej) czy reniny (podnoszącej ciśnienie krwi). Ponadto są używane jako silne antybiotyki, środki przeciwbakteryjne, przeciwwirusowe, przeciwgrzybiczne, herbicydy, a także środki przeciwnowotworowe. α -Aminofosfoniany są również wykorzystane jako ligandy w reakcjach katalizy homogenicznej lub organicznej [7–10].

Szerokie zastosowanie biologiczne pochodnych kwasów α -aminofosfonowych jest wynikiem obecności w cząsteczce fragmentu N–C–P. Często jednak aktywność biologiczna kwasów α -aminofosfonowych i ich pochodnych zależy od konfiguracji absolutnej stereogenicznego α -atomu węgla. Na przykład (*R*)-fosfoleucyna (**4**) jest silniejszym inhibitorem aminopeptydazy leucynowej niż jej (*S*)-enancjomer (Rys. 3). Również (*S,R*)-alafosfalina (**5**) wykazuje wyższą aktywność przeciwbakteryjną zarówno w stosunku do bakterii Gram-dodatnich, jak i Gram-ujemnych niż jej pozostałe trzy diastereoizomery [7–10].



Rys. 3. Struktura (*R*)-fosfoleucyny, (*S,R*)-alafosfaliny, a także kwasu β -aminoalkilofosfonowego

Wśród związków biologicznie czynnych istotne miejsce zajmują również pochodne kwasów β -aminofosfonowych (**6**, Rys. 3) będące izosterycznymi analogami β -aminokwasów. Ujawniają one interesujące właściwości biologiczne i biochemiczne, takie jak: hamowanie działania pewnych enzymów, tworzenie przeciwciał katalitycznych, środków przeciw wirusowi HIV, a także środków przeciwbakteryjnych [11].

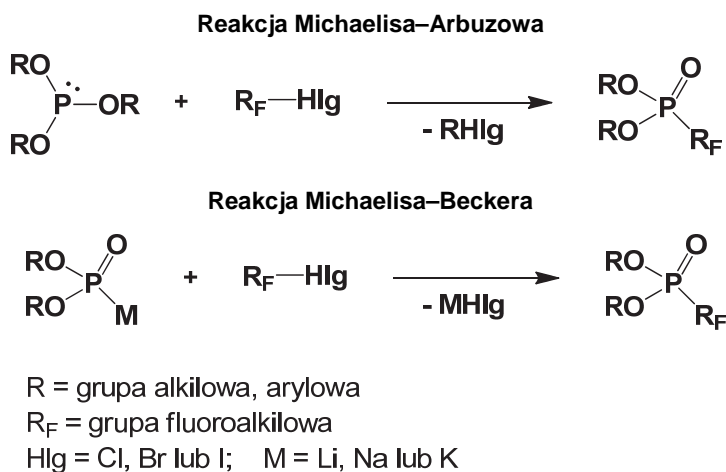
4. Wybrane metody syntezy pochodnych kwasów fosfonowych

Reakcje tworzenia wiązania C–P są często wykorzystywane przez chemików organicznych. Otrzymane w tych reakcjach pochodne estrów kwasów fosfonowych, szczególnie fluorofosfoniany, aminofosfoniany oraz hydroksyfosfoniany, wykazują zwykle wysoką aktywność biologiczną; są one także użytecznymi odczynnikami do dalszych syntez organicznych [12].

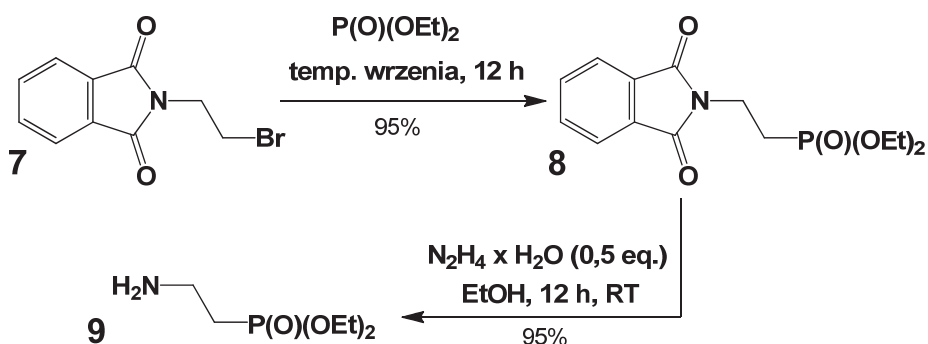
4.1. Reakcje Michaelisa–Arbuzowa oraz Michaelisa–Beckera

Ze względu na swoją dużą energię, wiązanie C–F jest niereaktywne wobec typowych pochodnych fosforoorganicznych o charakterze nukleofilowym, takich jak pochodne fosforynu trialkilowego $[P(OR)_3]$ czy odpowiednie związane z metalami (Li, Na, K) aniony generowane z fosforynu dialkilo. Z tego względu fluorohalogenoalkany znalazły zastosowanie w syntezie fluorowanych estrów kwasów fosfonowych. W reakcjach Michaelisa–Arbuzowa oraz Michaelisa–Beckera fluorohalogenoalkany reagują z odpowiednimi związkami fosforu wyłącznie przez rozerwanie wiązania C–Hlg (Hlg = Cl, Br lub I) – Rys. 4 [1, 12].

Warto zauważyć, że są to najczęściej przeprowadzane reakcje syntezy fluoroalkilowych pochodnych estrów kwasów fosfonowych. Reakcja Michaelisa–Arbuzowa może być także wykorzystana do syntezy kwasów β -aminofosfonowych i ich pochodnych. Substratami w tych reakcjach są komercyjnie dostępne *N*-blokowane halogenki alkiloamin. Jednym z przykładów jest reakcja *N*-(bromoetylo)ftalimidu **7** z fosforynem dietylu, w wyniku której powstaje z niemal ilościową wydajnością *N*-podstawiony ftaloilo- β -aminofosfonian **8** (Rys. 5) [11, 13].



Rys. 4. Schematy reakcji Michaelisa–Arbuzowa oraz Michaelisa–Beckera wykorzystywanych w syntezie fluorowanych pochodnych kwasów fosfonowych

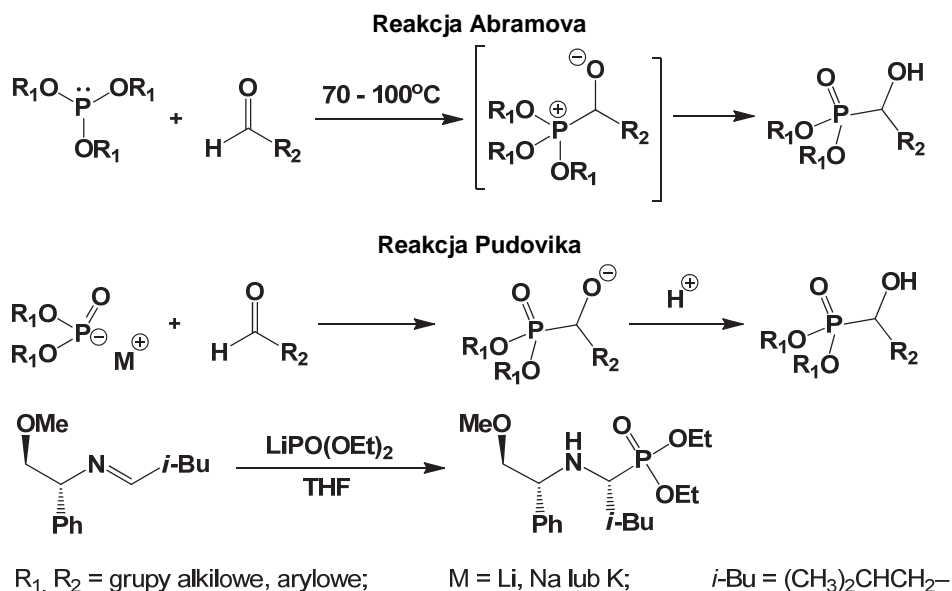


Rys. 5. Schemat syntezy β-aminoetylofosfonianu

W celu uzyskania wolnej grupy aminowej, powstały produkt poddano reakcji z nukleofilowym wodzianem hydrazyny w etanolu, który wspomaga usunięcie grupy blokującej przez otwarcie pierścienia ftalimidu. Kończącym produktem jest β-aminoetylofosfonian **9** [11, 13].

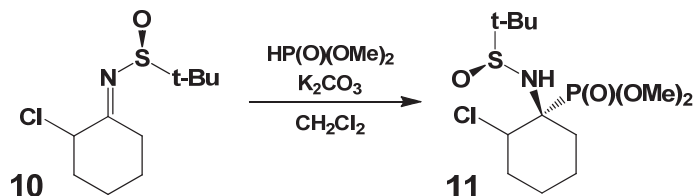
4.2. Reakcje Abramova i Pudovika

Do głównych metod otrzymywania α-hydroksy lub α-aminowych pochodnych kwasów fosfonowych należą reakcje Abramova i Pudovika (Rys. 6).

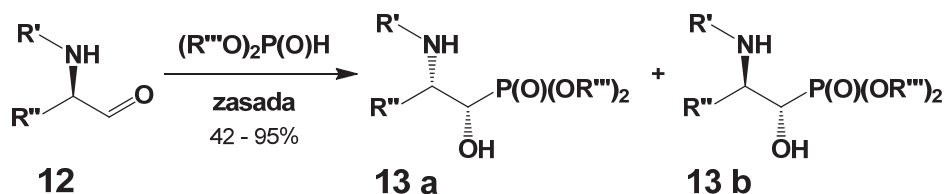


Rys. 6. Schematy reakcji Abramowa oraz Pudovika

Omawiane reakcje zachodzą pomiędzy odpowiednim fosforynem trial-
kilowym (reakcja Abramowa) lub odpowiednimi anionami wygenerowa-
nymi z fosforynu dialkilowego (reakcja Pudovika) a aldehydami, ketonami
bądź też iminami. W zależności od zastosowanego substratu w wyniku
tych reakcji tworzą się odpowiednie α -hydroksy- lub α -aminofosfoniany
ze średnimi i wysokimi wydajnościami. Przykładowo reakcja cyklicznej
chiralnej iminy **10** z fosforynem dietylu w obecności K_2CO_3 w chlorku
metyleny, zachodząca w temperaturze pokojowej przez 48 h, prowadzi do
otrzymania zawierającego czwartorzędowy atom węgla α -aminofosfonia-
nu **11** z wydajnością 78% i 73% nadmiarem jednego z diastereoizomerów
(Rys. 7) [8, 12].

Rys. 7. Zastosowanie reakcji Pudovika w syntezie α -aminofosfonianu

Reakcje Pudovika wykorzystuje się również w syntezie pochodnych kwasów β -amino- α -hydroksyfosfonianowych. Przykładowo, optycznie czynne α -aminoaldehydy **12** (Rys. 8) poddaje się działaniu nukleofilowego fosforynu dietylu w obecności zasady, otrzymując mieszaniny diastereoizomerów **13a** i **13b** możliwe do rozdzielenia za pomocą chromatografii kolumnowej [11, 14–17].



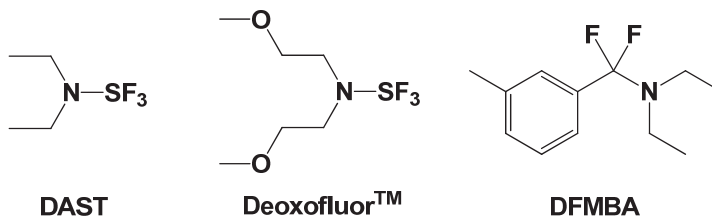
R' = Boc, Cbz; R'' = Me, Bn, *i*-Bu, CHMeEt; R''' = Me, Et

Rys. 8. Zastosowanie reakcji Pudovika w syntezie pochodnych kwasów β -amino- α -hydroksyfosfonianowych

W niektórych przypadkach, stosując odpowiednie warunki, reakcja może zachodzić stereoselektywnie. Użycie fluorku potasu lub trietyloaminy jako zasady (reakcja w benzenie) sprzyja otrzymaniu izomeru *syn* **13a**. Otrzymane β -amino- α -hydroksyfosfoniany mogą służyć jako bloki budulcowe do syntezy nowych fosforoorganicznych pochodnych peptydowych, takich jak: inhibitory ludzkiej kalpajny I [11, 14–17].

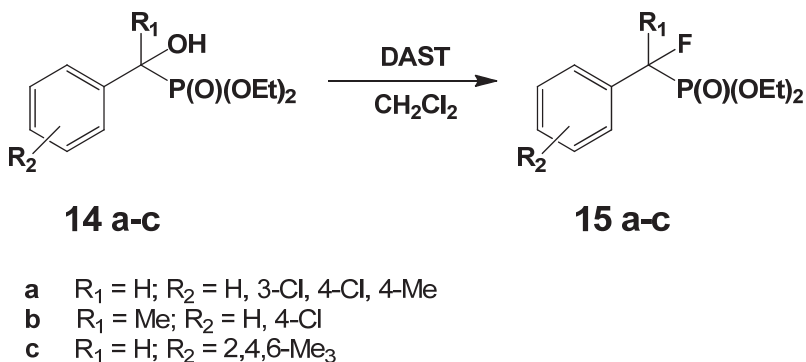
4.3. Fluorowanie nukleofilowe fosfonianów

Powszechnie stosowaną metodą otrzymywania α -fluoroalkilowych pochodnych fosfonianów jest podstawienie grupy hydroksylowej α -hydroksyfosfonianu atomem fluoru, przy użyciu takich komercyjnie dostępnych odczynników, jak: DAST, DeoxofluorTM oraz DFMBa (Rys. 9) [1, 3].



Rys. 9. Struktury odczynników stosowanych w reakcjach fluorowania nukleofilowego

W przypadku reakcji trifluorku dietyloaminoosiarki (DAST) z alkoholem R_1R_2CH-OH , kluczowym etapem reakcji jest utworzenie związku zawierającego dobrą grupę opuszczającą $R_1R_2CH-OSF_2NET_2$, która w kolejnym etapie ulega podstawieniu wytworzonym anionem fluorkowym. Reakcja zachodzi zarówno w przypadku pierwszo-, jak i drugo-, a nawet trzeciorzędowych alkoholi. Dla alkoholi pierwszo- i drugorzędowych często przebiega stereoselektywnie i z inwersją konfiguracji. Do problemów związanych z otrzymywaniem związków fluoroorganicznych tą metodą należy możliwość wystąpienia reakcji wtórnych, dehydratacji bądź przegrupowania związku [1, 3].

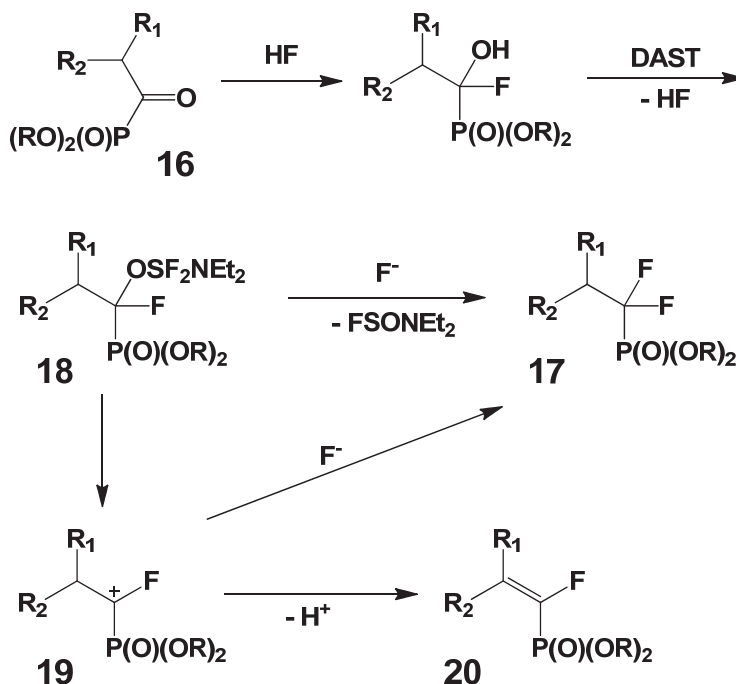


Rys. 10. Zastosowanie odczynnika DAST w syntezie pochodnych kwasu α -fluoroalkilofosfonowego

Po raz pierwszy reakcje fluorowania nukleofilowego w celu uzyskania α -fluoroalkilowych pochodnych fosfonianów zastosował Blackburn wraz ze współpracownikami. Konwersje grupy hydroksylowej na atom fluoru uzyskali oni poprzez reakcję różnych α -hydroksybenzylofosfonianów **14a-c** z jednym ekwiwalem odczynnika fluorującego DAST w chlorku metylenu w temperaturze 0°C (Rys. 10) [1, 18, 19, 20].

Odczynnik DAST jest także wykorzystywany do syntezy geminalnych difluorków z odpowiednich ketonów lub aldehydów. Przykładem jest reakcja α -ketofosfonianu **16** z DAST, w której rolę katalizatora pełni występujący w śladowych ilościach HF, a która prowadzi do otrzymania α,α -difluorometylenofosfonianu **17** (Rys. 11). *Gem*-difluoroalkilowa grupa w związku **17** powstaje z aktywowanego przez DAST alkoholu **18** lub fluorowanego karbokationu **19**. Dodatkowo, w wyniku eliminacji, powstaje α -fluorowinylofosfonian **20** jako konkurencyjny produkt. Stosunek otrzymanych związków (*gem*-difluorku i fluorku winylu) zależy od rodzaju

ju użytego rozpuszczalnika. W przypadku rozpuszczalników niepolarnych (np. CH_2Cl_2) głównym produktem reakcji jest α,α -difluorometylenofosfonian 17 [1, 21].

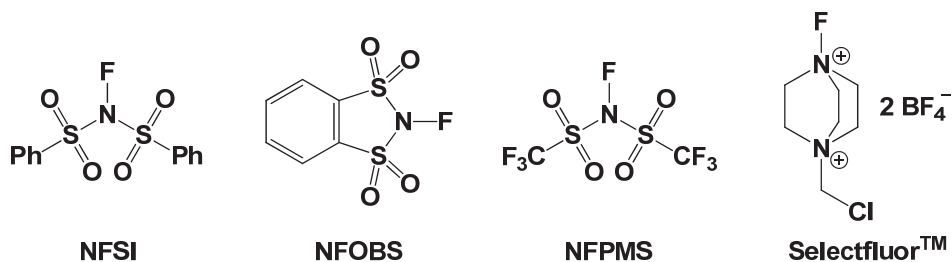


Rys. 11. Zastosowanie odczynnika DAST w syntezie fluorowanych fosfonianów

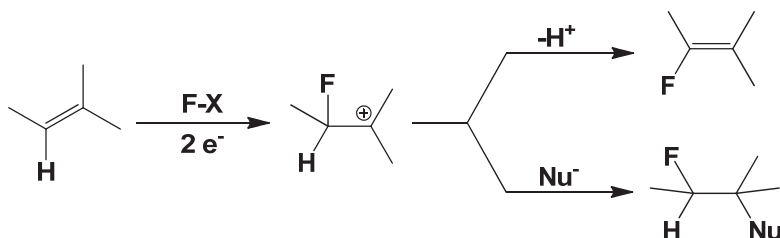
4.4. Fluorowanie elektrofilowe fosfonianów

Odczynniki stosowane w reakcjach fluorowania elektrofilowego (np. NFSI, SelectfluorTM, NFOBS, NFPMS – Rys. 12) posiadają w swojej strukturze wiązanie N–F.

Elektroujemny atom azotu aktywowany jest albo grupami silnie wyciągającymi elektrony, albo obecnością dodatnich ładunków w cząsteczce; umożliwia zajęcie elektrofilowej addycji fluoru (w postaci jonu F^+) do bogatego w elektrony układu. W dalszej części tej reakcji następuje albo odejście protonu, albo addycja nukleofila, jeśli jest obecny w układzie reakcyjnym, prowadząc do otrzymania nienasyconych bądź nasyconych produktów reakcji (Rys. 13) [22].



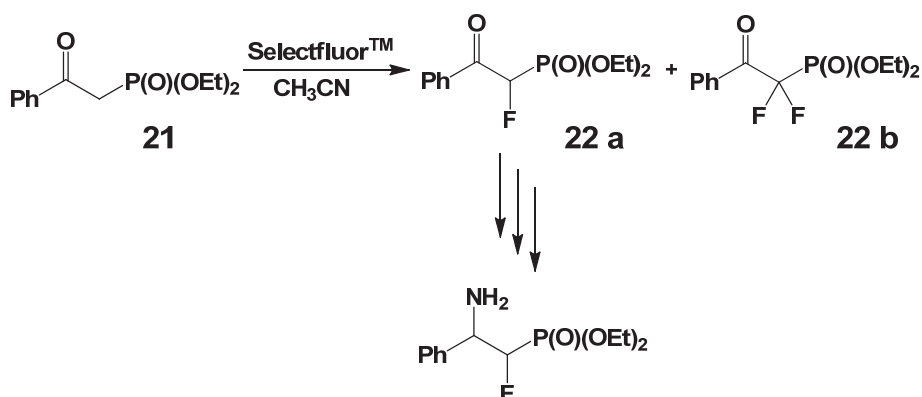
Rys. 12. Struktury odczynników stosowanych w reakcjach fluorowania elektrofilowego



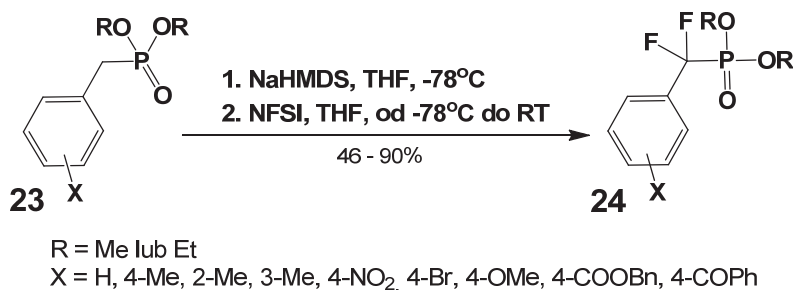
Rys. 13. Schemat reakcji fluorowania elektrofilowego

Reakcja fluorowania elektrofilowego organicznych pochodnych fosfonianowych jest powszechną metodą syntezy α -monofluoro- i α,α -difluoroalkilofosfonianów, również trudnych do otrzymania innymi metodami fluorofosfonianów zawierających takie grupy funkcyjne, jak: $-OH$, $-CN$, $-(O)CR$, $-OOCR$, $-SO_2R$ oraz $-NO_2$. W reakcji często powstaje mieszanina związków mono- i difluorowanych, jednak przez odpowiednie dostosowanie warunków reakcji możliwe jest otrzymanie jednego głównego produktu. W przypadku reakcji fluorowania elektrofilowego β -ketofosfonianu **21** przy użyciu Selectfluoru™ najlepszą wydajność ($W = 95\%$) dla pochodnej α -monofluorofosfonianowej **22a** otrzymano, stosując 2 ekwiwalenty odczynnika fluorującego, acetonitryl jako rozpuszczalnik, a reakcję prowadzono w temperaturze wrzenia rozpuszczalnika przez 24 h (Rys. 14). Związek ten, w dalszych etapach reakcji, posłużył do otrzymania α -fluoro- β -aminofosfonianu [1, 23, 24].

W przypadku zmiany ilości użytego Selectfluoru™ na 6 ekwiwalentów, głównym produktem reakcji był α,α -difluoroalkilofosfonian **22b** ($W = 95\%$). Natomiast w wyniku zmiany rozpuszczalnika na THF wydajność reakcji spadła do 5%. Warto dodać, że zastosowanie NFSI jako odczynnika fluorującego oraz katalizatorów palladowych zawierających chiralne ligandy pozwoliło na uzyskanie związku **22a** z bardzo wysoką wydajnością oraz nadmiarem jednego z enancjomerów [24].



Rys. 14. Zastosowanie odczynnika Selectfluoru™ w reakcji fluorowania elektrofilowego β -ketofosfonianu



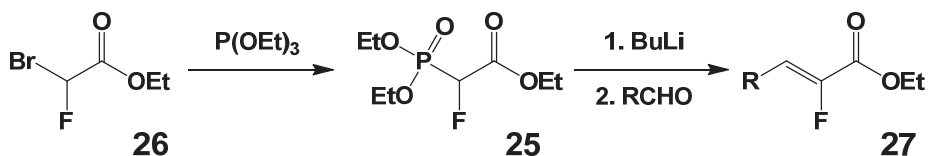
Rys. 15. Zastosowanie odczynnika NFSI w reakcji fluorowania elektrofilowego pochodnych kwasów fosfonowych

Inne związki – pochodne α -monofluoro- i α,α -difluorobenzylfosfonia-
nowe **24** – zostały zbadane pod kątem inhibicji białkowych fosfataz tyro-
zynowych oraz kinaz tyrozynowych; uzyskano je, stosując NFSI jako
elektrofilowy odczynnik fluorujący, a także NaHMDS jako silną zasadę
(Rys. 15) [1, 25].

4.5. Reakcje z udziałem bloków budulcowych

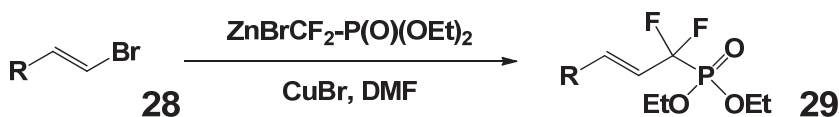
W metodzie syntezy związków fluoroorganicznych z udziałem
bloków budulcowych często stosuje się pochodne kwasu bromofluoroocto-
wego oraz bromodifluorooctowego, które wprowadzają do cząsteczki grupę
-CHF₂COOEt lub -CF₂COOEt. Przykładowo, dostępny handlowo 2-dieto-
ksyfosforylo-2-fluorooctan etylu **25** jest otrzymywany w reakcji Michaeli-

sa–Arbuzowa pomiędzy bromofluorooctanem etylu **26** a fosforynem trietylu (Rys. 16). Związek ten w reakcji z odpowiednim aldehydem, w obecności zasady (BuLi), umożliwił stereoselektywne otrzymanie α,β -nienasyconego- α -fluoroestru **27** o geometrii *E*. Stwierdzono jednak, że stereoselektywność reakcji może zależeć od rodzaju użytej zasady [3].



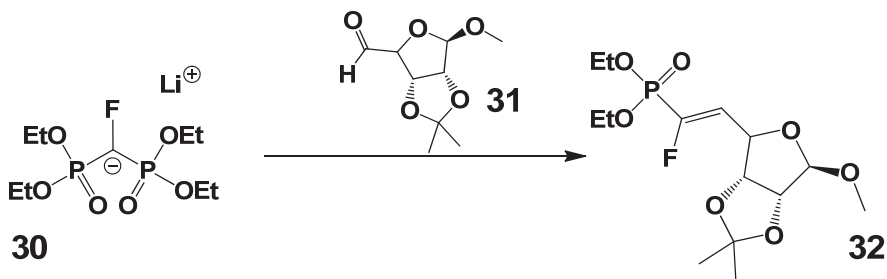
Rys. 16. Synteza oraz zastosowanie 2-dietoksyfosforylo-2-fluorooctanu etylu

W przypadku syntezy α,α -difluorowanych fosfonianów, wykorzystywanym reagentem jest bromek cynkoorganiczny, powstały z estru kwasu bromodifluorofosfonowego [3].



Rys. 17. Schemat syntezy pochodnych α,α -difluoroallilofosfonianowych

W wyniku reakcji bromku winylu **28** ze wspomnianym odczynnikiem cynkoorganicznym, katalizowanej związkami miedzi (I), powstaje produkt zawierający w cząsteczce fragment $-\text{CF}_2\text{P(O)(OEt)}_2$ **29** (Rys. 17) [3].

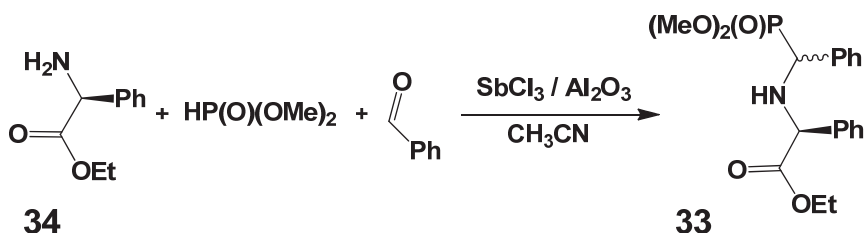


Rys. 18. Przykładowe zastosowanie pochodnych estrów kwasów α -fluorofosfonowych jako bloków budulcowych

Innym przykładem zastosowania α -fluorofosfonianów jako bloków budulcowych jest reakcja kondensacji anionu fluorometylenobisfosfonianu tetraetylu **30** z aldehydem **31**, w wyniku której otrzymano dwa izomery cukrowej pochodnej fluorowinylofosfonianu **32**, w tym głównie alkeno o geometrii *E* (Rys. 18) [1, 26, 27].

4.6. Inne metody syntezy pochodnych kwasów fosfonowych

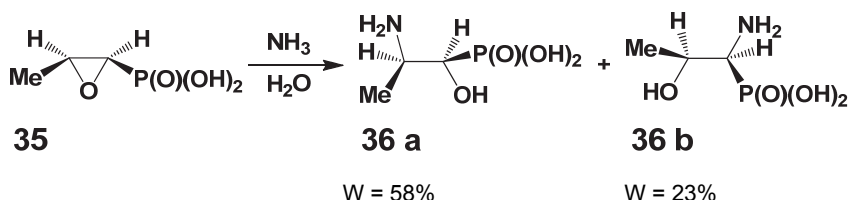
Pochodne α -aminofosfonianów można uzyskać na drodze reakcji *one-pot* (reakcji zachodzącej w jednym naczyniu pomiędzy kilkoma składnikami). W ten sposób przeprowadzono reakcję syntezy związku **33**, wychodząc z (*S*)-fenyloglicyny **34**, benzaldehydu i fosforynu dimetylu (Rys. 19). W obecności katalizatora – trójchlorku antymonu zaadsorbowanego na tlenku glinu – reakcja przebiegała z dobrą wydajnością, prowadząc do produktu będącego mieszaniną diastereoizomerów w stosunku 9 : 1 [7, 28].



Rys. 19. Synteza α -aminofosfonianów z wykorzystaniem reakcji *one-pot*

Ponadto stwierdzono, że zamiana aldehydu benzyłowego na inny aldehyd aryłowy (np. 4-aminobenzaldehyd lub 4-chlorobenzaldehyd) nie wpływa na stosunek otrzymanych diastereoizomerów. Natomiast modyfikacja w obrębie wyjściowego aminokwasu [zastąpienie (*S*)-fenyloglicyny (*S*)-fenyloalaniną] powoduje obniżenie diastereoselektywności reakcji (otrzymany stosunek diastereoizomerów 3 : 2) [7, 28].

Aminohydroksyfosfoniany można także otrzymać w wyniku reakcji otwierania pierścienia oksiranowego w warunkach nukleofilowych. Działając nasyconym wodnym roztworem amoniaku na fosfomycynę **35** (znany antybiotyk o działaniu bakteriobójczym), uzyskano mieszaninę dwóch związków **36a** i **36b** (Rys. 20) [7, 28, 29].



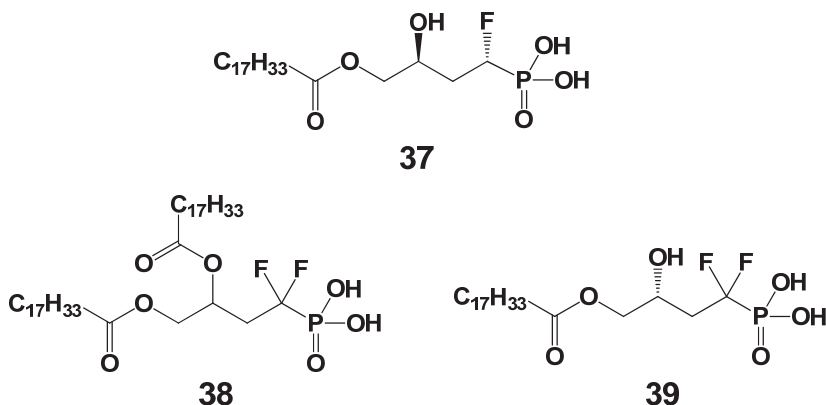
Rys. 20. Schemat syntezy aminohydroksyfosfonianu z zastosowaniem fosfomicyny jako substratu

Jednocześnie stwierdzono, że w określonych warunkach reakcji (czas reakcji 72 h, temperatura 50–60°C) można otrzymać produkt główny – kwas β -amino- α -hydroksyfosfonowy **36a** jako rezultat preferowanego ataku nukleofila na atom węgla w pozycji β w stosunku do grupy fosfonianowej [29].

5. Właściwości biologiczne przykładowych pochodnych kwasów fosfonowych

5.1. Analog kwasu lizofosfatydowego (LPA)

Kwasy lizofosfatydowe są fosforanami diacylogliceroli produkowanymi przez płytki krwi, których aktywność jest wywoływana przez swoiste receptory (receptory kwasu LPA). Udokumentowano, że ich rolę w przekazywaniu sygnału wykorzystano w chemioterapii nowotworów. Poszukiwania bardziej stabilnych analogów doprowadziły do syntezy kwasów mono- i difluoroalkilofosfonowych (Rys. 21) [3].

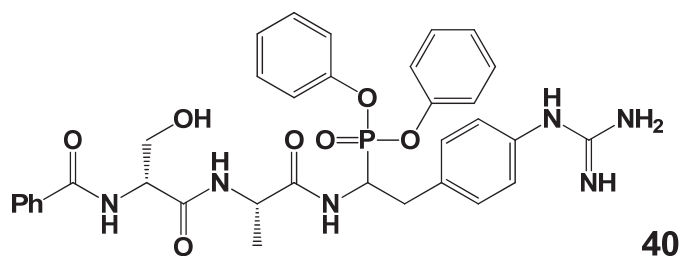


Rys. 21. Struktury analogów kwasu lizofosfatydowego

Stwierdzono, że aktywność fluorowanych analogów LPA zbliżona jest do endogennych ligandów, z wyjątkiem monofluorowanej pochodnej kwasu fosfonowego **37**, która wykazuje 1000-krotnie większą aktywność w stosunku do receptora LPA [3].

5.2. Inhibitor aktywatora plazminogenu typu urokinazy (uPA)

Aktywator plazminogenu typu urokinazy uważany jest za interesujący cel w projektowaniu nowych leków przeciwnowotworowych. W warunkach fizjologicznych uPA jest syntetyzowany głównie przez komórki śródbłonna, komórki mięśni gładkich, komórki nabłonkowe, fibroblasty, monocyty/makrofagi, a jego zawartość w osoczu krwi w trakcie doby utrzymuje się na stałym poziomie. Wzrost stężenia uPA jest wynikiem zwiększonej syntezy tego białka przez komórki nowotworowe. Szczególnie wysoki poziom uPA wykazano w złośliwych nowotworach tarczycy, szyjki macicy, jajników i piersi [30].



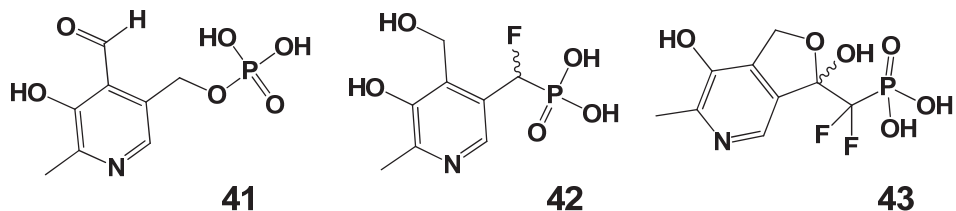
Rys. 22. Struktura inhibitora aktywatora plazminogenu typu urokinazy

W poszukiwaniach selektywnego i nieodwracalnego inhibitora uPA skupiono się m.in. na difenylfosfonianowych analogach odpowiedniego tripeptydu. Jednym z udokumentowanych związków posiadających silne zdolności hamowania urokinazowego aktywatora plazminogenu jest związek **40** przedstawiony na Rys. 22 [31].

5.3. Pochodne fosfonianowe jako analogi 5'-fosforanu pirydoksalu

5'-Fosforan pirydoksalu **41** to aktywny biologicznie składnik witaminy B₆, wykazujący działanie kardioprotekcyjne. Jest on naturalnie występującym związkiem podlegającym biologicznej degradacji, elimino-

wanym z organizmu wieloma drogami. W poszukiwaniach analogów mniej wrażliwych na światło i bardziej stabilnych *in vivo* niż macierzysty, skupiono się na syntezie analogów kwasów fosfonowych [32].

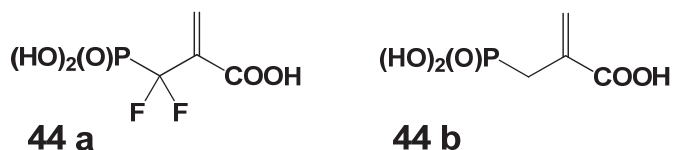


Rys. 23. Struktura 5'-fosforanu pirydoksalu oraz jego fluorofosfonowych pochodnych

Najbardziej interesujące pod względem możliwości ich wykorzystania jako mimetyków 5'-fosforanu pirydoksalu okazały się: pochodna kwasu α -monofluorofosfonowego **42** oraz kwasu α,α -difluorofosfonowego **43** (Rys. 23) [32].

5.4. Inhibitor syntazy 5-enolpirogroniano-szikimowo-3-fosforanowej (EPSP)

Ostatnio stwierdzono, że sól disodowa kwasu α,α -difluorofosfonowego **44a** (Rys. 24) w obecności S3P (3-fosforanu kwasu szikimowego) nieodwracalnie hamuje syntazę EPSP o 50% w ciągu 6 godzin, podczas gdy niefluorowany analog **44b** nie wykazuje względem enzymu żadnego działania [33].

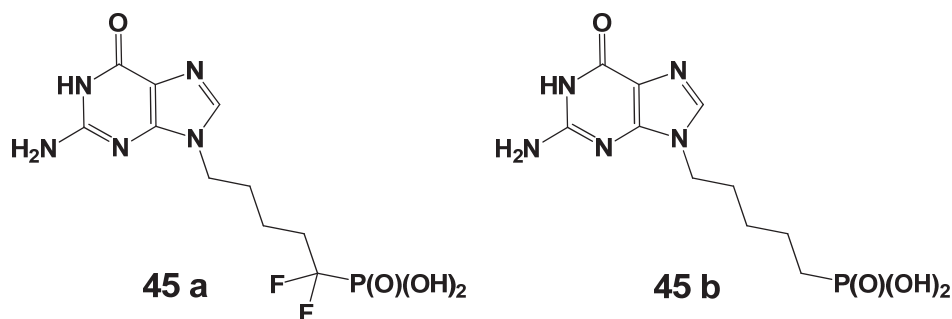


Rys. 24. Struktura pochodnej kwasu α,α -difluorofosfonowego oraz jej niefluorowanego analogu

Z tego względu związek **44a** wykorzystywany jest w rolnictwie jako środek do zwalczania chwastów, przez hamowanie zdolności wytwarzania aminokwasów aromatycznych niezbędnych do prawidłowego wzrostu roślin [33].

5.5. Inhibitor fosforylaza nukleozydów purynowych (PNP)

Fosforylaza nukleozydów purynowych (PNP) katalizuje odwrotną reakcję rozerwania wiązania glikozydowego w guanozynie i inozyynie (rybo- i deoksyrybonukleozydach), w obecności nieorganicznego ortofosforanu (P_i) jako drugiego substratu, do ich odpowiedniej wolnej zasady purynowej (guaniny i hipoksantyny) oraz α -D-1-fosforanu pentozy. Inhibitorom PNP przypisuje się możliwość leczenia chorób proliferacyjnych limfocytów T (takich jak białaczka limfocytów T), choroby GVHD występującej u pacjentów po przeszczepach narządów, niektórych chorób pasożytniczych, np. malarii. Inhibitory PNP znalazły także zastosowanie jako leki immunosupresyjne i środki chemioterapeutyczne [1].



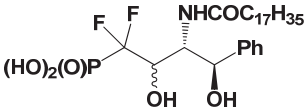
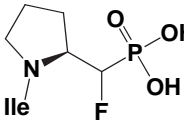
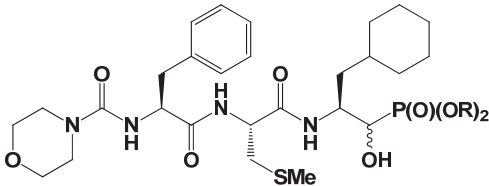
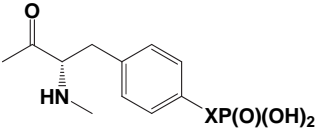
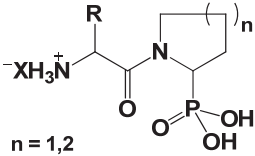
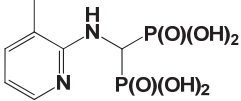
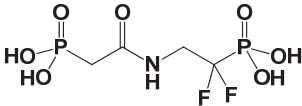
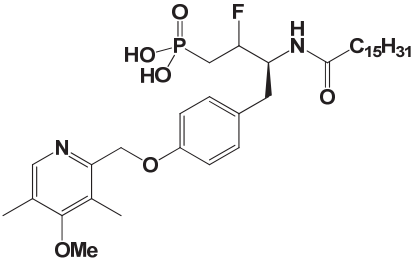
Rys. 25. Przykładowe struktury inhibitorów fosforylaza nukleozydów purynowych

W przypadku jednego z inhibitorów **45a** (zawierającego ugrupowanie α,α -difluorofosfonianowe) wykazano, że związek ten posiada 26 razy większe powinowactwo do enzymu i zdolność hamowania jego działania niż jego niefluorowany odpowiednik **45b** (Rys. 25) [1, 33].

5.6. Inne przykłady właściwości biologicznych pochodnych kwasów fosfonowych

Pochodne kwasów fosfonowych stanowią liczną grupę związków biologicznie czynnych. Zbiór przykładowych doniesień literaturowych ilustrujących zbadaną aktywność biologiczną przedstawiono w Tab. 2 [9–11, 21, 34].

Tabela 2. Przykładowe pochodne kwasów fosfonowych wykazujące określoną aktywność biologiczną

	inhibitor sfingomielinazy
	selektywny inhibitor dipeptydazy prolinowej
 <p>R = Me, Et, Bn</p>	inhibitory reniny
 <p>X = CHOH, CHF, CF₂</p>	inhibitory białkowej fosfatazy tyrozynowej
 <p>n = 1,2</p>	środki terapeutyczne zapobiegające odrzuceniu przeszczepionych tkanek
	inhibitor FPPS o potencjalnej aktywności przeciw pasożytniczej
	inhibitor kinazy fosfoglicerynowej
	inhibitor autotaksyny

6. Perspektywy

Istnieje wiele udokumentowanych przykładów aktywności biologicznej grupy pochodnych kwasów fosfonowych, zawierających grupę aminową, hydroksylową lub atom(y) fluoru w pozycji α w stosunku do grupy fosfonianowej, która w dużej mierze jest wynikiem ich podobieństwa do naturalnie występujących w organizmie fosforanów czy aminokwasów. W związku z tym znalazły one zastosowanie w medycynie, głównie jako leki działające na zasadzie wiązania się z centrum aktywnym enzymów, prowadząc w ten sposób do hamowania ich działania. Otrzymanie pochodnych kwasów fosfonowych zawierających odpowiednie grupy funkcyjne w cząsteczce daje szansę na znalezienie nowych, charakteryzujących się znaczną aktywnością biologiczną analogów tych naturalnych substancji. Szerokie perspektywy wiąże się także z możliwością substytucji atomu wodoru, tlenu czy grupy hydroksylowej atomem lub atomami fluoru, gwarantującymi zmianę właściwości fizykochemicznych, a co za tym idzie biologicznych zaprojektowanej cząsteczki. Natomiast synteza pochodnych aminofosfonianowych będących analogami aminokwasów daje nie tylko szansę znalezienia nowych inhibitorów enzymów, ale także możliwość wykorzystania tych związków np. jako potencjalnych leków zawierających łańcuch peptydowy czy zastosowania ich w syntezie organicznej.

Literatura

- [1] Romanenko V.D., Kukhar V.P. (2006) Fluorinated Phosphonates: Synthesis and Biomedical Application, *Chem. Rev.* 106, 3868–3935.
- [2] Romanenko V.D., Kukhar V.P. (2008) Fluorinated organophosphates for biomedical targets, *Tetrahedron* 64, 6153–6190.
- [3] Begue J.P., Bonnet-Delpon D. (2008) *Bioorganic and Medicinal Chemistry of Fluorine*, Wiley & Sons Press. Inc., Hoboken, New Jersey, 1–98, 223–278.
- [4] Nieschalk J., Batsanov A.S., O'Hagan D., Howard J.A.K. (1996) Synthesis of Mono-fluoro- and Difluoro- methylenephosphonate Analogues of *sn*-Glycerol-3-phosphate as Substrates for Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase and the X-Ray Structure of the Fluoromethylenephosphonate Moiety, *Tetrahedron* 52, 165–176.
- [5] Uneyama K. (2006) *Organofluorine Chemistry*, Blackwell Publishing Ltd., Oxford, 13.
- [6] Hunter L. (2010) The C–F bond as a conformational tool in organic and biological chemistry, *Beilstein J. Org. Chem.* 6, 1–14.
- [7] Ordóñez M., Rojas-Cabrera H., Cativiela C. (2009) An overview of stereoselective synthesis of α -aminophosphonic acids and derivatives, *Tetrahedron* 65, 17–49.
- [8] Ordóñez M., Viveros-Ceballos J.L., Cativiela C., Sayago F.J. (2015) An update on the stereoselective synthesis of α -aminophosphonic acids and derivatives, *Tetrahedron* 71, 1745–1784.

- [9] Mucha A., Kafarski P., Berlicki L. (2011) Remarkable Potential of the α -Amino-phosphonate/Phosphinate Structural Motif in Medicinal Chemistry, *J. Med. Chem.* 54, 5955–5980.
- [10] Odinets I.L., Artyushin O.I., Lyssenko K.A., Shevchenko N.E., Nenajdenko V.G., Röschenthaler G.V. (2009) Facile synthesis of cyclic α -perfluoroalkyl- α -amino-phosphonates, *J. Fluorine Chem.* 130, 662–666.
- [11] Palacios F., Alonso C., de los Santos J.M. (2005) Synthesis of β -amino-phosphonates and -phosphinates, *Chem. Rev.* 105, 899–931.
- [12] Murphy P.J. (2004) *Organophosphorus Reagents: A Practical Approach in Chemistry*, Oxford University Press, Oxford, 171–214.
- [13] Gali H., Prabhu K.R., Karra S.R., Katti K.V. (2000) Facile Ring-Opening Reactions of Phthalimides as a New Strategy to Synthesize Amide-Functionalized Phosphonates, Primary Phosphines, and Bisphosphines, *J. Org. Chem.* 65(3), 676–680.
- [14] Zygmunt J., Gancarz R., Lejczak B., Wieczorek P., Kafarski P. (1996) Stereoselective synthesis of 2-amino-1-hydroxy-3-phenylpropylphosphonic acid, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 6, 2989–2992.
- [15] Wróblewski A.E., Piotrowska D.G. (2000) Enantiomeric phosphonate analogs of the docetaxel C-13 side chain, *Tetrahedron: Asymmetry* 11, 2615–2624.
- [16] Wróblewski A.E., Piotrowska D.G. (1999) Enantiomeric phosphonate analogs of the paclitaxel C-13 side chain, *Tetrahedron: Asymmetry* 10, 2037–2043.
- [17] Wróblewski A.E., Piotrowska D.G. (1998) Phosphonate analogs of *N*-benzoyl- and *N*-*boc*-3-phenylisoserine, the taxol C-13 side chain, *Tetrahedron* 54, 8123.
- [18] Blackburn G.M., Parratt M.J. (1986) The synthesis of α -fluoroalkylphosphonates, *J. Chem. Soc., Perkin Trans 1*, 1425–1430.
- [19] Blackburn G.M., Kent D.E. (1981) A Novel Synthesis of α - and γ -fluoroalkyl-phosphonates, *Chem. Commun.* 511–513.
- [20] Blackburn G.M., Kent D.E. (1986) Synthesis of α - and γ -fluoroalkylphosphonates, *J. Chem. Soc., Perkin Trans 1*, 913–917.
- [21] Kolodiazhnyi O.I. (2005) Asymmetric synthesis of hydroxyphosphonates, *Tetrahedron: Asymmetry* 16, 3295–3340.
- [22] Liu P., Sharon A., Chu C.K. (2008) Fluorinated nucleosides: synthesis and biological implication, *J. Fluorine Chem.* 129, 743–766.
- [23] Champagne P.A., Desroches J., Hamel J.D., Vandamme M., Paquin J.F. (2015) Monofluorination of organic compounds: 10 years of innovation, *Chem. Rev.* 115, 9073–9174.
- [24] Radwan-Olszewska K., Palacios F., Kafarski P. (2011) Selective synthesis of α -fluoro- β -keto- and α -fluoro- β -aminophosphonates *via* electrophilic fluorination by selectfluor, *J. Org. Chem.* 76, 1170–1173.
- [25] Taylor S.D., Dinari A.N., Thadani A.N., Huang Z. (1996) Synthesis of benzylic mono(α,α -difluoromethylphosphonates) and benzylic bis(α,α -difluoromethylphosphonates) *via* electrophilic fluorination, *Tetrahedron Lett.* 37, 8089–8092.
- [26] Blackburn G.M., Parratt M.J. (1986) Synthesis of α -fluorovinylphosphonates, *J. Chem. Soc., Perkin Trans 1*, 1417–1424.
- [27] Blackburn G.M., Parratt M.J. (1982) The synthesis of α -fluorovinylphosphonates, *Chem. Commun.* 1270–1271.
- [28] Satish-Kumar A., Taneja S.C., Hundal M.S., Kapoor K.K. (2008) One-pot synthesis of α -aminophosphonates catalyzed by antimony trichloride adsorbed on alumina, *Tetrahedron Lett.* 49, 2208–2212.

- [29] Iorga B., Eymery F., Savignac P. (1999) The syntheses and properties of 1,2-epoxy-alkylphosphonates, *Synthesis* 2, 207–224.
- [30] Kołodziejczyk J., Talar B., Olas B., Wachowicz B. (2011) Urokinazowy aktywator plazminogenu w chorobach nowotworowych – rola, znaczenie diagnostyczne i aspekty terapii antynowotworowej, *Acta Haematol. Pol.* 42(4), 619–627.
- [31] Joossens J., Van der Veken P., Surpateanu G., Lambeir A.M., El-Sayed I., Ali O.M., Augustyns K., Haemers A. (2006) Diphenyl Phosphonate Inhibitors for the Urokinase-Type Plasminogen Activator: Optimization of the P4 Position, *J. Med. Chem.* 49, 5785–5793.
- [32] Pham V., Zhang W., Chen V., Whitney T., Yao J., Froese D., Friesen A.D., Diakur J.M., Haque W. (2003) Design and Synthesis of Novel Pyridoxine 5'-Phosphonates as Potential Antiischemic Agents, *J. Med. Chem.* 46, 3680–3687.
- [33] Qiu W., Burton D.J. (2013) Cuprous chloride promoted coupling reaction of diethoxyphosphinyldifluoromethylcadmium reagent with aryl iodides: A practical and convenient preparation of α,α -difluoro benzylic phosphonates, *J. Fluorine Chem.* 155, 45–51.
- [34] Turcheniuk K.V., Kukhar V.P., Röscenthaler G.V., Aceña J.L., Soloshonok V.A., Sorochinsky A.E. (2013) Recent advances in the synthesis of fluorinated amino-phosphonates and aminophosphonic acids, *RSC Adv.* 3, 6693–6716.

IMINOCUKRY: MIMETYKI WĘGLOWODANÓW BĘDĄCE INHIBITORAMI GLIKOZYDAZ – CHARAKTERYSTYKA I ZNACZENIE

MONIKA BILSKA-MARKOWSKA, HENRYK KORONIAK

Wydział Chemii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza
ul. Umultowska 89b, 61-614 Poznań
e-mail: mbilska@amu.edu.pl, koroniak@amu.edu.pl

Hasła do zapamiętania: iminocukry, mimetyki cukrów, alkaloidy, inhibitory, glikozydazy

Wykaz skrótów:

ASSC	– ang. <i>active-site-specific chaperone</i>
Bn	– grupa benzyłowa
DAB (D-AB1)	– 1,4-dideoksy-1,4-imino-D-arabinitol
DADP	– 2,5-dideoksy-2,5-imino-D-allitol
DALDP	– 2,5-dideoksy-2,5-imino-D-altritrol
DCM	– dichlorometan
DGDP	– 2,5-dideoksy-2,5-imino-D-glucitol
DMF	– dimetyloformamid
DMDP	– 2,5-dihydroksymetylo-3,4-dihydroksypirolidyna
DMJ	– 1-deoksymannonojirimycyna
DNJ	– deoksynoijirimycyna
ETZ	– enzymatyczna terapia zastępcza
α -HNJ	– α -homonojirimycyna
kat.	– katalizator
LSDs	– lizosomalne choroby spichrzeniowe (ang. <i>lysosomal storage diseases</i>)
NJ	– nojirimycyna
NPC	– choroba Niemann–Picka typu C
RCM	– ang. <i>ring-closing metathesis</i>
RhaD	– aldolaza L-ramnulozo-1-fosforanu

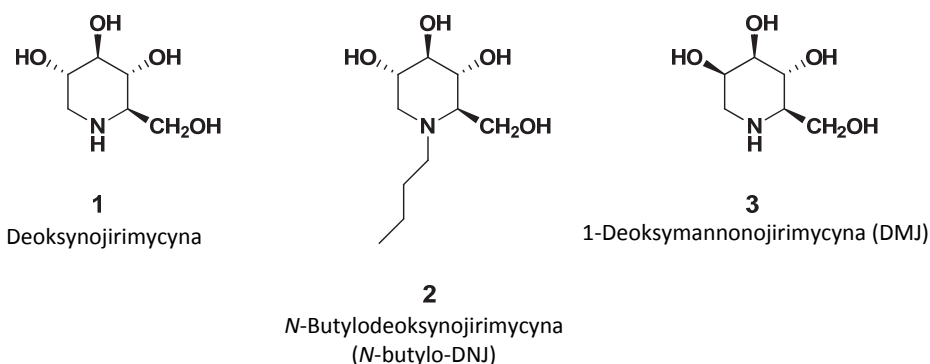
SN2	– substytucja nukleofilowa dwucząsteczkowa
THF	– tetrahydrofuran
WHO	– Światowa Organizacja Zdrowia (ang. <i>World Health Organization</i>)

1. Wprowadzenie

Węglowodany są najliczniej reprezentowaną, wśród trzech najważniejszych, grupą związków wchodzących w skład komórek organizmów żywych (pozostałe z nich to aminokwasy oraz lipidy). Nie jest zaskakujący fakt, iż są bardzo ważnym materiałem wyjściowym w syntezie organicznej, m.in. w produkcji leków, a poza tym wśród chemików wykorzystywane są również jako cenne narzędzia, np. pomocniki chiralne w syntezie asymetrycznej [1].

Iminocukry to analogi węglowodanów, występujące w przyrodzie lub otrzymane na drodze syntezy chemicznej, które w pierścieniu piranozowym lub furanozowym, w miejscu atomu tlenu, posiadają atom azotu [2a] (Rys. 1).

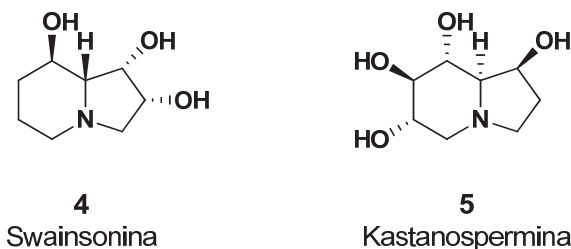
Ze względu na podobieństwo do węglowodanów występujących w organizmach żywych, iminocukry wykazują duży potencjał terapeutyczny w leczeniu wielu chorób, w których procesy przemiany oligosacharydów i glikokoniugatów, np. glikopeptydów, zostały zaburzone [2b].



Rys. 1. Przykłady iminocukrów

Bicykliczne związki pochodzenia naturalnego, takie jak: Swainsonina **4**, czy Kastanospermina **5** (Rys. 2), należące do alkaloidów, ze względu na

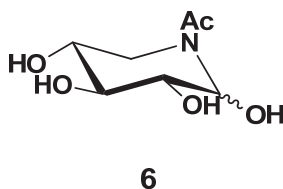
podobieństwo strukturalne do cukrów prostych, a dokładnie ze względu na ich licznie występujące w pierścieniach grupy hydroksylowe, są często zaliczane do iminocukrów. Są one zarówno inhibitorami glikozydaz, jak i znalazły zastosowanie jako środki przeciwbakteryjne, przeciwwirusowe oraz przeciwnowotworowe [2].



Rys. 2. Bicykliczne iminocukry pochodzenia naturalnego

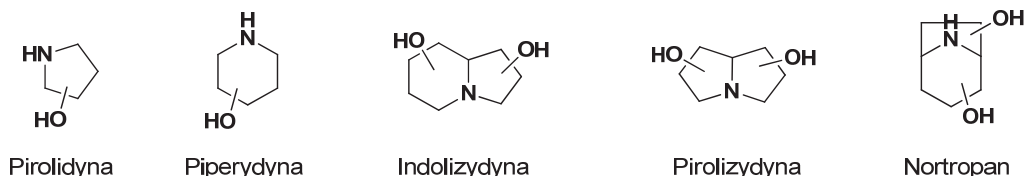
2. Strukturalna różnorodność iminocukrów oraz ich naturalne pochodzenie

Najwcześniejsze doniesienia dotyczące iminocukrów sięgają lat 60. XX w., kiedy to w trzech niezależnych laboratoriach badawczych: Paulsena [3], Hanessiana i Haskella [4] oraz Jonesa i Szarka [5] udało się otrzymać 5-acetamido-5-deoksy-D-ksylopiranozę **6** (Rys. 3), pierwszego reprezentanta tej klasy związków, zanim jeszcze wyizolowano jakikolwiek z nich ze źródeł naturalnych.



Rys. 3. 5-Acetamido-5-deoksy-D-ksylopiranoza – pierwszy syntetyczny iminocukier

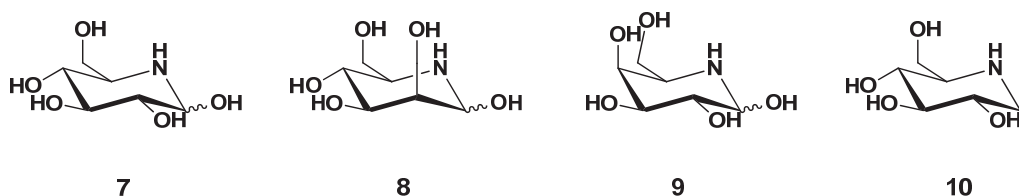
Naturalnie występujące mimetyki cukrów, zawierające w miejscu atomu tlenu, atom azotu, można podzielić na pięć klas ze względu na ich budowę strukturalną. Wśród nich wyróżnić można: polihydroksylowane piperidyny, pirolidyny, indolizydyny, pirolizydyny oraz nortropany (Rys. 4) [6].



Rys. 4. Strukturalna różnorodność iminocukrów

2.1. Piperydyny

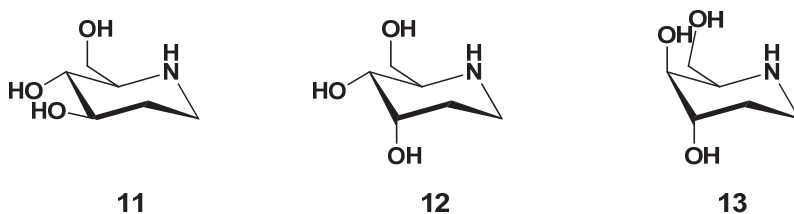
Pierwszym naturalnie występującym iminocukrem, wyizolowanym w 1966 r. ze szczepu bakterii *Streptomyces roseochromogenes* R-468 i *Streptomyces lavendulae* SF-425, była 5-amino-5-deoksy-D-glukopiranoza (Nojirimycyna, NJ 7) (Rys. 5), która poza właściwościami przeciwbakteryjnymi, okazała się również potencjalnym inhibitorem α - oraz β -glikozydaz [7]. Innymi przykładami iminocukrów, wyizolowanymi ze szczepów bakterii, które w pierścieniu przy atomie węgla C-1 posiadają grupę hydroksylową, są Nojirimycyna B (*manno*-NJ 8) oraz Galaktostatyna (*galakto*-NJ 9) (Rys. 5). Ze względu na ich niestabilność, przechowywane były w postaci adduktów bisiarczynów, a poza tym mogły być, na drodze katalitycznej hydrogenacji, przekształcone do 1-deoksy pochodnych [8a, 8b].



Rys. 5. Nojirimycyna oraz jej analogi

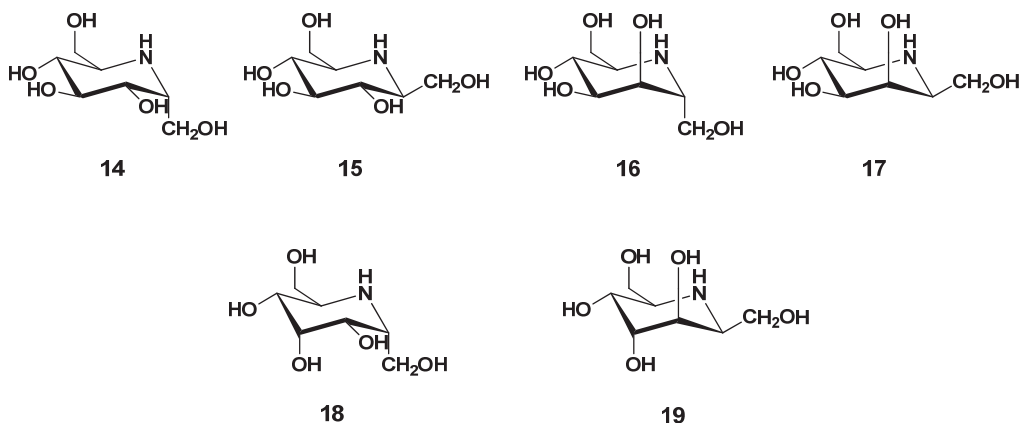
1-Deoxynojirimycyna DNJ 10 (Rys. 5) była pierwszym, syntetycznie otrzymanym z L-sorbofuranozy lub poprzez redukcję Nojirimycyny 7, iminocukrem, który, jak się później okazało, można było również wyizolować z korzenia oraz liści morwy białej (drzewa liściastego). Poza tym produkowany jest on przez szczepy bakterii *Bacillus* i *Streptomyces* [9]. Izolacja Nojirimycyny z materiału roślinnego posłużyła chemikom, zajmującym się alkaloidami, jako cenna wskazówka na drodze poszukiwania kolejnych pochodnych. Z nasion japońskiej gryki (*Fagopyrum esculen-*

tum) [10] oraz z owoców kasztanowca Moreton Bay (*Castanospermum australe*) [11] wyizolowano 1,2-dideoksynojirimycynę (Fagominę **11**), natomiast z liści i korzenia rośliny strączkowej *Xanthocercis zambei*, występującej w Afryce Południowej, udało się wyizolować jej epimery: 3-*epi*-fagominę **12** oraz 3,4-di-*epi*-fagominę **13** (Rys. 6), a także 3-*O*- β -D-glukopiranosylofagominę [12].



Rys. 6. Fagomina oraz jej epimery

Wśród iminocukrów o strukturze polihydroksylowanego pierścienia piperydynowego, które udało się wyizolować, są również pochodne z podstawnikiem przy atomie węgla C-1 (Rys. 7). Należy do nich m.in. α -homonojirimycyna (α -HNJ **14**) wyizolowana w 1988 r. z tropikalnej rośliny *Omphalea diandra* z rodziny *Euphorbiaceae* [13].



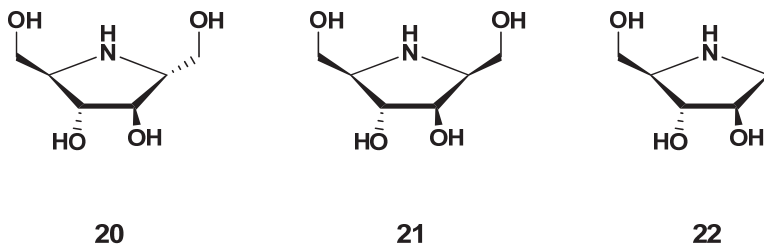
Rys. 7. Iminocukry piperydynowe

Odkryto ją również w jajach, larwach oraz dorosłych osobnikach neotropikalnej ćmy *Urania fulgens* z Panamy, której larwy żywią się wyżej

wspomnianą rośliną [14]. α -HNJ nie tak dawno, bo w latach 90. ubiegłego stulecia, wyizolowana została również z całej rośliny *Aglaonema treubii* oraz z cebulek *Hyaicinchus orientalis*, z których wyizolowano również izomery α -homonojirimycyny: β -homonojirimycynę **15**, α -homomannojirimycynę **16**, β -homomannojirimycynę **17**, α -homoallonojirimycynę **18**, β -homoaltronojirimycynę **19** (Rys. 7) [15–18].

2.2. Pirolidyny

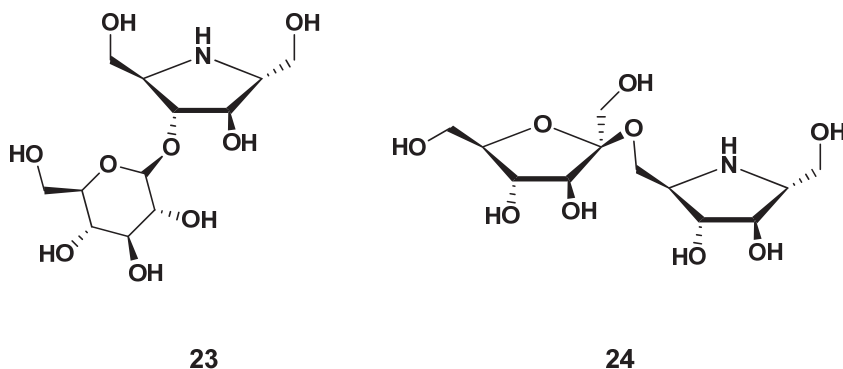
2,5-Dihydroksymetylo-3,4-dihydroksypirolidyna (2,5-dideoksy-2,5-imino-D-mannitol) **20** (DMDP) (Rys. 8), mimetyk β -D-fruktofuranozy, była pierwszym pirolidynowym iminocukrem wyizolowanym w 1976 roku z materiału roślinnego (liści *Derris elliptica*) [19], posiadającym właściwości przeciwwirusowe oraz owadobójcze, ale przede wszystkim będącym inhibitorem glikozydaz [20]. Kolejny potencjalny inhibitor α - oraz β -glikozydaz, 2,5-dideoksy-2,5-imino-D-glucitol **21** (DGDP), zsyntezowano w 1991 r., a następnie udało się go również wyizolować z tradycyjnych chińskich ziół, otrzymywanych m.in. z rośliny *Stemona tuberosa* [21]. Związek ten odznaczał się jednak słabymi właściwościami inhibicyjnymi w stosunku do α - oraz β -glikozydaz.



Rys. 8. Naturalnie występujące iminocukry pirolidynowe

Usunięcie jednej z grup hydroksymetylowych z cząsteczki DMDP pozwoliło otrzymać 1,4-dideoksy-1,4-imino-D-arabinitol **22** (DAB, D-AB1) (Rys. 8), który po raz pierwszy odkryto w owocach rośliny *Angylocalyx boutiqueanus*, występującej w Kenii [22]. Jest on potencjalnym inhibitorem fosforylazy glikogenu, enzymu odpowiedzialnego za odłączenie monomeru glukozy od łańcucha glikogenu w procesie fosforolizy, który stanowi pierwszy etap procesu glikogenolizy. Poza tym prowadzone są badania nad jego zastosowaniem jako leku w leczeniu cukrzycy typu II [23].

Wiele iminocukrów, zbudowanych z dwóch pierścieni, polihydroksylowanej piroolidyny, przypominającej cząsteczkę cukru w postaci furanozy oraz monomeru węglowodanu, zostało wyizolowanych z materiałów roślinnych w ostatnich latach. Są wśród nich m.in.: 3-*O*- β -D-glukopiranozylo-DMDP **23** oraz 1-*O*- β -D-fruktofuranazylo-DMDP **24** [24] (Rys. 9).



Rys. 9. Pochodne 2,5-dihydroksymetylo-3,4-dihydroksypiroolidyny (DMDP)

Wykazano, iż β -D-fruktozylowa pochodna 2,5-dideoksy-2,5-imino-D-mannitolu **20** (DMDP), oznaczona numerem **24** na Rys. 9 powyżej, posiada niższą aktywność inhibicyjną w stosunku do β -galaktozydaz w porównaniu z DMDP, ale jednocześnie jest dziesięciokrotnie lepszym inhibitorem trehalazy świńskiej nerki [24].

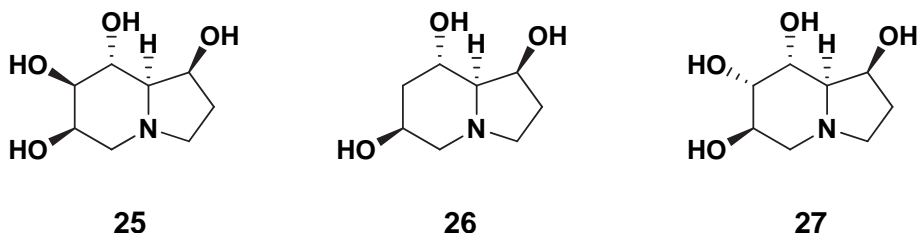
2.3. Indolizydyny

Indolizydyny to bicykliczne alkaloidy, w których połączone ze sobą pierścienie pięcio- oraz sześcioczłonowe strukturalnie nie wskazują na oczywisty związek z węglowodanami, jednak ich licznie występujące podstawniki hydroksylowe w pierścieniach są cechą, która zbliżyła tę klasę związków do pochodnych cukrów.

Zaburzenia neurologiczne, które wystąpiły wśród bydła długotrwale wypasanego na łąkach porośniętych rośliną strączkową *Swainsona canescens* w Australii, były bodźcem do podjęcia badań nad kolejną grupą iminocukrów, do której należy m.in. Swainsonina **4** (Rys. 2), powodująca powyższe stany chorobowe inwentarza [25a]. Wyizolowany z wyżej

wspomnianego materiału roślinnego trihydroksyindolizydynowy alkaloid okazał się inhibitorem lizosomalnej α -mannozydazy [25b]. Udało się zsyntezować epimery Swainsoniny, które posiadają właściwości inhibicyjne wobec α -glukozydazy, ale jednocześnie są nieaktywne wobec α -mannozydazy. Na podstawie tych obserwacji można potwierdzić, jak ważna jest konfiguracja absolutna atomów węgla w uzyskaniu odpowiedniej inhibicji [26].

W 1981 r. z nasion *Castanospermum australe*, a później również ze strączków *Alexa leiopetala* wyizolowano Kastanosperminę **5** (Rys. 2), którą można potraktować jako pochodną deoksynojirimycyny DNJ, w której pomiędzy grupą hydroksymetylową a atomem azotu występuje mostek etylenowy [27]. Pozostałymi alkaloidami wyizolowanymi z *Castanospermum australe* są epimery Kastanosperminy: 6-*epi*-kastanospermina **25** o *D-manno* konfiguracji w pierścieniu piperidyńowym, która jest dobrym inhibitorem ludzkiej α -mannozydazy, 7-deoksy-6-*epi*-kastanospermina **26** oraz 6,7-di-*epi*-kastanospermina **27** (Rys. 10), które wykazują właściwości inhibicyjne wobec amyloglukozy grzybów [28].



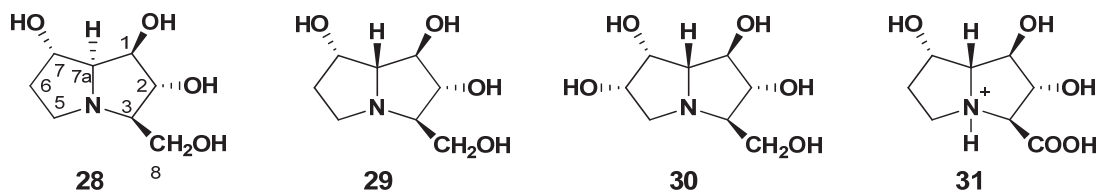
Rys. 10. Przykłady iminocukrów indolizydynowych

2.4. Pirolizydyny

Pierwszymi iminocukrami wyizolowanymi z roślin strączkowych *Alexa leiopetala* oraz *Castanospermum australe*, należącymi do grupy pirolizydyń (dwa połączone pierścienie pięcioczłonowe w strukturze cząsteczki), są Aleksina **28** oraz Australina **29** (7*a-epi*-aleksina) (Rys. 11). Ich pewne podobieństwo strukturalne do DMDP (2,5-dihydroksymetylo-3,4-dihydroksirolidyny) wyjaśnia zdolność inhibicji α -glukozydazy występującej w grzybach [29].

Casuarina **30** [30] (Rys. 11), występująca w korze drzewa *Casuarina equisetifolia* stosowanej w przypadku nowotworu płuc, wyizolowana z liści

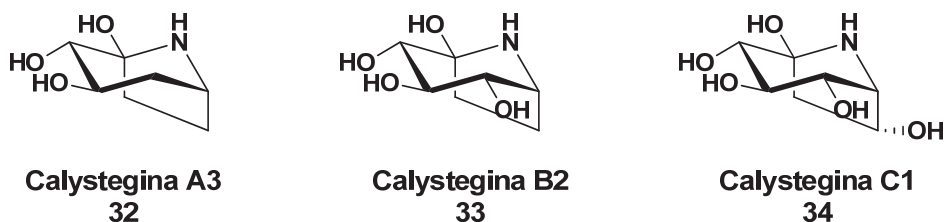
Eugenia jambolana, dobrze znanego drzewa w Indiach należącego do rodziny mirtowatych, którego liście, nasiona i owoce stosowane były w infekcjach oraz cukrzycy, jest kolejnym przykładem iminocukru pirolizydynowego. Należy do tej grupy również 7a-*epi*-aleksaflorina **31** (Rys. 11), będąca przykładem naturalnie występującego iminocukru, który w pierścieniu posiada podstawnik w postaci grupy karboksylowej. Został on wyizolowany z liści *Alexa grandiflora* [31].



Rys. 11. Przykłady iminocukrów pirolizydynowych

2.5. Nortropany

Najnowszą grupą związków, należąca do naturalnie występujących mimetyków cukrów, są alkaloidy tropanowe. Pomimo krótszej historii tych pochodnych, wszechstronnie i wyczerpująco zostały już udowodnione ich cenne właściwości farmakologiczne [32a, 32b]. Przedstawicielem tej grupy jest Calystegina (Rys. 12), która występuje w trzech postaciach w zależności od liczby podstawników hydroksylowych (od trzech do pięciu), które różnią się zarówno położeniem w pierścieniu, jak i stereochemią.



Rys. 12. Struktury iminocukrów nortropanowych

Została ona wyizolowana z podziemnych części oraz wyciągu z korzenia roślin: *Calystegia sepium*, *Convolvulus arvensis* oraz *Atropa belladonna* podczas badań prowadzonych nad poznaniem substancji produkowanych przez korzenie roślin i mających wpływ na organizmy żyjące w ryzosferze [33]. Ponadto wykryto ją również w jadalnych owocach i warzywach z rodzin *Convolvulaceae*, *Solanaceae* oraz *Moraceae*, czyli np. w młodych pędach ziemniaków czy bakłażanie. Calystegina B2, zgodnie z przeprowadzonymi badaniami, okazała się inhibitorem kompetycyjnym α -galaktozydazy aktywnej w wątrobach wszystkich organizmów. Ludzka β -ksylozydaza ulega inhibicji z wykorzystaniem wszystkich alkaloidów nortropanowych, natomiast Calystegina A3 wykazała selektywną inhibicję wobec β -glukozydazy aktywnej w wątrobie szczura. Badania aktywności inhibicyjnej tych związków wobec ludzkiej β -glukozydazy oraz α -galaktozydazy dają możliwość poznania ewentualnej toksyczności spożywanych w dużej ilości warzyw z rodzin wspomnianych powyżej [34].

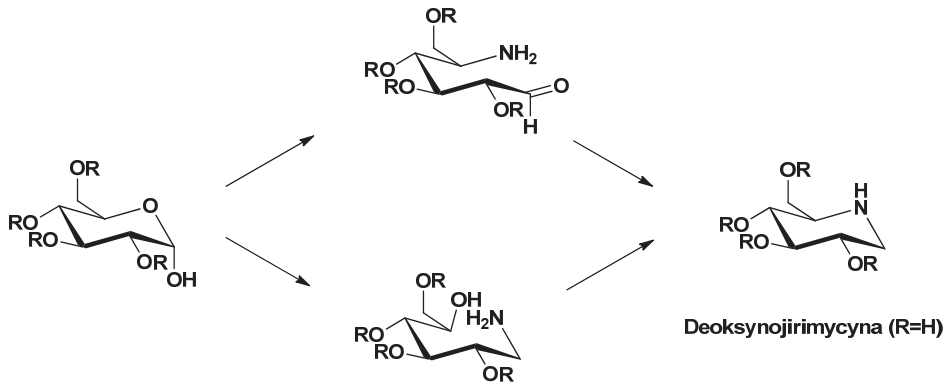
3. Metody otrzymywania iminocukrów na drodze syntezy chemicznej

Obiecujące biologiczne i terapeutyczne właściwości iminocukrów sprawiają, iż wśród wielu grup badawczych trwają prace nad skuteczną i łatwą syntezą tych związków oraz ich analogów. Pionierem w ustalaniu struktury naturalnie występujących iminocukrów, a także w odkrywaniu nowych metod ich otrzymywania na drodze syntezy organicznej był George Fleet [35].

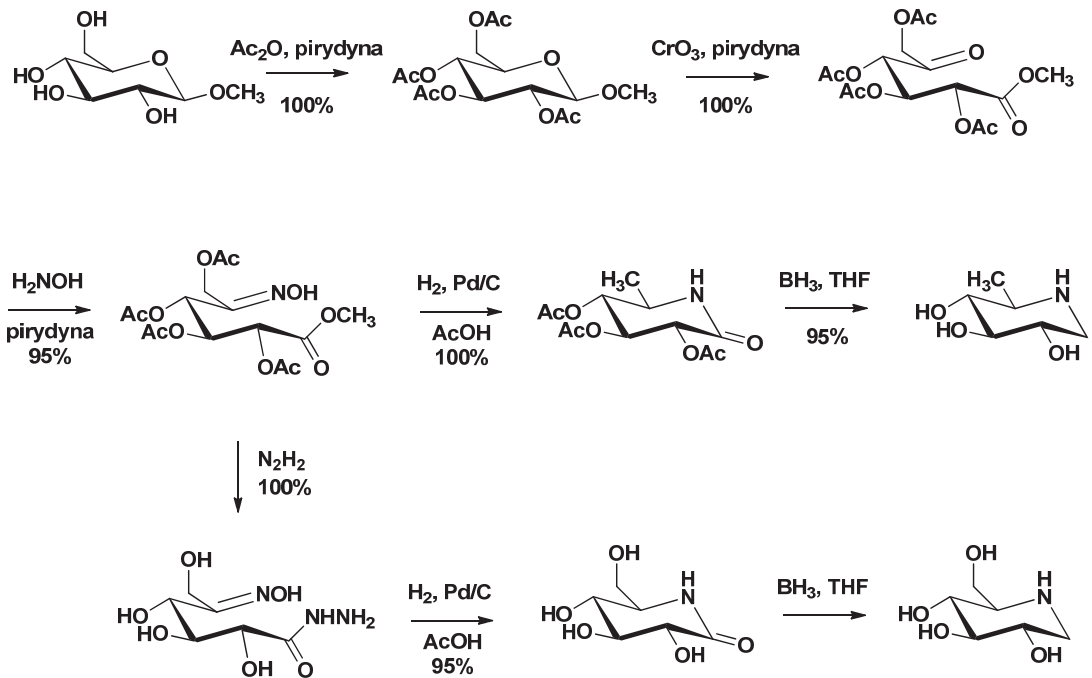
3.1. Zastosowanie cukrów jako związków wyjściowych

Analogiczna struktura iminocukrów w stosunku do cząsteczek „prawdziwych” węglowodanów skłania do zastosowania naturalnych cukrów jako substratów w reakcjach otrzymywania ich azotowych mimetyków (Rys. 13).

Poniższy schemat przedstawia ogólną reakcję otrzymywania Deosynojirimycyny z D-glukozy. W pierwszym etapie do cząsteczki substratu wprowadzona zostaje grupa aminowa w pozycję C5 lub C1, a następnie dochodzi do cyklizacji poprzez nukleofilowy atak na atom węgla C1 lub odpowiednio C5 [2a].



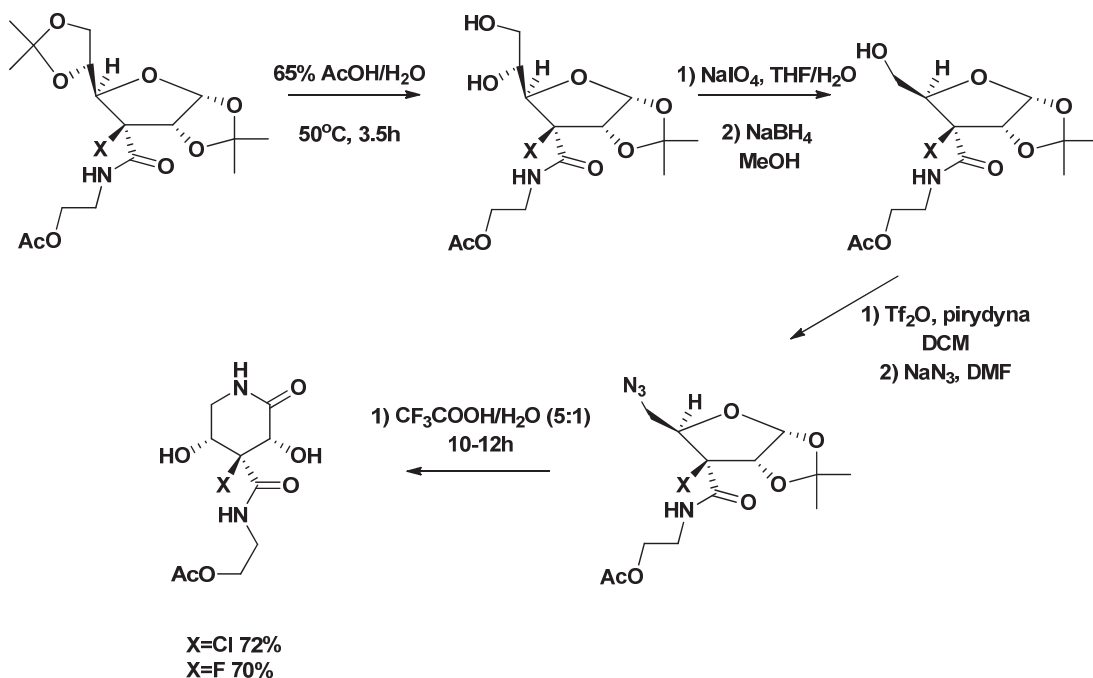
Rys. 13. Ogólna metoda przekształcenia cukru w iminocukier

Rys. 14. Transformacja metylo- β -D-glukopiranozydu, prowadząca do deoksy- oraz dideoksyno-jirimycyny

Innym podejściem jest transformacja metylo- β -D-glukopiranozydu do laktamów kwasu 5-amino-D-glukunowego, a następnie do dideoksy- oraz deoksyno-jirimycyny. Wymaga ona zastosowania reakcji utleniania za

pomocą trójtlenku chromu, w wyniku której otrzymujemy w pierwszej kolejności ester metylowy kwasu 5-ketoaldonowego, który następnie ulega redukcyjnemu zamknięciu pierścienia z wykorzystaniem hydroksylaminy (Rys. 14) [36].

Stosując jako związek wyjściowy cząsteczkę cukru, możemy otrzymać pochodne iminocukrów również na drodze wewnątrzcząsteczkowej reakcji Schmidta–Boyera (Rys. 15) [37].

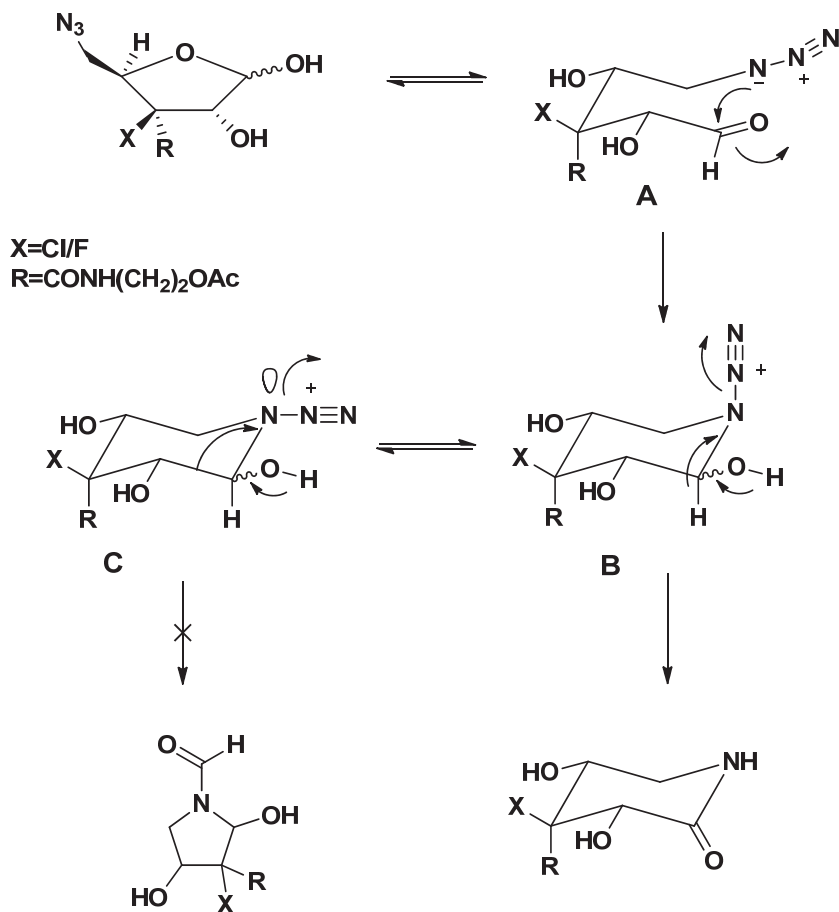


Rys. 15. Reakcja Schmidta–Boyera

Prawdopodobny mechanizm, według którego następuje utworzenie δ -laktamowej pochodnej iminocukru, przedstawiony został na Rys. 16.

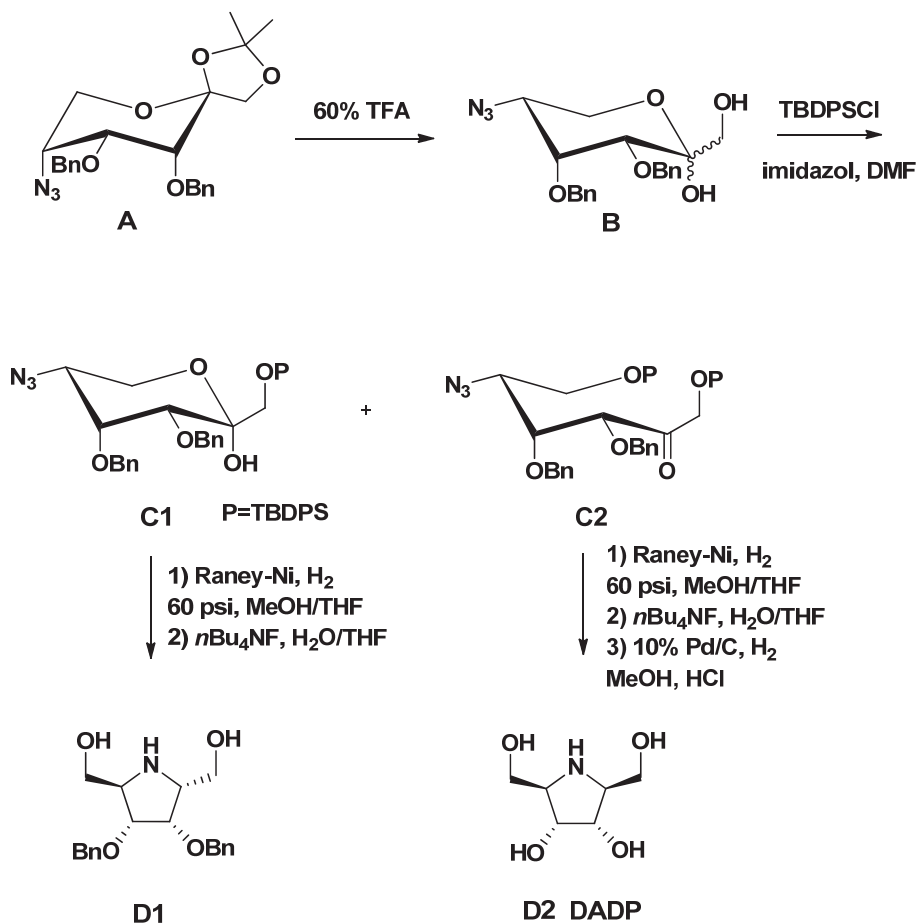
Grupa 1,2-acetonidowa, ulegając otwarciu, prowadzi do utworzenia hemiacetalu, który następnie osiąga łańcuchową strukturę **A**, w kolejnym etapie ulegając zamknięciu i utworzeniu nowego wiązania C–N, w nowo powstałej azydohydrynie **B**, będącej strukturą anomeryczną. W kolejnym etapie dochodzi do migracji atomu wodoru z jednoczesnym

odejściem cząsteczki N_2 , co prowadzi do utworzenia δ -laktamu. Konkurencyjna reakcja utworzenia azydohydryny **C** nie zachodzi, czego dowodem jest uzyskanie jednego produktu końcowego [37].



Rys. 16. Mechanizm wewnątrzcząsteczkowej reakcji Schmidta–Boyera

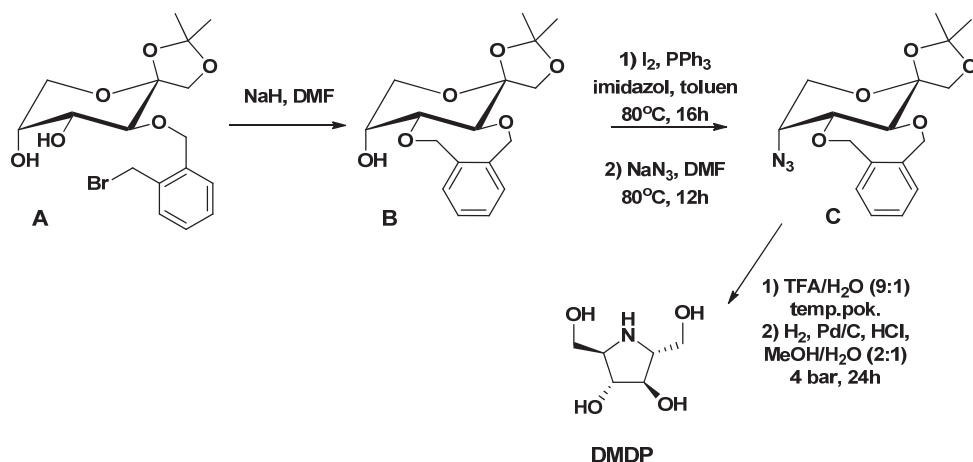
W syntezie polihydroksylowanych pirolidynowych pochodnych iminocukrów wykorzystuje się najpopularniejszą z metod, a mianowicie redukcyjne aminowanie. W grupie badawczej Izquierdo otrzymano 2,5-dideoksy-2,5-imino-D-allitol (DADP) **D2** oraz jego blokową pochodną 2,5-dideoksy-2,5-imino-D-altritrol (DALDP) **D1**, wykorzystując jako substrat pochodną 5-azydo-5-deoksy-D-psykozy **A** (Rys. 17) [38].



Rys. 17. Synteza pirolidynowych pochodnych iminocukrów na drodze redukcyjnego aminowania

Udoskonaloną syntezę naturalnie występujących polihydroksylowanych pochodnych pirolidynowych iminocukrów, czyli 2,5-dideoksy-2,5-imino-D-mannitolu (DMDP) oraz 2,5-dideoksy-2,5-imino-D-glucitolu (DGDP), zaprezentowano w grupie Fernándeza (Rys. 18). Wykorzystując jako substancję wyjściową eterową pochodną 3-*O*-(2-bromometylo)benzylo-D-fruktozy **A**, otrzymano w pierwszym etapie związek z wewnątrzcząsteczkowym benzyłowym systemem grup blokujących **B**, który w kolejnym etapie z zastosowaniem jodu oraz kolejno azydku sodu przekształcono w pochodną azydkową z zachowaniem wcześniejszej konfiguracji absolutnej atomu węgla C-5. Związek **B** w następnym etapie, czyli po odblokowaniu grup ochronnych oraz kolejno redukcyjnym aminowaniu z cyklizacją,

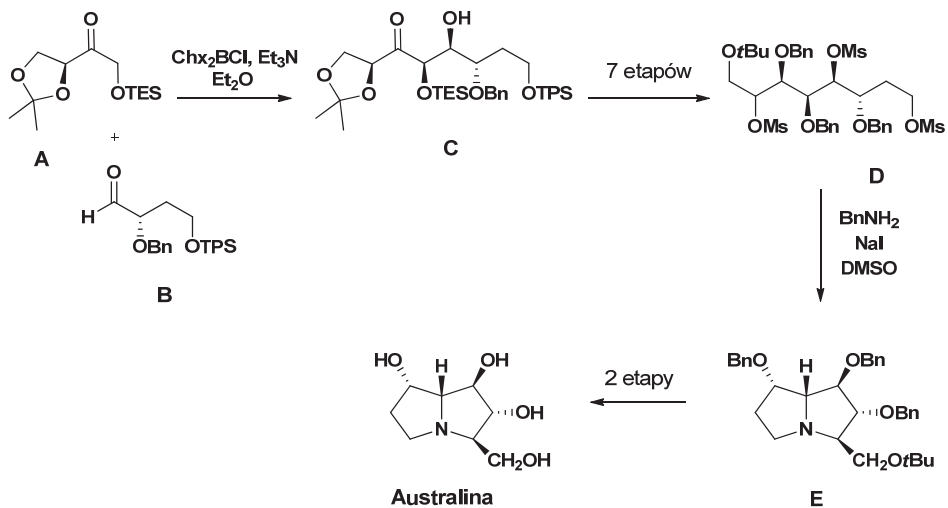
uległ przekształceniu do DMDP z bardzo zadowalającą wydajnością 93%. Kiedy w syntezie, w drugim etapie, zastosowano metodę otrzymywania azydku na drodze substytucji dobrej grupy opuszczającej: trifluorometa-nosulfonowej ($-OTf$), wyizolowano jako jedyny produkt 2,5-dideoksy-2,5-imino-D-glucitol (DGDP) [39].



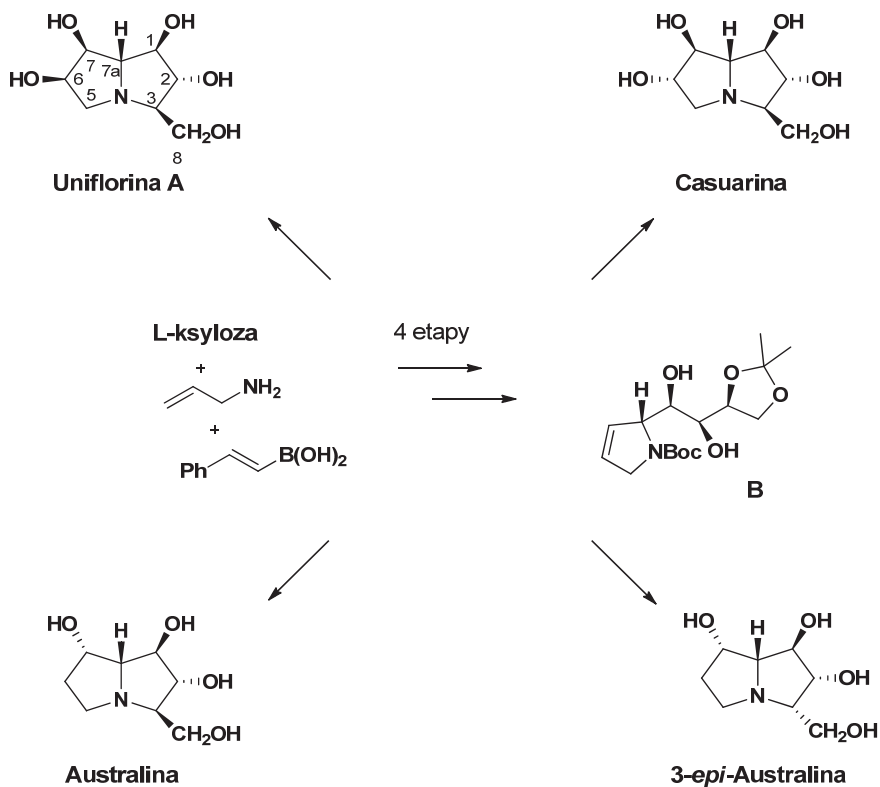
Rys. 18. Synteza 2,5-dideoksy-2,5-imino-D-mannitolu

W 2007 r. Ribes i współpracownicy opisali 11-etapową syntezę jednego z pyrrolizydynowych alkaloidów, zaliczanych do mimetyków węglowodanów – Australiny (Rys. 19) [40]. Kondensacja aldolowa czterowęglowych fragmentów, blokowanej pochodnej L-erytrulozy oraz aldehydowej pochodnej kwasu L-jabłkowego, doprowadziła do powstania polihydroksylowanego ketonu **C**, który w wyniku redukcji oraz po wprowadzeniu kilku grup ochronnych stał się prekursorem właściwej reakcji otrzymywania oczekiwanego iminocukru, czyli Australiny. Reakcja ta przebiegała zgodnie z mechanizmem następujących po sobie wewnątrzcząsteczkowych substytucji nukleofilowych S_N2. Ostatnim etapem syntezy była reakcja odblokowania grup ochronnych, przebiegająca w dwóch etapach. Wydajność reakcji była jednak bardzo niezadowalająca, gdyż wynosiła jedynie 10%.

Inne podejście do syntezy pyrrolizydynowych mimetyków węglowodanów przedstawiono w grupie australijskich chemików [41], którzy jako prekursor w syntezie zastosowali związek **B**, otrzymany na drodze 4-etapowej syntezy z L-ksylozy, alliloaminy oraz kwasu boronowego (*S*)-styrenu (Rys. 20). W pierwszym etapie syntezy prekursora zastosowano kombinację dwóch znanych w syntezie organicznej reakcji: Mannicha oraz Petasisa [42].



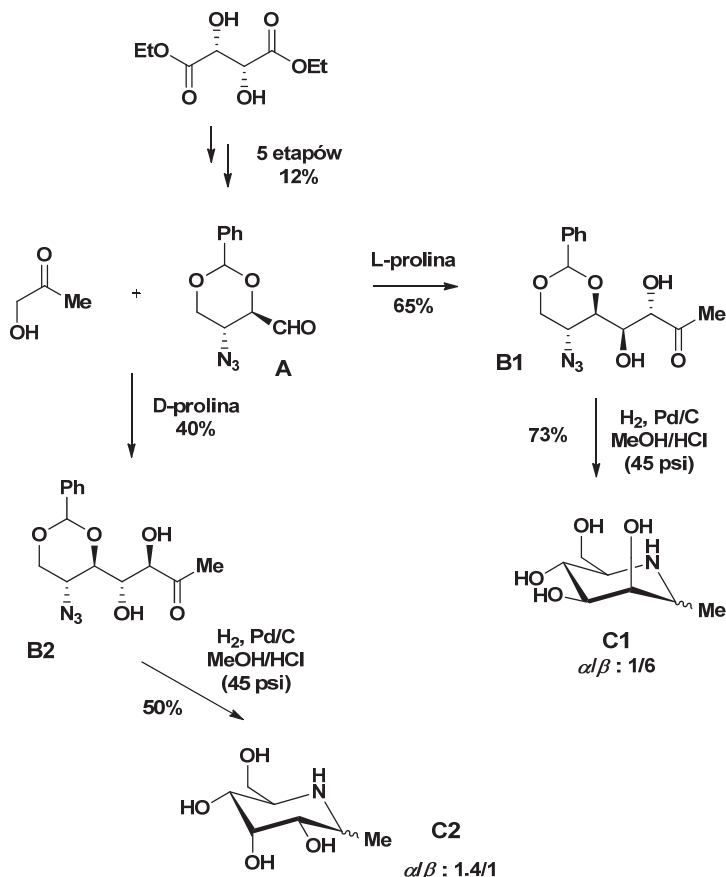
Rys. 19. Synteza Australiny



Rys. 20. Synteza Unifloriny A, Casuariny, Australiny oraz 3-epi-Australiny

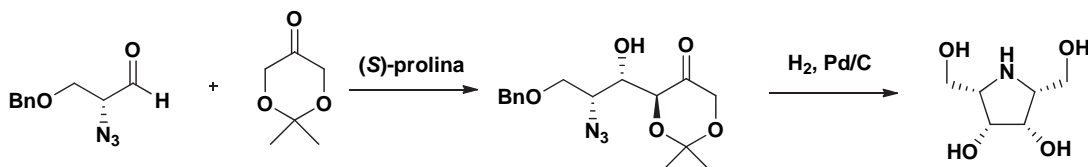
3.2. Synteza z wykorzystaniem cząsteczek niebędących cukrami

Fernández-Mayoralas zaproponował syntezę C1-alkilowych pochodnych iminocukrów na drodze kondensacji aldolowej związków niebędących węglowodanami, z wykorzystaniem katalizatora prolinowego. Reakcja hydroksyacetonu z otrzymanym wcześniej z winianu dietylu aldehydem **A**, w obecności L-proliny, pozwoliła na uzyskanie δ -azydoketonu **B1**, który w obecności kwasu chlorowodorowego uległ hydrogenacji z utworzeniem β -1-C-metylo-1-deoksymannoimirimycyny **C1** z dobrą stereoselektywnością. Ta sama reakcja z zastosowaniem D-proliny jako katalizatora pozwoliła na otrzymanie 1-C-metylo-1-deoksyallonoimirimycyny, jednak z dość słabym nadmiarem diastereoizomerycznym (1,4/1) (Rys. 21) [43].



Rys. 21. Synteza iminocukrów na drodze reakcji kondensacji aldolowej z wykorzystaniem katalizatora L-proliny

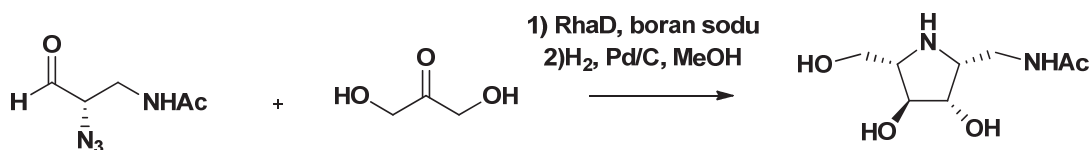
Okazuje się, że wykorzystanie katalizatora prolinowego jest również możliwe w enancjoselektywnej syntezie polihydroksylowanych piroolidynowych iminocukrów (Rys. 22).



Rys. 22. Zastosowanie (*S*)-proliny w reakcji syntezy iminocukru

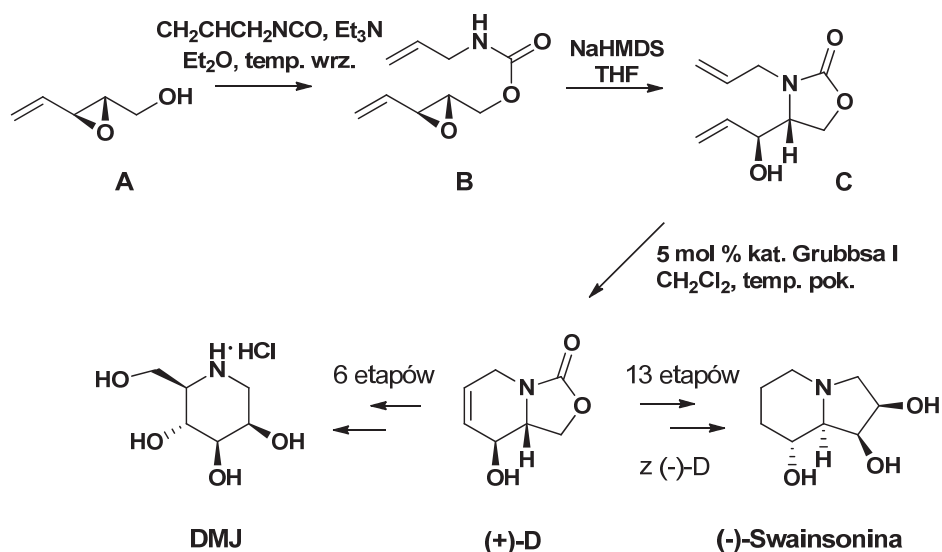
W powyższej reakcji zastosowano katalizator osadzony na stałym nośniku w celu zbadania wykorzystania niepolarnych rozpuszczalników w reakcji aldolowej katalizowanej (*S*)-proliną. Wykazano, iż zarówno w DMF, jak i w bezwodnym toluenie produktem reakcji azydoaldehydu z 2,2-dimetylo-1,3-dioksan-5-onem był aldol, powstający zgodnie ze stereochemią *anti*. Następnie reakcja redukcyjnej cyklizacji prowadziła do uzyskania piroolidynowej pochodnej iminocukru [44].

Do katalitycznych metod otrzymywania iminocukrów należy również synteza z zastosowaniem aldolazy L-ramnulozo-1-fosforanu (RhaD), w której dihydroksyaceton, reagując z azydoaldehydem w obecności katalizatora, tworzy aldol, ulegający w dalszym etapie redukcyjnej cyklizacji, prowadzącej do powstania L-iminoglucitolu. Reakcja ta zachodzi diastereo-selektywnie, przy użyciu jednego naczynia reakcyjnego (Rys. 23) [45].

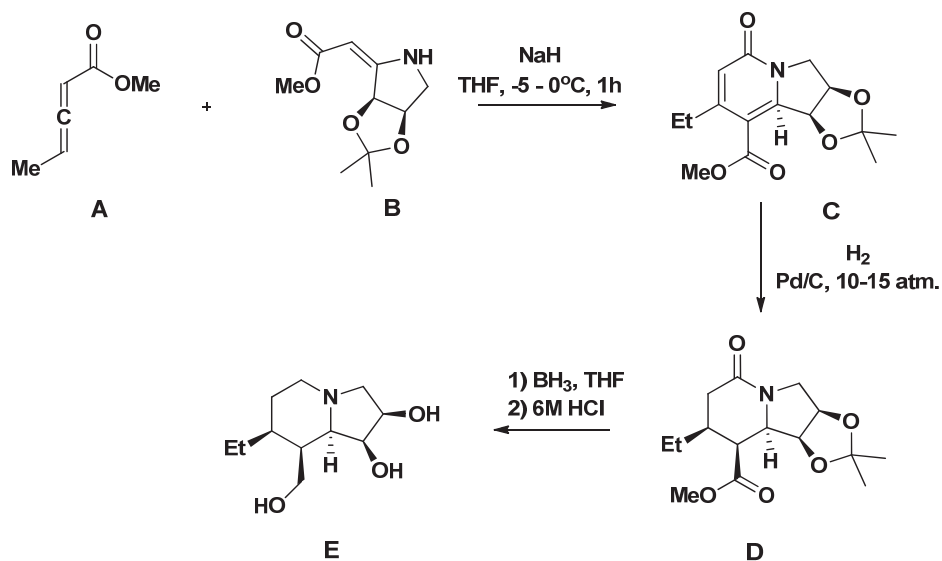


Rys. 23. Synteza z zastosowaniem aldolazy L-ramnulozo-1-fosforanu jako katalizatora

W konstruowaniu cząsteczek iminocukrów wykorzystuje się również katalizatory metaloorganiczne oraz metodologię RCM (ang. *Ring-Closing Metathesis*), czyli metatezy z zamknięciem pierścienia. Jako przykład może posłużyć publikacja Riera i jego współpr., w której zaprezentowano syntezę Deoksynojirimycyny (DMJ) oraz (–)-Swainsoniny [46]. Każdy z tych związków otrzymano z bicyklicznego karbaminianu **D** (Rys. 24) w kilku-etapowej syntezie.



Rys. 24. Synteza iminocukrów z wykorzystaniem katalizatorów metaloorganicznych



Rys. 25. Diastereoselektywna reakcja addycji Michaela

Wśród uniwersalnych metod otrzymywania polihydroksylowanych indolizydynowych pochodnych zastosowano również, jako kluczowy etap syntezy, reakcję diastereoselektywnej addycji Michaela. Cheng wraz

z grupą badawczą zaproponowali wykorzystanie w syntezie jako substraty: ester metylowy kwasu pentadienowego **A** oraz enaminoester **B** (Rys. 25) [47, 48].

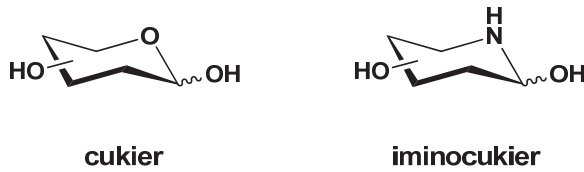
Otrzymany z dobrą wydajnością i diastereoselektywnością pirydynon **C** ulega w kolejnym etapie stereoselektywnej hydrogenacji, przekształcając się w indolizydynon **D**, którego redukcja prowadzi do indolizydyny **E**. Uniwersalność przedstawionej metody polega na tym, iż możliwe jest zastosowanie różnych elektrofilowych pochodnych (m.in. acetylenodikarboksylanu dimetylu oraz dichloroku malonylu), co pozwoli na otrzymanie indolizydynowych pochodnych o różnych podstawnikach w pierścieniu.

4. Zastosowanie iminocukrów w medycynie oraz innych gałęziach przemysłu

Iminocukry posiadają wiele właściwości, które są pozytywnymi atrybutami związków będących potencjalnymi prekursorami leków. Należy do nich przede wszystkim ich dobra rozpuszczalność w wodzie, która często jest problemem oraz tematem wielu dyskusji pomiędzy chemikami i biologami, biorącymi udział w projektowaniu cząsteczek będących kandydatami do bycia lekami. Iminocukry są związkami stabilnymi chemicznie, co jest cechą szczególnie ważną ze względu na możliwość dłuższego przechowywania leków i jest wymogiem stawianym badaczom projektującym farmaceutyki. Są poza tym związkami stabilnymi metabolicznie, co – jak można się spodziewać – jest związane z ich „wysocę naltlenioną” naturą i powoduje, że wydalane są zwykle w niezmienionej formie z moczem. Jak większość małych polarnych cząsteczek chemicznych, są dobrze przyswajane w organizmie [6]. Wymienione cechy odróżniają iminocukry od innych związków i podwyższają ich atrakcyjność jako komponentów w syntezie środków leczniczych.

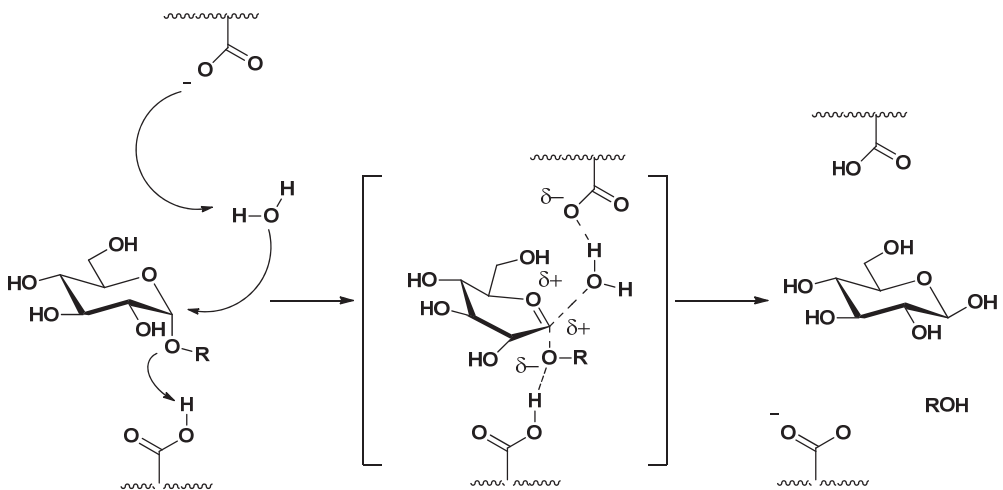
4.1. Inhibitory glikozydaz

Ze względu na analogiczną strukturę cukrów oraz iminocukrów (Rys. 26), te ostatnie mogą powodować inhibicję lub spowalniać aktywność hydrolaz glikozydowych (glikozydaz), czyli enzymów odpowiedzialnych w organizmach żywych za rozrywanie wiązań glikozydowych w polisacharydach, oligosacharydach czy glikozydach.



Rys. 26. Analogiczna struktura cukrów oraz iminocukrów

Przy fizjologicznym pH, atom azotu jest protonowany, perfekcyjnie naśladując jon oksoniowy stanu przejściowego, powstającego podczas hydrolizy katalizowanej przez glikozydazy (Rys. 27). Może to być wykorzystane w badaniach nad modyfikacją procesu glikozylacji w komórkach eukariotycznych, metabolizmu węglowodanów i glikokoniugatów, a także transportu cukrów w organizmie.



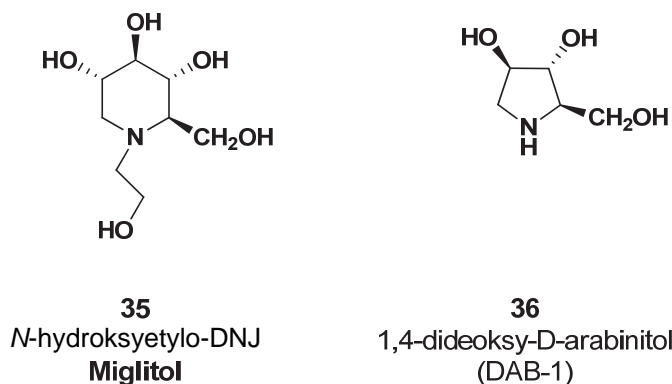
Rys. 27. Mechanizm działania hydrolaz glikozydowych z odwróceniem konfiguracji [49]

Zainteresowanie iminocukrami oraz ich właściwościami terapeutycznymi zapoczątkowała medycyna tradycyjna, wykorzystująca ekstrakty z ziół oraz innych roślin w leczeniu różnego typu dolegliwości. Przykładem może być ekstrakt z liści morwy białej (*Morus alba*), którego właściwości farmaceutyczne znane były już w odległej historii. Iminocukry obecne w liściach morwy białej hamują aktywność glikozydaz, czyli enzymów obecnych w jelicie, które rozkładają cukry złożone do cukrów prostych, a tym samym nie ulegają one wchłonięciu w układzie pokarmo-

wym. Stwierdzono, iż w liściach, łodydze, a także korze drzew morwy obecna jest m.in. 1-Deoksynojirimycyna **1** (Rys. 1) – silny inhibitor α -glukozydazy i α -amylazy ssaków, powodujący mniejsze wchłanianie glukozy i w konsekwencji obniżenie jej poziomu we krwi po posiłku [50].

Jak podaje Światowa Organizacja Zdrowia (WHO), cukrzyca jest jedną z najgroźniejszych chorób cywilizacyjnych i społecznych. Przez niektórych nazywana jest nawet epidemią obecnego wieku. Według prognoz, liczba i częstość zachorowań na tę chorobę wzrasta i może osiągnąć w 2035 roku ok. 590 mln chorych. Liczba osób z cukrzycą oszacowana na rok 2013 wynosiła 381,8 mln [51]. Powyższe dane wskazują, jak ważne są badania prowadzone w celu poszukiwania skutecznych, a jednocześnie tańszych leków na cukrzycę.

Pierwszym wprowadzonym na rynek w 1996 roku lekiem, będącym analogiem naturalnie występującej Deoksynojirimycyny DNJ, był Glyset 35 (Miglitol) (Rys. 28). Stosowany był w leczeniu cukrzycy typu II, a mechanizm jego działania polega na inhibicji występujących w jelicie α -1,4-glikozydaz, co prowadzi do redukcji glukozy wchłanianej z jelita. Poza tym działa również poprzez obniżanie poziomu glukozy w osoczu, bez ryzyka spowodowania stanu hipoglikemii [52].



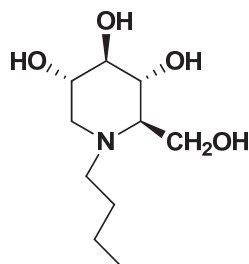
Rys. 28. Przykłady iminocukrów stosowanych w leczeniu cukrzycy typu II

Poziom glukozy we krwi może być również regulowany poprzez kontrolowanie procesu glikogenolizy. 1,4-Dideokso-1,4-imino-D-arabinitol (DAB-1) **36** (Rys. 28) jest innym potencjalnym lekiem na cukrzycę typu II, który może zmniejszać spontaniczną hiperglikemię poprzez inhibicję wątrobowej fosforylasy glikogenu [53]. Zdolność inhibicji występujących w jelicie disacharydaz oraz możliwość opóźnienia powstającej po

posiłku hiperglikemii przypisuje się Kastanosperminie **5** (Rys. 2) i w związku z tym zalicza się ją również do potencjalnych leków stosowanych w leczeniu cukrzycy oraz otyłości.

4.2. Lizosomalne choroby spichrzeniowe (LSDs)

Choroba Gauchera typu I jest genetycznie uwarunkowaną lizosomalną chorobą spichrzeniową, która spowodowana jest mutacją w genie kodującym białko enzymu β -glukocerebrozydazy, odpowiedzialnego za rozkład glukocerebrozydu do cukru (glukozy) oraz prostszej cząsteczki tłuszczu (ceramidu). Dysfunkcja enzymu prowadzi do gromadzenia się glukozyloceramidu w komórkach takich organów, jak śledziona, wątroba, czy nawet w kościach. W leczeniu choroby stosuje się enzymatyczną terapię zastępczą (ETZ) w zastrzyku, natomiast w przypadkach kiedy ta terapia jest niemożliwa, podaje się preparat Zavesca, którego substancją czynną jest Miglustat **36** (*n*-butylo-DNJ) (Rys. 29) [54]. Lek ten podaje się również w przypadku choroby Niemann–Picka typu C (NPC), innej z genetycznych autosomalnych chorób spichrzeniowych związanej z kumulowaniem się w organizmie glikosfingolipidów [55].



36

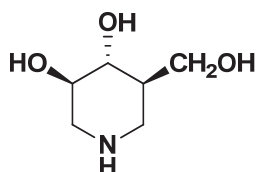
Miglustat

N-butylo-DNJ

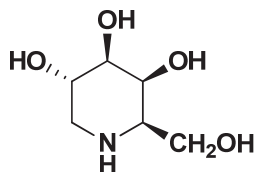
Rys. 29. Struktura substancji czynnej preparatu Zavesca

Do najnowszej generacji leków stosowanych w leczeniu lizosomalnych chorób spichrzeniowych, które są w fazie badań klinicznych, należą dwa iminocukry: *iso*-Fagomina **37** oraz Migalastat **38** (Rys. 30), które używa-

ne są jako pomocniki, posiadające zdolność wiązania się z częścią aktywną enzymu, umożliwiając tym samym osiągnięcie przez enzym odpowiedniej konformacji (ASSC – ang. *active-site-specific chaperone*) [56].



37
Plicera
iso-Fagomina

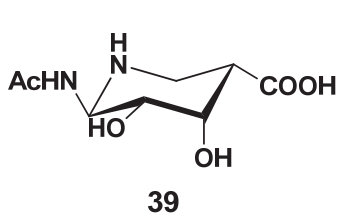


38
Migalastat
Deoksygalaktonojirimycyna

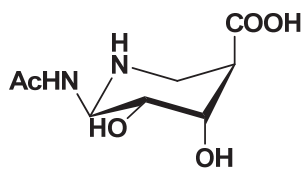
Rys. 30. Najnowsza generacja leków stosowanych w leczeniu lizosomalnych chorób spichrzeniowych

4.3. Aktywność przeciwwirusowa

Wśród iminocukrów nie brakuje również związków o właściwościach przeciwwirusowych. Należą do nich m.in. inhibitory neuramidazy (Rys. 31), enzymu odpowiedzialnego za rozkład kwasu sialowego, który jest glikoproteiną występującą w wirusach grypy [57].



39



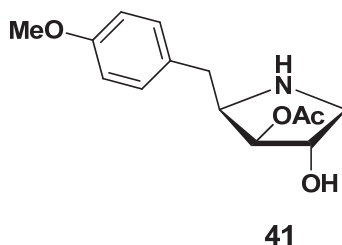
40

Rys. 31. Inhibitory neuramidazy

Blisko 50 iminocukrów zostało również przebadanych w kierunku aktywności przeciwko wirusowi HIV. Dwa z nich, inhibitory α -glikozydaz: 1-Deoksynojirimycyna DNJ oraz Kastanospermina, zostały zatwierdzone jako aktywne przy stężeniu 0,1–0,5 mg/ml [58].

4.4. Inne zastosowania

p-Metoksybenzylo podstawiona pochodna piroolidynowa – anizomycyna **41** (Rys. 32) – wyizolowana ze szczepu bakterii *Streptomyces griseolus*, znalazła zastosowanie przeciwko grzybom chorobotwórczym oraz pierwotniakom [59].



Rys. 32. Struktura anizomycyny

Iminocukry mogą również wpływać na wzrost roślin. Kastanospermina znalazła zastosowanie jako inhibitor procesu elongacji korzenia w roślinach [60].

Deoksynojirimycyna, homonojirimycyna, deoksymannojirimycyna, a także 2,5-dideoksy-2,5-imino-D-mannitol (DMDP) znacząco wpływają na dojrzewanie oraz zwyczajnie żywieniowe szeregu owadów szkodników, takich jak szarańcza, mszyca, gąsienice moli, które żywią się pąkami kwiatów, a także chrząszcze niszczące produkty zbożowe [61].

5. Perspektywy

Szerokie spektrum aktywności biologicznej oraz zaskakujące właściwości iminocukrów powodują, iż są to związki, które wzbudzają zainteresowanie wśród chemików, biologów, a także innych naukowców poszukujących cząsteczek, które można traktować jako potencjalne leki lub ich prekursorzy. Przedstawione w artykule zastosowania iminocukrów to jedynie wybrane przykłady spośród wielu, jakimi ta grupa związków się charakteryzuje. Aktualnie prowadzonych jest wiele projektów obejmujących syntezę analogów tych właśnie mimetyków węglowodanów, w celu uzyskania m.in. wyższej aktywności inhibicyjnej glikozydaz czy poznania kolejnych nowych właściwości. Dużym wyzwaniem może być wprowadze-

nie do struktury iminocukrów atomu lub atomów fluoru – pierwiastka, który wpływa na właściwości fizykochemiczne cząsteczki i może w związku z tym znacząco zmienić jej aktywność biologiczną.

Literatura

- [1] Boons G.-J., Hale K.J. (2000) *Organic Synthesis with Carbohydrates*, Blackwell Science, USA, Canada.
- [2] (a) Stuetz A.E. (1999) *Iminosugars as a Glycosidase Inhibitors: Nojirimycin and Beyond*, Wiley-VCH Verlag GmbH; (b) Winchester B.G. (2009) Iminosugars: from botanical curiosities to licensed drugs, *Tetrahedron: Asymmetry* 20, 645–651.
- [3] Paulsen H. (1962) Preparation of 5-acetamido-5-deoxy-D-xylopyranose, *Angew. Chem.* 74, 901.
- [4] Hanessian H., Haskell T.H. (1963) Synthesis of 5-acetamido-5-deoxypentoses. Sugar derivatives containing nitrogen in the ring, *J. Org. Chem.* 28, 2604–2610.
- [5] Jones J.K.N., Szarek W.A. (1963) Synthesis of a sugar derivative with nitrogen in the ring, *Can. J. Chem.* 41, 636–639.
- [6] Horne G., Wilson F.X., Tinsley J., Williams D.H., Store R. (2011) Iminosugars past, present and future: medicines for tomorrow, *Drug Discov. Today* 16, 107–118.
- [7] Asano N., Nash R.J., Molyneux R.J., Fleet G.W.J. (2000) Sugar-mimic glycosidase inhibitors: natural occurrence, biological activity and prospects for therapeutic application, *Tetrahedron: Asymmetry* 11, 1645–1680.
- [8] (a) Niwa T., Tsuruoka T., Goi H., Kodama Y., Itoh J., Inoue S., Yamada Y., Niida T., Nobe M., Ogawa Y. (1984) Novel glycosidase inhibitors, nojirimycin B and D-mannonic-delta-lactam. Isolation, structure determination and biological property, *J. Antibiot.* 37, 1579–1586; (b) Miyake Y., Ebata M. (1988) The Structures of a β -Galactosidase Inhibitor, Galactostatin, and Its Derivatives, *Agric. Biol. Chem.* 52, 661–666.
- [9] Murao S., Miyata S. (1980) Isolation and Characterization of a New Trehalase Inhibitor, S-GI, *Agric. Biol. Chem.* 44, 219–221.
- [10] Koyama M., Sakamura S. (1974) The Structure of a New Piperidine Derivative from Buckwheat Seeds, *Agric. Biol. Chem.* 38, 1111–1112.
- [11] Molyneux R.J., Benson M., Wong R.Y., Tropea J.H., Elbein A.D. (1988) Australine, a Novel Pyrrolizidine Alkaloid Glucosidase Inhibitor from *Castanospermum australe*, *J. Nat. Prod.* 51, 1198–1206.
- [12] Kato A., Asano N., Kizu H., Matsui K. (1997) Fagomine isomers and glycosides from *Xanthocercis zambeziaca*, *J. Nat. Prod.* 60, 312–314.
- [13] Kite G.C., Fellows L.E., Fleet G.W.J., Liu P.S., Scofield A.M., Smith N.G. (1988) α -Homonojirimycin [2,6-dideoxy-2,6-imino-D-glycero-L-gulo-heptitol] from *Omphalea diandra* L.: isolation and glucosidase inhibition, *Tetrahedron Lett.* 29, 6483–6485.
- [14] Kite G.C., Horn J., Romero J.T., Fellows L.E., Lees D.C., Scofield A.M., Smith N.G. (1990) α -Homonojirimycin and 2,5-dihydroxymethyl-3,4-dihydroxy-pyrrolidine: Alkaloidal glycosidase inhibitors in the moth *Urania fulgens*, *Phytochemistry* 29, 103–105.
- [15] Asano N., Nishida M., Kizu H., Matsui K., Watson A.A., Nash R.J. (1997) Homonojirimycin Isomers and Glycosides from *Aglaonema treubii*, *J. Nat. Prod.* 60, 98–101.
- [16] Asano N., Nishida M., Kato A., Kizu H., Matsui K., Shimada Y., Itoh T., Baba M., Watson A.A., Nash R.J., Lilley P.M.de Q., Watkin D.J., Fleet G.W.J. (1998) Homonoji-

- rimycin Isomers and *N*-Alkylated Homonojirimycins: Structural and Conformational Basis of Inhibition of Glycosidases, *J. Med. Chem.* 41, 2565–2571.
- [17] Asano N., Kato A., Miyauchi M., Kizu H., Kameda Y., Watson A.A., Nash R.J., Fleet G.W.J. (1998) Nitrogen-Containing Furanose and Pyranose Analogues from *Hyacinthus orientalis*, *J. Nat. Prod.* 61, 625–628.
- [18] Martin O.R., Compain P., Kizu H., Asano N. (1999) Revised Structure of a Homonojirimycin Isomer from *Aglaonema treubii*: First Example of a Naturally Occurring α -Homoallonojirimycin, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9, 3171–3174.
- [19] Welter A., Jadot J., Dardenne G., Marlier M. (1976) 2,5-Dihydroxymethyl 3,4-dihydropyrrolidine dans les feuilles de *Derris elliptica*, *Phytochemistry* 15, 747–749.
- [20] Wrodnigg T.M. (2002) From Lianas to Glycobiology Tools: Twenty-Five Years of 2,5-Dideoxy-2,5-imino-D-mannitol, *Monatsh. Chem.* 133, 393–426.
- [21] Liu K.K.-C., Kajimoto T., Chen L., Zhong Z.Y., Ichikawa Y., Wong C.H. (1991) Use of Dihydroxyacetone Phosphate Dependent Aldolases in the Synthesis of Deoxyzasugars, *J. Org. Chem.* 56, 6280–6289.
- [22] Nash R.J., Bell E.A., Williams J.M. (1985) 2-Hydroxymethyl-3,4-dihydropyrrolidine in fruits of *Angylocalyx boutiqueanus*, *Phytochemistry* 24, 1620–1622.
- [23] Henke B.R., Sparks S.M. (2006) Glycogen phosphorylase inhibitors, *Mini-Rev. Med. Chem.* 6, 845–857.
- [24] Kato A., Kato N., Miyauchi S., Minoshima Y., Adachi I., Ikeda K., Asano N., Watson A.A., Nash R.J. (2008) Iminosugars from *Baphia nitida* Lodd., *Phytochemistry* 69, 1261–1265.
- [25] (a) Colegate S.M., Dorling P.R., Huxtable C.R. (1979) A spectroscopic investigation of swainsonine: an α -mannosidase inhibitor isolated from *Swainsona canescens*, *Aust. J. Chem.* 32, 2257–2264; (b) Dorling P.R., Huxtable C.R., Colegate S.M. (1980) Inhibition of lysosomal α -mannosidase by swainsonine, an indolizidine alkaloid isolated from *Swainsona canescens*, *Biochem. J.* 191, 649–651.
- [26] Pastuszak I., Molyneux R.J., James L.F., Elbein A.D. (1990) Lentiginosine, a dihydroxyindolizidine alkaloid that inhibits amyloglucosidase, *Biochemistry* 29, 1886–1891.
- [27] Hohenschutz L.D., Bell E.A., Jewess P.J., Leworthy D.P., Pryce R.J., Arnold E., Clardy J. (1981) Castanospermine, A 1,6,7,8-tetrahydroxyoctahydroindolizine alkaloid, from seeds of *Castanospermum australe*, *Phytochemistry* 20, 811–814.
- [28] (a) Molyneux R.J., Roitman J.N., Dunnheim G., Szumilo T., Elbein A.D. (1986) 6-Epi-castanospermine, a novel indolizidine alkaloid that inhibits α -glucosidase, *Arch. Biochem. Biophys.* 251, 450–457; (b) Winchester B.G., Cenci di Bello I., Richardson A.C., Nash R.J., Fellows L.E., Ramsden N.G., Fleet G.W.J. (1990) The structural basis of the inhibition of human glycosidases by castanospermine analogues, *Biochem. J.* 269, 227–231; (c) Molyneux R.J., Tropea J.E., Elbein A.D. (1990) 7-Deoxy-6-epi-castanospermine, a Trihydroxyindolizidine Alkaloid Glycosidase Inhibitor from *Castanospermum australe*, *J. Nat. Prod.* 53, 609–614; (d) Molyneux R.J., Pan Y.T., Tropea J.E., Benson M., Kaushal G.P., Elbein A.D. (1991) 6,7-Di-epi-castanospermine, a tetrahydroxyindolizidine alkaloid inhibitor of amyloglucosidase, *Biochemistry* 30, 9981–9987.
- [29] Nash R.J., Fellows L.E., Dring J.V., Fleet G.W.J., Derome A.E., Hamor T.H., Scofield A.M., Watkin D.J. (1988) Isolation from *Alexa leiopetala* and X-ray crystal structure of alexine, (1R,2R,3R,7S,8S)-3-hydroxymethyl-1,2,7-trihydropyrrolizidine [(2R,3R,4R,5S,6S)-2-hydroxymethyl-1-azabicyclo[3.3.0]octan-3,4,6-triol], a unique pyrrolizidine alkaloid, *Tetrahedron Lett.* 29, 2487–2490.
- [30] (a) Nash R.J., Thomas P.I., Waigh R.D., Fleet G.W.J., Wormald M.R., Lilley P.M.de Q., Watkin D.J. (1994) Casuarine: A very highly oxygenated pyrrolizidine alkaloid, *Tetra-*

- hedron Lett.* 35, 7849–7852; (b) Wormald M.R., Nash R.J., Watson A.A., Bhadoria B.K., Langford R., Sims M., Fleet G.W.J. (1996) Casuarine-6- α -D-glucoside from *Casuarina equisetifolia* and *Eugenia jambolana*, *Carbohydr. Lett.* 2, 169–174.
- [31] Pereira de S.A.C., Kaplan M.A.C., Maia J.G.S., Gottlieb O.R., Nash R.J., Fleet G.W.J., Pearce L., Watkin D.J., Scofield A.M. (1991) Isolation of 7 α -*epi*-alexaflorine from leaves of *Alexa grandiflora* a unique pyrrolizidine amino acid with a carboxylic acid substituent at C-3, *Tetrahedron* 47, 5637–5640.
- [32] (a) Lounasmaa M. (1988) w: *The Alkaloids: Chemistry and Pharmacology*, Brossi A., red., Academic Press, New York, Vol. 33, 1–81; (b) Lounasmaa M., Tamminen T. (1993) w: *The Alkaloids: Chemistry and Pharmacology*, Cordell G.A., red., Academic Press, New York, Vol. 44, 1–115.
- [33] Tepfer D., Goldman A., Pamboukdjian N., Maille M., Lepingle A., Chevailler D., Denarie J., Rosenberg C. (1988) A plasmid of *Rhizobium meliloti* 41 encodes catabolism of two compounds from root exudate of *Calystegium sepium*, *J. Bact.* 70, 1153–1161.
- [34] Asano N., Kato A., Matsui K., Watson A.A., Nash R.J., Molyneux R.J., Hackett L., Topping J., Winchester B. (1997) The effects of calystegines isolated from edible fruits and vegetables on mammalian liver glycosidases, *Glycobiology* 7, 1085–1088.
- [35] Winchester B.G., Fleet G.W.J. (1992) Amino-sugar glycosidase inhibitors: versatile tools for glycobiologists, *Glycobiology* 2, 199–210.
- [36] Pistia-Brueggeman G., Hollingsworth R.I. (2001) A preparation and screening strategy for glycosidase inhibitors, *Tetrahedron* 57, 8773–8778.
- [37] Bhuma N., Vangala M., Nair R.J., Sabharwal S.G., Dhavale D.D. (2015) Halogenated D-xylo- δ -lactams: synthesis and enzyme inhibition study, *Carbohydr. Res.* 402, 215–224.
- [38] Izquierdo I., Plaza M.T., Rodriguez M., Franco F., Martos A. (2005) Polyhydroxylated pyrrolidines, III. Synthesis of new protected 2,5-dideoxy-2,5-iminoheptitols from D-fructose, *Tetrahedron* 61, 11697–11704.
- [39] Garca-Moreno M.I., Aguilar M., Mellet C.O., Fernández J.M.G. (2006) Intramolecular Benzyl Protection Delivery: A Practical Synthesis of DMDP and DGDP from D-Fructose, *Org. Lett.* 8, 297–299.
- [40] Ribes C., Falomir E., Carda M., Marco J.A. (2007) *Org. Lett.* 9, 1001–1004.
- [41] Ritthiwigrom T., Willis A.C., Pyne S.G. (2010) Total Synthesis of Uniflorine A, Casuarine, Australine, 3-*epi*-Australine, and 3,7-Di-*epi*-australine from a Common Precursor, *J. Org. Chem.* 75, 815–824.
- [42] Petasis N.A., Zavialov I.A. (1998) Highly Stereocontrolled One-Step Synthesis of *anti*- β -Amino Alcohols from Organoboronic Acids, Amines, and α -Hydroxy Aldehydes, *J. Am. Chem. Soc.* 120, 11798–11799.
- [43] Caldéron F., Doyagüez E.G., Fernandez-Mayoralas A. (2006) Synthesis of Azasugars through a Proline-Catalyzed Reaction, *J. Org. Chem.* 71, 6258–6261.
- [44] Doyagüez E.G., Calderón F., Sánchez F., Fernandez-Mayoralas A. (2007) Asymmetric Aldol Reaction Catalyzed by a Heterogenized Proline on a Mesoporous Support. The Role of the Nature of Solvents, *J. Org. Chem.* 72, 9353–9356.
- [45] (a) Sugiyama M., Hong Z., Whalen L.J., Greenberg W.A., Wong C.-H. (2006) Borate as a Phosphate Ester Mimic in Aldolase-Catalyzed Reactions: Practical Synthesis of L-Fructose and L-Iminocyclitols, *Adv. Synth. Catal.* 348, 2555–2559; (b) Sugiyama M., Hong Z., Liang P.-H., Dean S.M., Whalen L.J., Greenberg W.A., Wong C.-H. (2007) D-Fructose-6-Phosphate Aldolase-Catalyzed One-Pot Synthesis of Iminocyclitols, *J. Am. Chem. Soc.* 129, 14811–14817.

- [46] Martin R., Marruzzu C., Pericàs M.A., Riera A. (2005) General Approach to Glycosidase Inhibitors. Enantioselective Synthesis of Deoxymannojirimycin and Swainsonine, *J. Org. Chem.* 70, 2325–2328.
- [47] Jiang X.-P., Cheng Y., Shi G.-F., Kang Z.-M. (2007) A Versatile Strategy for Divergent and Diastereoselective Synthesis of Natural Product-Like Polyhydroxylated Indolizidines, *J. Org. Chem.* 72, 2212–2215.
- [48] Shi G.-F., Li J.-Q., Jiang X.-P., Cheng Y. (2008) Concise and divergent total synthesis of swainsonine, 7-alkyl swainsonines, and 2,8a-diepileptiginosine via a chiral heterocyclic enaminoester intermediate, *Tetrahedron* 64, 5005–5012.
- [49] Levy D.E., Fügedi P. (2006) *The Organic Chemistry of Sugars*, Taylor & Francis Group, LLC, New York, 401–404.
- [50] (a) Asano N., Yamashita T., Yasuda K., Ikeda K., Kizu H., Kameda Y., Kato A., Nash R.J., Lee H.S., Ryu K.S. (2001) Mulberry (*Morus alba*) leaves as human food: a new dimension of sericulture, *J. Agric. Food Chem.* 49, 4208–4213; (b) Zhang M., Chen M., Zhang H., Sun S., Xia B., Wu F.-H. (2009) *In vivo* hypoglycemic effects of phenolics from the root bark of *Morus alba*, *Fitoterapia* 80, 475–477.
- [51] Guariguata L., Whiting D.R., Hambleton I., Beagley J., Linnenkamp U., Shaw J.E. (2014) Global estimates of diabetes prevalence in adults for 2013 and projections for 2035 for the IDF Diabetes Atlas, *Diabetes Res. Clin. Pract.* 103, 137–149.
- [52] Drent M.L., Tollefsen A.T., Van Heudsen F.H., Hoenderdos E.B., Jonker J.J., Van der Veen E.A. (2002) Dose-dependent efficacy of miglitol, an alpha-glucosidase inhibitor, in type 2 diabetic patients on diet alone: results of a 24-week double-blind placebo-controlled study, *Diabetes Nutr. Metab.* 15, 152–159.
- [53] Latsis T., Andersen B., Agius L. (2002) Diverse effects of two allosteric inhibitors on the phosphorylation state of glycogen phosphorylase in hepatocytes, *Biochem. J.* 368, 309–316.
- [54] Dulsat C., Mealy N. (2009) Gaucher's disease, *Drugs Future* 34, 147–149.
- [55] Wraith J.E., Imrie J. (2009) New therapies in the management of Niemann-Pick type C disease: clinical utility of Miglustat, *Ther. Clin. Risk Manage* 5, 877–878.
- [56] Dulsat C., Mealy N. (2009) Isofagomine tartrate: glycogen phosphorylase inhibitor treatment of Gaucher's disease, *Drugs Future* 34, 23–25.
- [57] Nishimura Y., Umezawa Y., Kondo S., Takeuchi T., Mori K., Kijima-Suda I., Tomita K., Sugawara K., Nakamura K. (1993) Synthesis of 3-*epi*-siastatin B analogues having anti-influenza virus activity, *J. Antibiot.* 46, 1883–1889.
- [58] (a) Fleet G.W.J., Karpas A., Dwek R., Fellows L.E., Tyms A.S., Petursson S., Namgoong S.K., Ramsden N.G., Smith P.W., Son J.C., Wilson F., Witty D.R., Jacob G.S., Rademacher T.W. (1988) Inhibition of HIV replication by amino-sugar derivatives, *FEBS Lett.* 237, 128–132; (b) Karpas A., Fleet G.W.J., Dwek R., Petursson S., Namgoong S.K., Ramsden N.G., Jacob G.S., Rademacher T.W. (1988) Aminosugar derivatives as potential anti-human immunodeficiency virus agents, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 9229–9233.
- [59] Sobin B.A., Tanner F.W. Jr (1954) Anisomycin, a new antiprotozoan antibiotic, *J. Am. Chem. Soc.* 76, 4053.
- [60] Stevens K.L., Molyneux R.J. (1988) Castanospermine – a plant growth regulator, *J. Chem. Ecol.* 14, 1467–1473.
- [61] Simmonds M.S.J., Blaney W.M., Fellows L.E. (1990) Behavioral and electrophysiological study of antifeedant mechanism associated with polyhydroxy alkaloids, *J. Chem. Ecol.* 16, 3167–3177.

CHEMIA *H*-FOSFONIANÓW W SYNTEZIE ZWIĄZKÓW BIOLOGICZNIE AKTYWNYCH

TOMASZ JAKUBOWSKI, MARTA RACHWALAK,
JOANNA ROMANOWSKA*

* Instytut Chemii Bioorganicznej, Polska Akademia Nauk
ul. Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań

Wykaz skrótów:

- DMTr – grupa dimetoksytrytylowa
PvCl – chlorek piwaloilu; chlorek kwasu 2,2-dimetylopropanowego
TMSCI – chlorek trimetylosililu
AZT – 3'-azydo-3'-deoksytymidyna
Thy – tymina
Py – pirydyna
ZChKN – Zakład Chemii Kwasów Nukleinowych

1. Wprowadzenie

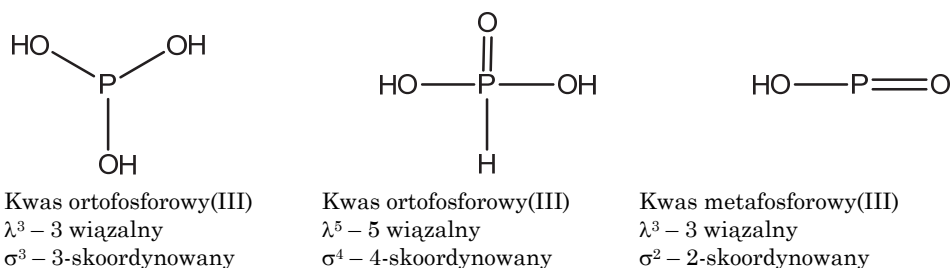
Fosfor jest niezwykle ważnym pierwiastkiem w szeroko pojętej chemii biologicznej. Szczególnym zainteresowaniem cieszą się organiczne połączenia fosforu, odgrywające istotne role w funkcjonowaniu organizmów żywych, jak chociażby nukleotydy i zbudowane z nich kwasy nukleinowe – nośniki informacji genetycznej. W celu badania właściwości związków fosforoorganicznych stosuje się dwie główne drogi ich otrzymywania: izolowanie z komórek naturalnie zawierających daną substancję lub zmodyfikowanych w celu jej wytwarzania oraz synteza chemiczna. Każda z tych dróg ma pewne zalety i wady. Korzystanie z biosyntezy gwarantuje nam uzyskanie konformacji natywnych, co ma ogromne znaczenie zwłaszcza dla dużych cząsteczek, których nie tylko konfiguracja, ale i konformacja istotnie wpływa na właściwości biologiczne. Obecnie wiadomo jednak, że również czą-

steczki syntezowane w laboratorium chemicznym przyjmują konformację natywną, jeśli zapewni im się warunki identyczne lub bardzo zbliżone do panujących w komórce. Bardzo ważną rolę odgrywają w tym takie czynniki, jak: rozpuszczalnik, odczyn, stężenia jonów, obecność innych indywiduów niejonowych czy temperatura. O ile biosynteza jest bardzo wydajna i znacząco prostsza dla makrocząsteczek, o tyle dla cząsteczek niewielkich często szybsza, wydajniejsza i tańsza wydaje się synteza chemiczna. To powoduje, że mimo prężnego rozwoju biotechnologii, nadal ważną i wartą rozwoju jest chemia organiczna, zwłaszcza jej gałąź obalająca teorię *vis vitalis*.

Jedną z wielu grup badanych związków biologicznie aktywnych są nukleotydy i ich analogi, stosowane w terapiach antywirusowych i antynowotworowych. Ich syntezę prowadzi się wykorzystując chemię fosforu(V) i fosforu(III). W niniejszym opracowaniu zostaną szczegółowo omówione właściwości i zastosowanie związków fosforu(III) w otrzymywaniu substancji przeznaczonych do zwalczania HIV.

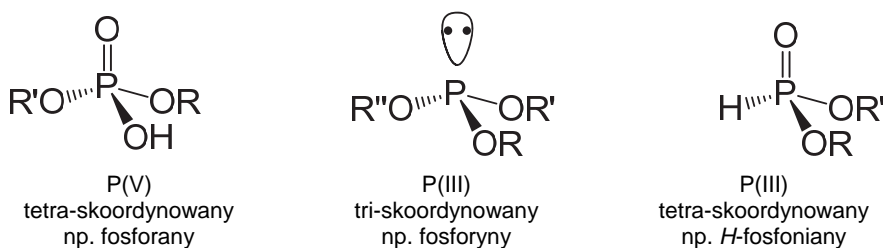
2. Wybrane aspekty chemii H-fosfonianów

Fosfor cechuje się niezwykłą różnorodnością tworzonych połączeń z tlenem i wodorem, ukazującą się zwłaszcza w kwasach fosforowych. Atom centralny występuje w nich na różnych stopniach utlenienia, jak również na danym stopniu utlenienia w inny sposób zaaranżowane są atomy wodoru i grupy wodorotlenowe. Najczęstszą liczbą koordynacyjną atomu centralnego jest 4, jednak znane są kwasy o liczbach 2 i 3. Pomiędzy atomami fosforu mogą powstawać wiązania bezpośrednie oraz przez atom tlenu, co prowadzi do kwasów polifosforowych. Poniżej (Rys. 1) przedstawiono przykłady kwasów różniących się między sobą liczbą koordynacyjną i/lub wiązalnością atomu centralnego.



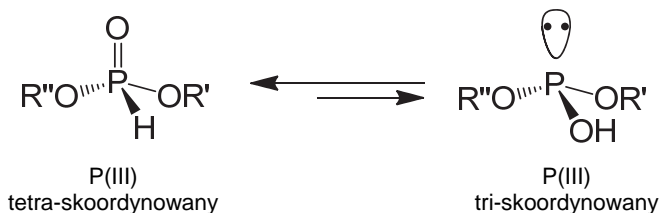
Rys. 1. Przykłady kwasów fosforowych

Z powyższego wynika, że kwasy fosforu mogą występować w różnych formach strukturalnych. Różnice w liczbie wiązań, liczbie koordynacyjnej, jak i w rodzaju przyłączonych do atomu centralnego atomów innych pierwiastków przekładają się na właściwości chemiczne kwasów. Najwyraźniej obserwuje się to przy porównaniu związków fosforu(V) i fosforu(III) (Rys. 2).



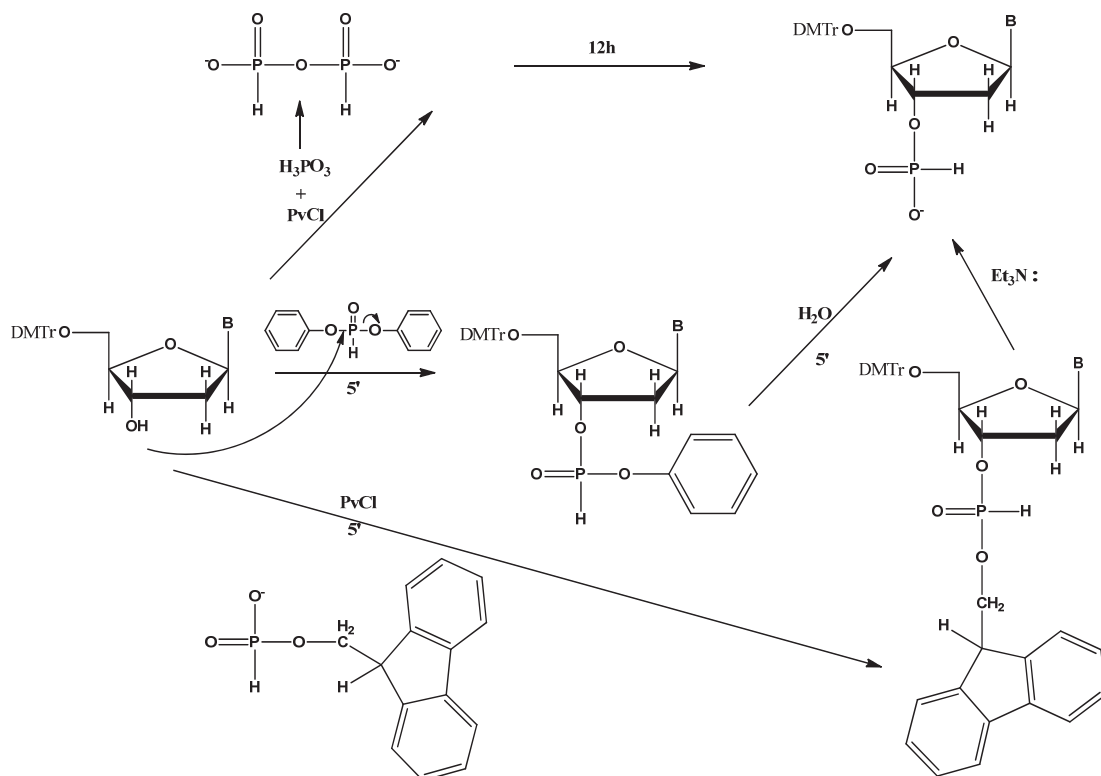
Rys. 2. Porównanie związków fosforu(III) i fosforu(V)

Fosforany mają tetraedryczną geometrię. Atom fosforu jest twardym elektrofilowym centrum i reaguje z twardymi nukleofilami. Triestry fosforynowe o strukturze trygonalnej piramidy posiadają wolną parę elektronową na centrum fosforowym, stąd atom fosforu jest zasadowym i miękkim centrum, reagującym głównie z miękkimi elektrofilami. Może reagować z nukleofilami, kiedy są sprotonowane lub gdy triester zawiera podstawniki wyciągające elektrony. Diestry *H*-fosfonianowe przez tetraedryczną strukturę wykazują podobieństwo do związków P(V), ale +3 stopień utlenienia upodabnia je do związków P(III); dlatego, tak jak w P(V), centrum fosforowe jest elektrofilowe, jednak przez istnienie w roztworze dwóch form tautomerycznych może być też nukleofilowe. Poniższy Rys. 3 przedstawia równowagę dwóch form tautomerycznych pochodnych *H*-fosfonianowych [1, 2].



Rys. 3. Formy tautomeryczne diestrów kwasu *H*-fosfonowego

W roztworach przeważa zdecydowanie forma tetra-skoordynowana. Jednak bardzo łatwo można przesunąć równowagę w stronę tri-skoordynowanej formy poprzez zmianę środowiska na zasadowe. Powstająca wówczas cząsteczka posiada wolną parę elektronową na atomie fosforu, a to umożliwia przeprowadzenie na ten atom ataku elektrofilowego.



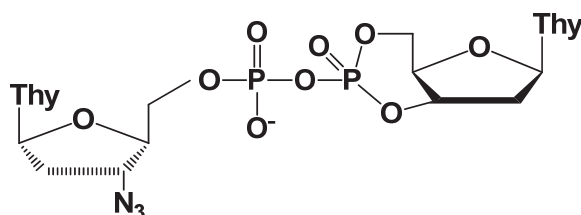
Rys. 4. Podstawowe metody syntezy *H*-fosfonianów nukleozydów

H-fosfoniany posiadają wiele zalet, które decydują o ich przydatności w syntezie biologicznie aktywnych organicznych związków fosforu, wśród których szczegółowo omówione zostaną pochodne nukleotydo-*H*-fosfoniany. Ich otrzymanie jest proste, a substraty użyte do syntezy tanie, łatwo dostępne i stabilne. Nukleozydo-*H*-fosfoniany wykazują dużą trwałość podczas przechowywania, przy jednocześnie znacznej aktywności w środowisku reakcyjnym, co przekłada się na krótki czas reak-

cji i mniejszą ilość produktów ubocznych. Wskutek tego możliwe staje się otrzymywanie w prostych reakcjach wielu pochodnych nukleotydowych, m.in. liniowych i cyklicznych diestrów, triestrów, amidofosforanów, boranofosforanów seleno- czy tiofosforanów [4]. Podstawowe i najczęściej wykorzystywane metody syntezy *H*-fosfonianów nukleozydów przedstawia Rys. 4.

3. Część eksperymentalna

Od pewnego czasu w wielu laboratoriach na świecie trwają intensywne prace nad pronukleotydamy anty-HIV, a w szczególności ich difosforanowymi analogami. Jedną z grup o potencjalnym zastosowaniu są nukleozydodifosforany posiadające w swej strukturze cykliczny diester nukleozydowy. Obecność w ich cząsteczce dwóch różnych nukleozydów pozwalałaby na dostarczenie do komórki aktywnego przeciwko HIV 5'-fosforanu 3'-azydo-3'-deoksytymidyny oraz tymidyny, co z założenia powinno zmniejszyć toksyczność AZT. Przykładową strukturę ilustruje Rys. 5.



Rys. 5. Struktura cyklicznego difosforanu nukleozydowego typu 1

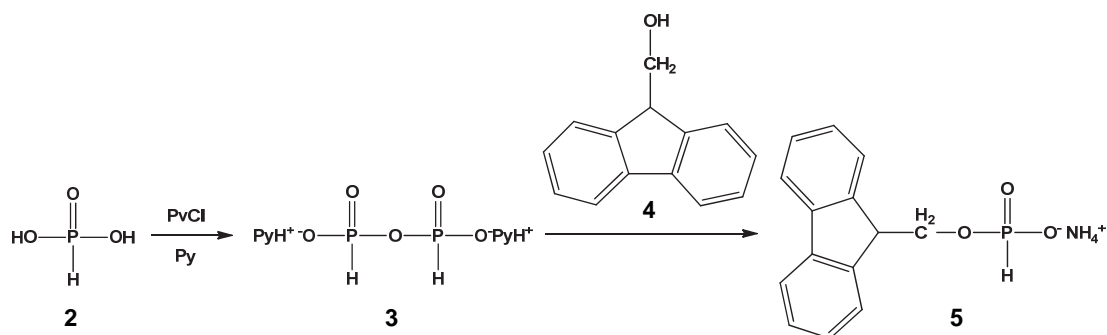
Syntezę difosforanu typu 1 przeprowadzono z wykorzystaniem chemii *H*-fosfonianów, na której oparto wszystkie strategie syntetyczne. Całość reakcji można podzielić na 3 etapy:

- 1 – synteza 3',5'-cyklicznego fosforanu tymidyny,
- 2 – otrzymanie *H*-fosfonianu AZT,
- 3 – oksydacyjna kondensacja uzyskanych substratów.

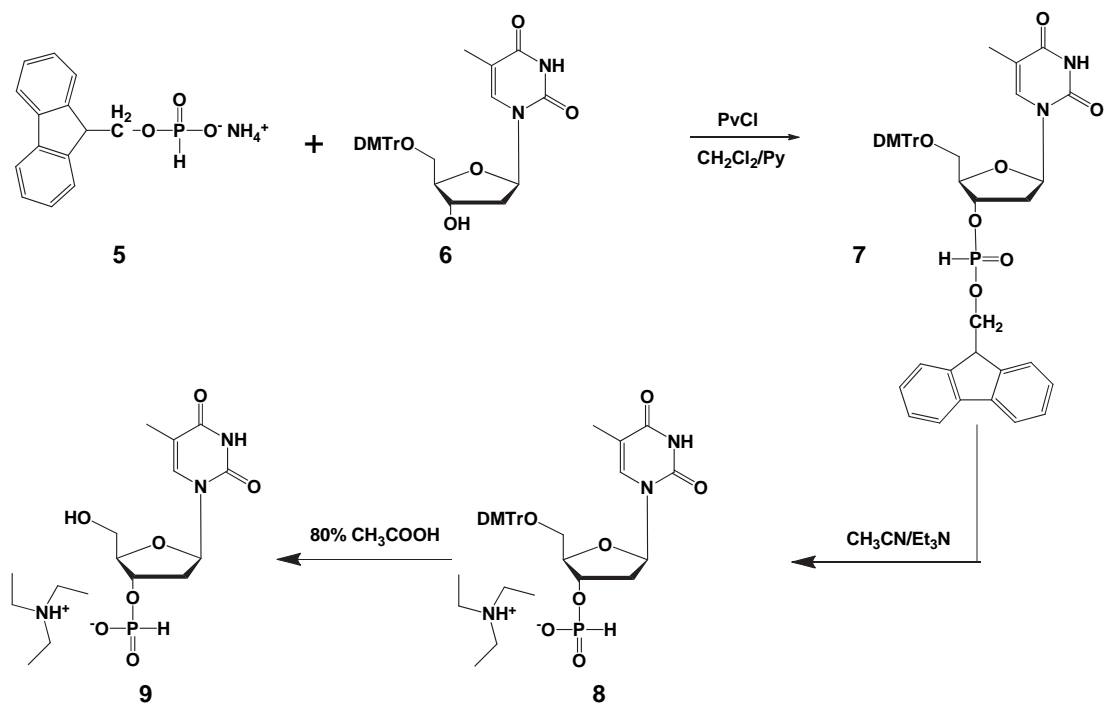
W pierwszej kolejności otrzymano 3'-*H*-fosfonian tymidyny, stosując *H*-fosfonian fluorenylowy (5) jako czynnik fosfonylujący (Rys. 6). W podejściu tym kwas fosforowy(III) (2) aktywowany chlorkiem piwa-loilu w pirydynie [3] bardzo łatwo tworzy piro-*H*-fosfonian (3), który jest na tyle reaktywny, że szybko reaguje z fluorenylometanolem (4), tworząc odpowiedni *H*-fosfonian. Wymiana kationu pirydynowego na

amonowy powoduje wytrącenie krystalicznego produktu (5) gotowego do użycia w dalszych badaniach [5].

Otrzymany *H*-fosfonian (5) poddano następnie reakcji kondensacji z odpowiednio blokowanym nukleozydem (6) (gr. DMTr w pozycji 5' nukleozydu) wobec chlorku piwaloiilu jako aktywatora. Reakcja fosfo-



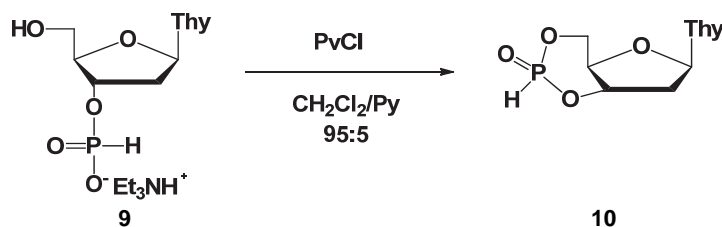
Rys. 6. Schemat reakcji otrzymywania (9*H*-fluoren-9-yl)metylo-*H*-fosfonianu NH_4^+ (5)



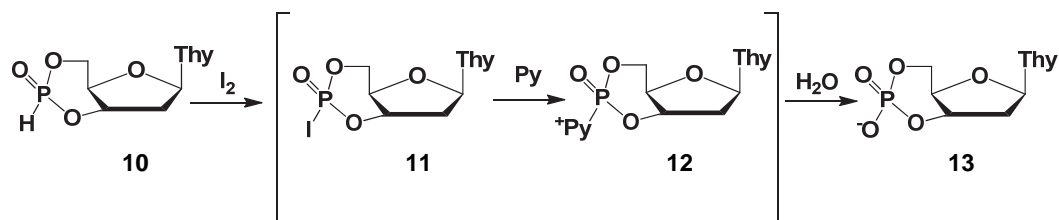
Rys. 7. Otrzymywanie 3'-*H*-fosfonianu tymidyny

nylacji zachodziła ilościowo w ciągu 1 godz. i otrzymano nukleozydo-*H*-fosfonianodiester (7), który był wystarczająco czysty, aby bez dodatkowego oczyszczania przeprowadzić go w nukleozydo-*H*-fosfonianomonoester (8) działaniem trietyloaminy w bezwodnym acetonitrylu. Z otrzymanego nukleozydo-*H*-fosfonianu w ostatnim etapie usunięto blokadę dimetoksytrytylową działaniem 80% roztworu kwasu octowego, uzyskując oczekiwany produkt (9) (Rys. 7).

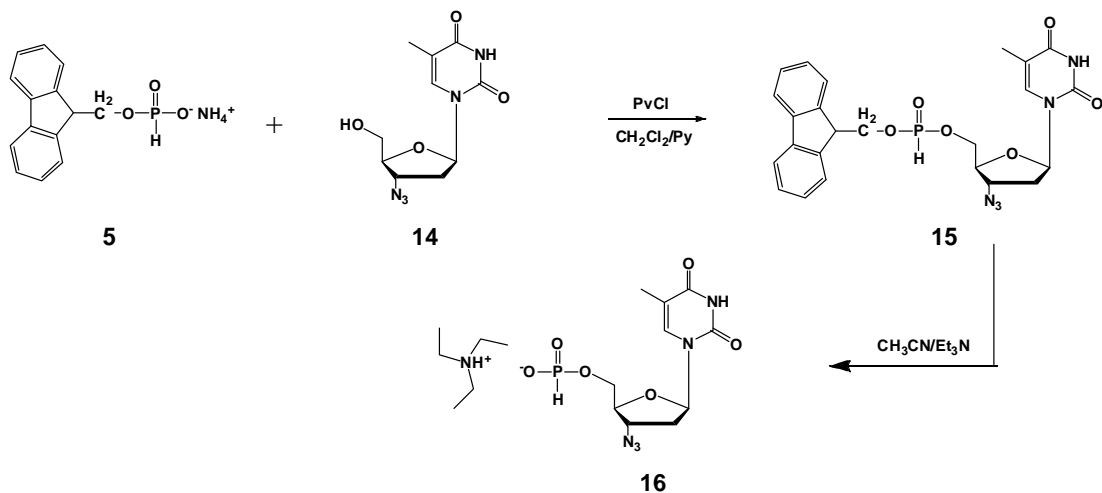
Kolejnym etapem było otrzymanie 3',5'-cyklicznego fosforanu tymidyny, składające się z dwóch następujących bezpośrednio po sobie reakcji: cyklizacji i utleniania (Rys. 8 i 9). Pierwsza z nich polega na wewnątrzcząsteczkowej kondensacji grupy 5'-hydroksylowej z resztą 3'-*H*-fosfonianową wobec chlorku piwaloilu jako czynnika kondensującego. Powstały 3',5'-cykliczny *H*-fosfonian tymidyny (10) jest nietrwały i dlatego natychmiast po jego wygenerowaniu do środowiska reakcyjnego wprowadza się jod rozpuszczony w pirydynie i wodę [6]. Ta droga utleniania *H*-fosfonianów do fosforanów możliwa jest na skutek wspomnianej wcześniej tautomerii diestrów kwasu *H*-fosfonowego. W formie tri-koordynacyjnej na atomie fosforu obecna jest para elektronowa, która atakuje polaryzowaną cząsteczkę jodu, tworząc jodofosforan (11) i generując aniony jodkowe. W obecności pirydyny jodofosforan natychmiast tworzy addukt pirydynowy (12), reaktywny produkt pośredni, który w reakcji z nukleofilami, np. wodą, zostaje przekształcony w fosforan (13).



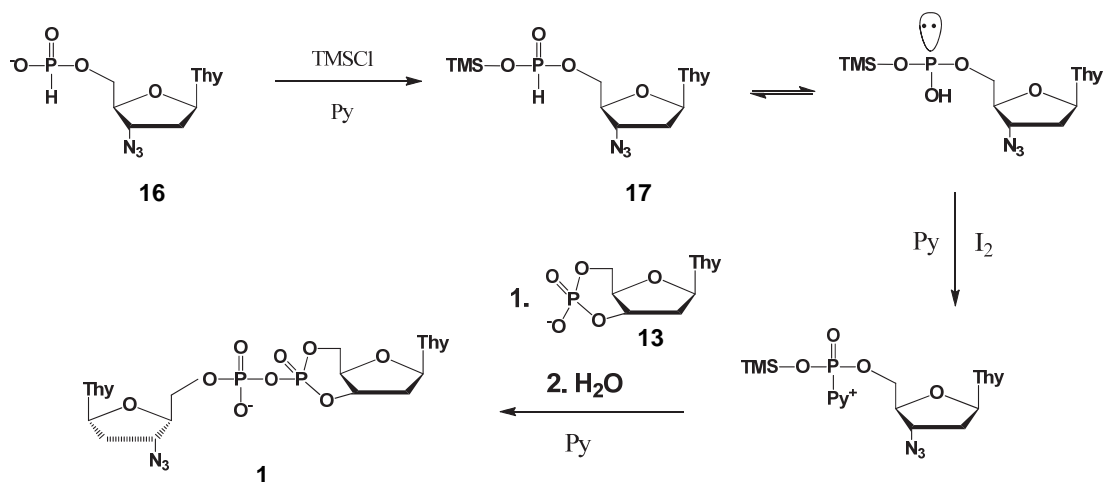
Rys. 8. Cyklizacja 3'-*H*-fosfonianu tymidyny (9)



Rys. 9. Utlenianie cyklicznego *H*-fosfonianu tymidyny do fosforanu

Rys. 10. Synteza *H*-fosfonianu AZT (16)

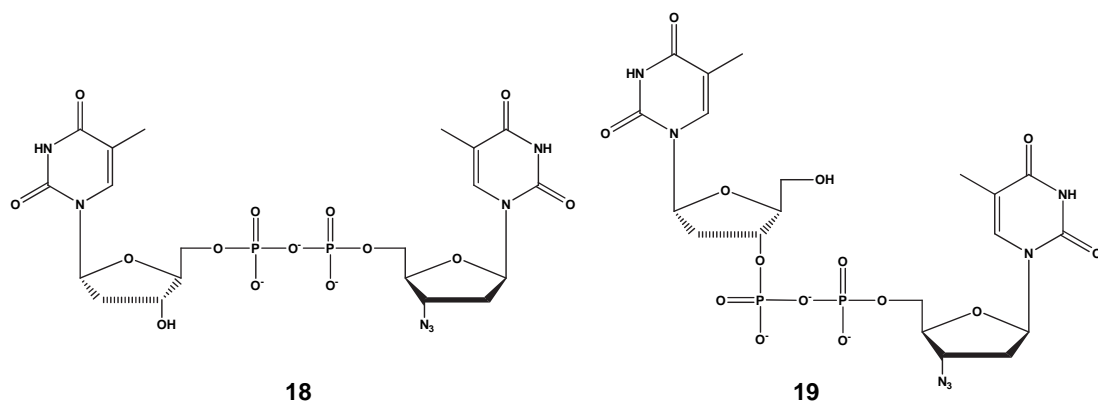
Nukleozydo-5'-*H*-fosfonian otrzymano na drodze kondensacji nukleozydu (AZT) (14) z *H*-fosfonianem fluorenylowym (5) wobec chloru piwaloilu jako czynnika kondensującego. W następnej kolejności z otrzymanego nukleozydo-*H*-fosfonianodiestru (15) pod wpływem trietyloaminy zostaje usunięta grupa fluorenylowa na drodze reakcji β -eliminacji, tworząc pożądaný produkt (16) zgodnie z Rys. 10.

Rys. 11. Oksydacyjna kondensacja 3',5'-cyklicznego fosforanu tymidyny z *H*-fosfonianem AZT

Ostatni etap syntezy polega na oksydatywnej kondensacji silylowanego nukleozydo-*H*-fosfonianu (**17**) z 3',5'-cyklicznym fosforanem tymidyny (**13**), wobec jodu w pirydynie (Rys. 11).

Synteza cyklicznego dinukleozydodifosforanu (**1**) zachodziła praktycznie ilościowo. Sygnały od niego pochodzące były jedynym obserwowanym produktem w widmie ^{31}P NMR (dwa dublety w rejonie -11 ppm i -16 ppm). Niestety uzyskany związek był trwały tylko w warunkach bezwodnych. Po dodaniu do środowiska reakcyjnego wody następowała hydroliza wiązania pirofosforanowego i odtworzenie monofosforanu AZT oraz 3',5'-cyklicznego fosforanu tymidyny.

W związku z tym podjęto syntezę niecyklicznych dinukleozydowych difosforanów. Związki te otrzymano również opierając się na chemii *H*-fosfonianów. Stosując nukleozydo-*H*-fosfoniany jako substraty, otrzymano najpierw odpowiednie nukleozydofosforany, które poddawano następnie reakcji oksydatywnej kondensacji z silylowanym nukleozydo-*H*-fosfonianodiestrem. Stosując tę samą metodykę, uzyskano poniższe produkty (**18** i **19**) z dobrą wydajnością ($> 70\%$) (Rys. 12).



Rys. 12. Otrzymane dinukleozydowe difosforany

Czystość preparatów potwierdzono technikami TLC, HPLC oraz stosując spektroskopię jądrowego rezonansu magnetycznego.

4. Aspekty biologiczne

Dotychczasowe doniesienia literaturowe na temat dinukleozydodifosforanów określają ścieżkę ich rozpadu w mediach komórkowych przez hydrolizę wiązania pirofosforanowego [7]. Pozwala to

przypuszczać, iż wprowadzenie do komórki dinukleozydodifosforanu zawierającego AZT oraz tymidynę spełni dwa ważne z punktu widzenia terapii anty-HIV cele: monofosforan AZT, jako pronukleotyd, podlegać będzie dalszej fosforylacji i w takiej formie stanie się skutecznym inhibitorem odwrotnej transkrypcji wirusa, natomiast uwolniony monofosforan tymidyny spełni rolę ochronną dla komórki, dla której AZT jest silnie toksyczny. Uzyskany synergizm działania powinien cechować się wysoką skutecznością inhibicji namnażania wirusa, zachowując względnie niską cytotoksyczność.

Dla potwierdzenia tej hipotezy wykonano badania mikrobiologiczne na liniach komórkowych zainfekowanych wirusem HIV. Wyniki zestawiono w Tab. 1.

Tabela 1. Wartości parametrów mikrobiologicznych uzyskane dla związków **18** i **19**

Nr badanej substancji	IC ₅₀ [μM]	IC ₉₀ [μM]	CC ₅₀ [μM]	CC ₉₀ [μM]	SI ₅₀
18	0,021	0,04	130	> 133	6190
19	0,032	0,22	158	> 172	4938

Badania wykonano w Narodowym Instytucie Leków.

Uzyskane wyniki pozwalają wnioskować, że badane dinukleozydodifosforany posiadają potencjał anty-HIV przy jednoczesnym zachowaniu niskiej cytotoksyczności. Związki te wydają się niewątpliwie interesujące jako proleki. Wysoka aktywność anty-HIV oraz korzystne właściwości fizykochemiczne pochodnych typu **18** i **19** zachęcają do projektowania nowych tego typu potencjalnych pronukleotydów, posiadających w swej strukturze różne antywirusowe analogi nukleotydów.

5. Podsumowanie

Prace nad potencjalnymi prolekami są nadal kontynuowane w ZChKN IchB PAN, a osiągnięcie założonych celów umożliwi chemia *H*-fosfonianów, na której opierają się niemal wszystkie strategie syntetyczne projektowanych pronukleotydów. Chemia *H*-fosfonianów, jak przedstawiono w niniejszym opracowaniu, pozwala w szybki i prosty sposób otrzymywać potencjalnie aktywne biologicznie związki. W dalszej kolejności planowane jest eksplorowanie chemii *H*-fosfonia-

nów w kierunku opracowania protokołów syntetycznych nukleozydodifosforanów, zawierających różnie zaaranżowane heteroatomy przy resztach fosforanowych.

Literatura

- [1] Doak G.O., Freedman L.D. (1961) The structure and properties of the dialkyl phosphonates, *Chem. Rev.* 61, 31–44.
- [2] Guthrie J.P.C. (1979) Tautomerization equilibria for phosphorous acid and its ethyl esters, free energies of formation of phosphorous and phosphonic acids and their ethyl esters, and pK_a values for ionization of the P–H bond in phosphonic acid and phosphonic esters, *J. Chem.* 57, 236–239.
- [3] Stawiński J., Thelin M. (1990) Studies on the activation pathway of phosphonic acid using acyl chlorides as activators, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* 2, 849–853.
- [4] Garegg P.J., Regberg T., Stawiński J., Stromberg R. (1987) Nucleoside phosphonates: part 7. Studies on the oxidation of nucleoside phosphonate esters, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* 1, 1269–1273.
- [5] Romanowska J., Szymańska-Michalak A., Pietkiewicz M., Sobkowski M., Boryski J., Stawiński J., Kraszewski A. (2009) A new efficient entry to non-lipophilic H-phosphonate monoesters – preparation of anti-HIV nucleotide analogues, *Lett. Org. Chem.* 6, 496–499.
- [6] Roźniewska M., Stawiński J., Kraszewski A. (2013) Nucleoside 3',5'-cyclic H-phosphonates, new useful precursors for the synthesis of nucleoside 3',5'-cyclic phosphates and their analogues, *Org. Lett.* 15, 4082–4085.
- [7] Miazga A., Ziemkowski P., Siwicka M.A., Lipnicki A., Piasek A., Kulikowski T. (2010) Synthesis, biological properties and anti-HIV-1 activity of new pyrimidine P₁,P₂-dinucleotides, *Nucleos. Nucleot. Nucl. Acids* 29, 4, 438–444.

IZOKSAZOLIDYNOWE POCHODNE C⁵-PODSTAWIONYCH URACYLI. SYNTEZA I ZAHAMOWANA INWERSJA NA ATOMIE AZOTU W ŚWIETLE NMR I OBLICZEŃ METODAMI DFT



MATEUSZ KUPRIANOWICZ*, HANNA WÓJTOWICZ-RAJCHEL

Wydział Chemii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza
ul. Umultowska 89B, 61-614 Poznań

* e-mail: mateusz.kuprianowicz@amu.edu.pl

Hasła do zapamiętania: 1,3-dipolarna cykloaddycja, nitrony, izoksazolidyny, analogi nukleozydów, zahamowana inwersja atomu azotu, metody DFT

Wykaz skrótów:

HOMO – najwyższy obsadzony orbital molekularny
(ang. *highest occupied molecular orbital*)

LUMO – najniższy nieobsadzony orbital molekularny
(ang. *lowest unoccupied molecular orbital*)

Bn – benzyl

TFA – kwas trifluorooctowy

PFP – 1,2,3,3,3-pentafluoropropen

DFT – teoria funkcjonału gęstości (ang. *density functional theory*)

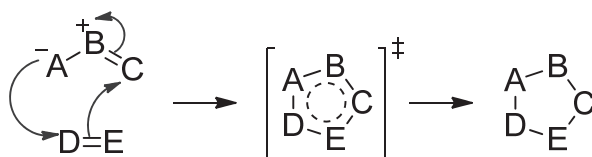
1. Wstęp

1,3-Dipolarna cykloaddycja, jest niezwykle użyteczną metodą otrzymywania związków zawierających w swej budowie pięcioczłonowe, heterocykliczne pierścienie. Ogólny koncept tego procesu został zbadany i opracowany przez Rudolfa Huisegena i jego współpracowników w latach sześćdziesiątych XX wieku [1]. Substratami 1,3-dipolarnej cykloaddycji

są związki elektrycznie obojętne, posiadające w swojej strukturze fragment 1,3-dipolarny, nadający im charakter dipolowy, oraz tzw. dipolarofile mogące z nimi reagować. Dipolarofilem jest cząsteczka posiadająca wiązania wielokrotne węgiel–węgiel lub węgiel–heteroatom powiązany w grupę funkcyjną (np. karbonyle i nityle). Natomiast 1,3-dipolami są związki organiczne zawierające układ czterech elektronów π , zdelokalizowanych w obrębie trzech sąsiadujących ze sobą atomów [2].

2. Mechanizm

1,3-Dipolarna cykloaddycja jest potężnym narzędziem chemii organicznej, dzięki któremu możliwe są syntezy skomplikowanych struktur heterocyklicznych. Dwa elektrony π dipolarofila i cztery elektrony związku dipolarnego biorą udział w jednoetapowej, perycyklicznej przemianie przypominającej reakcję Dielsa–Aldera [$2s+4s$]. Warunkiem zajścia reakcji jest pewne podobieństwo energetyczne oddziałujących ze sobą orbitali HOMO i LUMO reagentów. W przypadku elektronoakceptorowych grup funkcyjnych modyfikujących gęstość elektronową wiązania podwójnego cząsteczki dipolarofila, preferowaną interakcją prowadzącą do wytworzenia nowych wiązań jest LUMO-dipolarofila – HOMO-dipola. W przypadku elektronodonorowych grup funkcyjnych sytuacja z reguły jest odwrotna. Oddziaływania te, jak również charakter podstawników warunkują geometrię połączenia dwóch reagujących cząsteczek, wskutek czego jesteśmy w stanie przewidzieć stereochemię produktów [3] (Rys. 1).

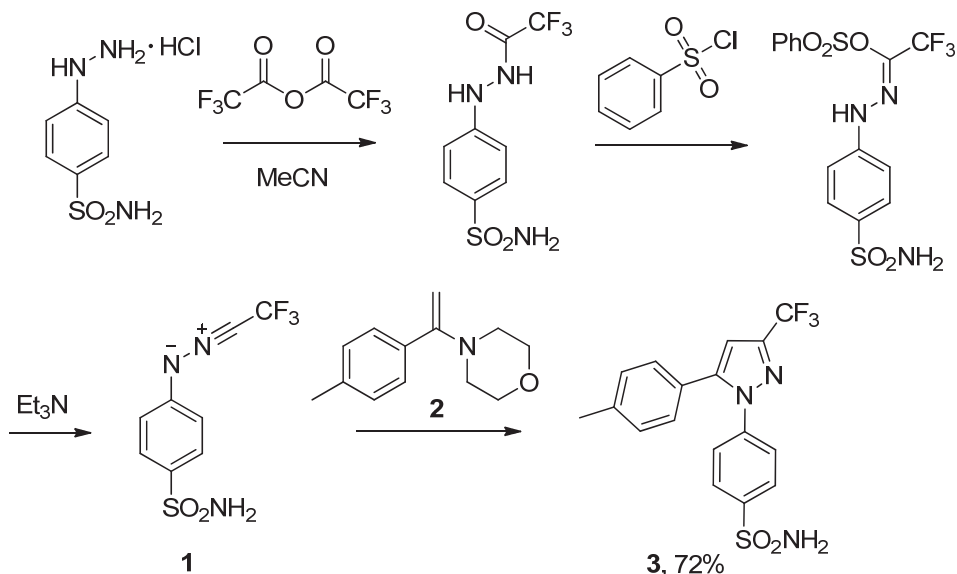


Rys. 1. Jednoetapowy mechanizm 1,3-dipolarnej cykloaddycji

3. Zastosowanie 1,3-dipolarnej cykloaddycji w syntezie

Współcześnie większość związków biologicznie aktywnych posiada w swojej strukturze układy heterocykliczne [4]. Są to głównie kwasy nukleinowe, antybiotyki lub alkaloidy. Co więcej, związki tego typu są

jednymi z najlepiej sprzedających się cząsteczek o zastosowaniu farmaceutycznym [5]. Ciągły rozwój narzędzi syntezy organicznej umożliwił modyfikacje otrzymanych wcześniej struktur w celu poprawy ich parametrów farmakodynamicznych i farmakokinetycznych. 1,3-Dipolarna cykloaddycja jest zatem jedną z najlepszych metod do tego typu modyfikacji, a literatura dostarcza wielu przykładów jej zastosowań. Godną uwagi wydaje się synteza leku o handlowej nazwie Celelekoksyb **3** (łac. *Celecoxibum*; Rys. 2), który jako lek niesteroidowy wykazuje właściwości przeciwzapalne i przeciwbólowe. Mechanizm jego działania polega na hamowaniu funkcjonowania enzymu cyklooksigenazy, a tym samym czynnika, który jest odpowiedzialny za stan zapalny powodujący odczuwanie bólu [6].

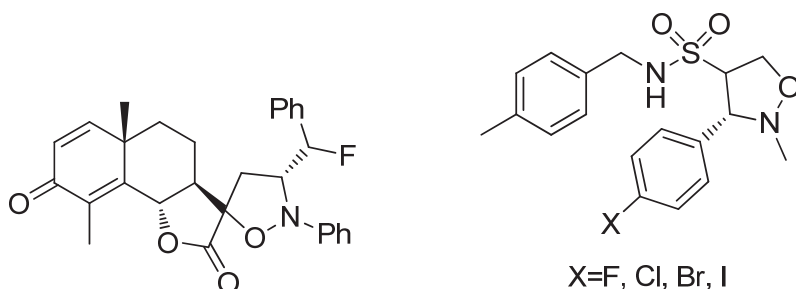


Rys. 2. Regioselektywna synteza Celelekoksybu

Celelekoksyb został otrzymany na drodze 1,3-dipolarnej cykloaddycji imidu nitrylowego **1** i odpowiednio podstawionej olefiny **2**. Ze względu na fakt, iż reakcja ta jest kontrolowana przez interakcje orbitali LUMO-dipola/HOMO-dipolarofila, wykorzystano tu bogatą w elektrony enaminową pochodną morfoliny **2**. Ta strategia pozwoliła uzyskać docelowy produkt z całkowitą regioselektywnością [7].

3.1. Izoksazolidyny

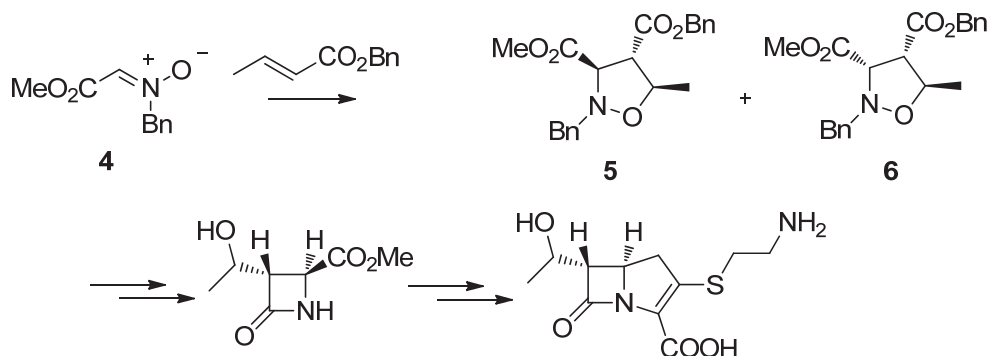
Izoksazolidyny, będące produktami reakcji 1,3-dipolarnej cykloaddycji nitronów z alkenami, posiadają w swojej budowie pięcioczłonowy heterocykliczny pierścień, w którym bezpośrednio sąsiadują ze sobą atomy tlenu i azotu. Ze względu na fakt, iż wiązanie N–O ulega w łagodnych warunkach hydrolizie, znalazły one szerokie zastosowanie w syntezie 1,3-aminoalkoholi będących substratami syntez szerokiej gamy związków pochodzenia naturalnego, a w szczególności aminokwasów, alkaloidów czy cukrów aminowych. Dzisiaj znanych jest wiele przykładów związków biologicznie aktywnych, posiadających w swojej strukturze 5-członowy pierścień izoksazolidyny. Ich aktywność przejawia się we właściwościach przeciwgrzybiczych [8], przeciwbakteryjnych [9], przeciwdrgawkowych [10], przeciwzapalnych [11], przeciwwirusowych [12], a także w chemioterapii [13]. Do tej grupy należą m.in.: izoksazolidynowa pochodna α -Santoniny wykazująca właściwości przeciwnowotworowe oraz izoksazolidynowe pochodne sulfoamidów o właściwościach anti-HIV (Rys. 3).



Rys. 3. Przykłady związków biologicznie aktywnych posiadających w swojej budowie 5-członowy pierścień izoksazolidyny

Ze względu na fakt występowania w znacznej części antybiotyków pierścienia laktamowego, duże znaczenie w medycynie mają β -laktamy. Jest to powód, dla którego wiele grup badawczych szuka nowych sposobów ich syntezy, często wykorzystując w jednym z etapów reakcję 1,3-cykloaddycji nitronów do odpowiednio modyfikowanych olefin. W ten właśnie sposób opracowano metodę otrzymywania penemów i karbapenemów, czyli antybiotyków laktamowych. Proces rozpoczyna się od przygotowania nitronu **4**, który ulega reakcji cykloaddycji, tworząc dwa chiralne związki **5** i **6** w stosunku 1:1. Tylko związek **6** jest użyteczny

w dalszej syntezie, a po szeregu specyficznych etapów zostaje przekształcony ostatecznie w antybiotyk Tienamycynę o silnym działaniu przeciwbakteryjnym (Rys. 4) [14].



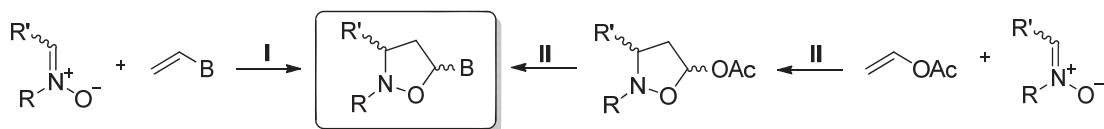
Rys. 4. Synteza Tienamycyny wykorzystująca izoksazolidynowy produkt pośredni **5** i **6**

3.2. Izoksazolidynowe analogi nukleozydów

W ostatnich latach wiele uwagi poświęcono rozwojowi efektywnych metod syntezy analogów nukleozydów. Taka modyfikacja polega na zmianie pierścienia furanozowego w układ acykliczny, modyfikowany pierścień aromatyczny lub też układ heterocykliczny. Oprócz modyfikacji jednostki cukrowej wyróżnia się także modyfikacje w obrębie nukleozasady. Zmiany strukturalne naturalnie występujących nukleozydów wpływają znacznie na aktywność biologiczną otrzymywanych analogów, sprawiając, że ich synteza staje się jeszcze bardziej pożądana [15–18]. Mechanizm działania takiego analogu polega na hamowaniu polimerazy DNA wirusa, natomiast w przypadku retrowirusów – na hamowaniu jego odwrotnej transkryptazy. Modyfikowane nukleozydy w postaci di- i trifosforanów wbudowują się w nić DNA wirusa, uniemożliwiając jej wydłużanie [19].

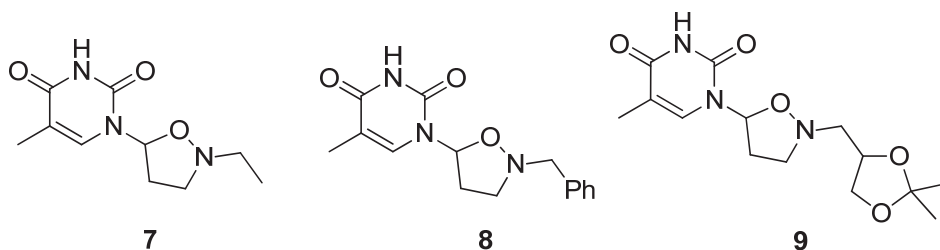
Bez wątpienia jedną z najciekawszych modyfikacji nukleozydu jest zastąpienie pierścienia furanozy pięcioczłonowym pierścieniem izoksazolidyny. Pomysł ten, zaprezentowany przez Troncheta [20], wyjaśniał aktywność biologiczną takiego związku, wynikającą z zastąpienia furanozowego atomu węgla C⁴ atomem azotu, którego łatwość inwersji konfiguracji znacznie modyfikuje właściwości całego nukleozydu. Literaturowo dobrze opisane są dwie drogi syntezy tego typu związków. Pierwsza (**I**; Rys. 5) polega na bezpośredniej reakcji 1,3-dipolarnej cykloaddycji nitronu do

enaminowej pochodnej odpowiedniej nukleozasady. Druga (II; Rys. 5) metoda wykorzystuje reakcje Vorbrüggena pomiędzy silylowaną nukleozasada a otrzymaną wcześniej 5-acetyloizoksazolidyną [21].

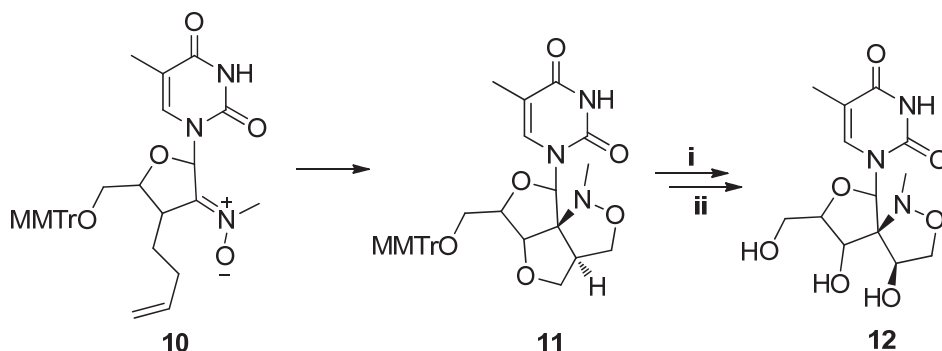


Rys. 5. Strategie syntezy izoksazolidynowych analogów nukleozydów

Tronchet w swojej pracy wykorzystał cykloadycję nitronów do octanu winylu, które następnie poddawał reakcji Vorbrüggena, przekształcając silylową pochodną tyminy w odpowiednie izoksazolidynowe pochodne 7–9 (Rys. 6). Produkty reakcji wykazywały właściwości przeciwbakteryjne [20].

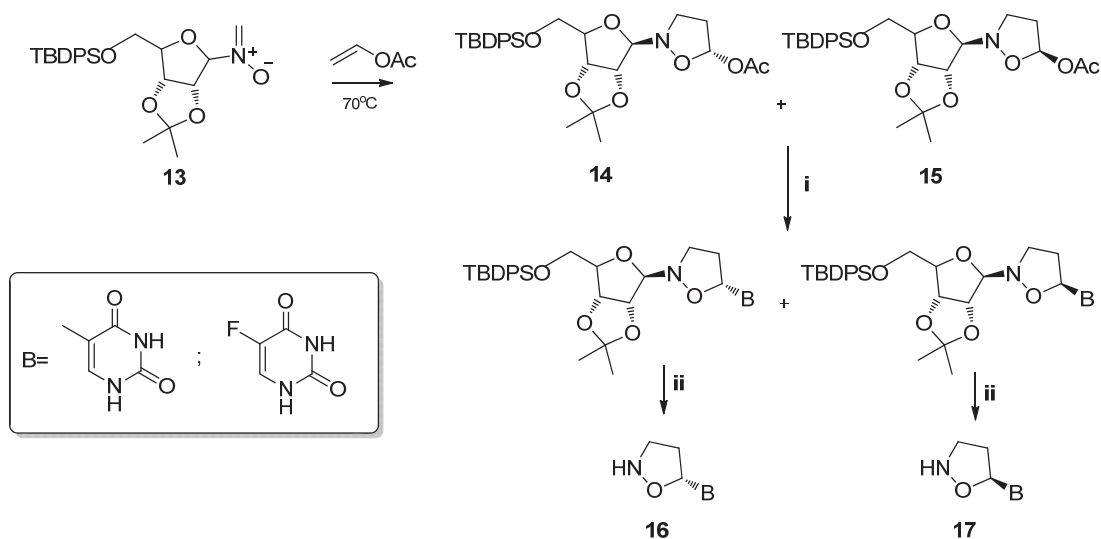


Rys. 6. Izoksazolidynowe analogi tymidyny



Rys. 7. Synteza nukleozydu o właściwościach anty-HIV. Reagenty: i H_2O_2 , KF, KHCO_3 , MeOH, THF; ii 80% AcOH, 40°C, 1 h; MMTr = parametoksyfenylodifenylmetyl

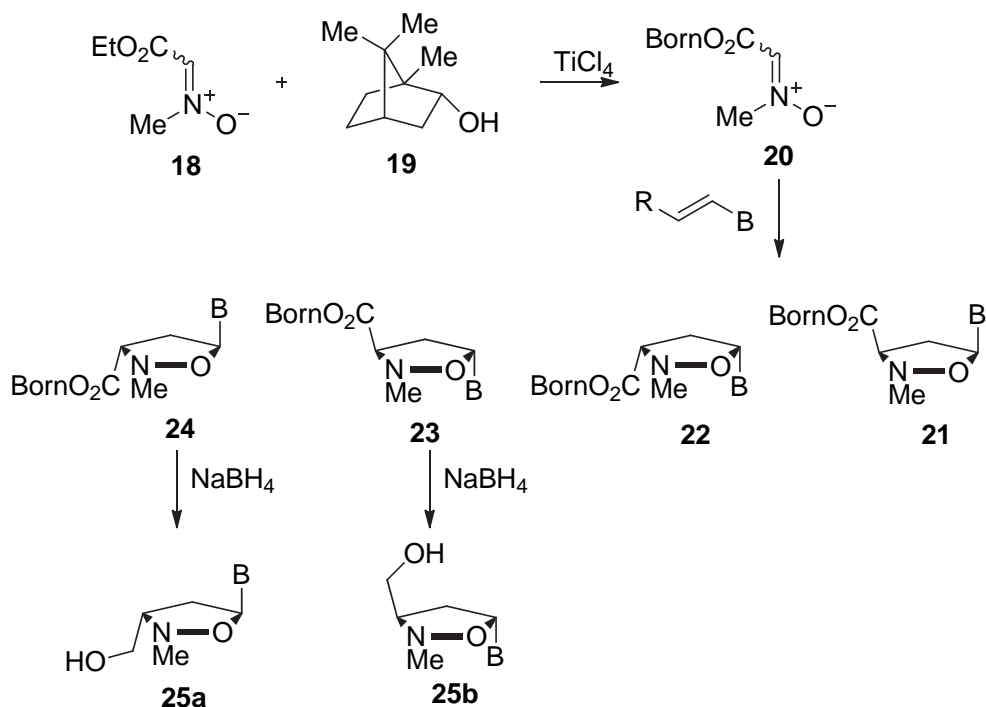
Chattopadhyaya wraz z współpracownikami opracowali metodę syntezy nukleozydu wykazującego wysoką aktywność anty-HIV [22]. Proces ten obejmuje kilka etapów, w których kluczowy jest etap wykorzystujący wewnątrzcząsteczkową reakcję 1,3-dipolarnej cykloaddycji z udziałem odpowiedniego nukleozydowego nitronu **10**. Następnie otrzymuje się spirotrycycliczny addukt **11**, który w kolejnych dwóch etapach reakcji jest przekształcany do formy aktywnej biologicznie **12** (Rys. 7).



Rys. 8. Synteza izoksazolidynowych pochodnych nukleozydów **16** i **17**. Reagenty: **i** silylowana nukleozasada, TMSOTf lub SnCl₄; **ii** 1,5% HCl w MeOH; TBDPS = tert-butylo-difenylosilil

Innym przykładem syntezy biologicznie aktywnego nukleozydu jest praca Romeo i współpracowników [23]. W reakcji tej wykorzystywany był nitron **13** z chiralnym podstawnikiem bezpośrednio przy atomie azotu, a sam proces prowadzono w myśl reakcji Vorbrüggena, wykorzystując 5-acetoksyizoksazolidynowy produkt pośredni. Pierwszy etap syntezy prowadził do otrzymania mieszaniny diastereoizomerów **14** i **15**, które kolejno przekształcano w odpowiednie analogi nukleozydów, a następnie rozdzielono chromatograficznie (Rys. 8). Wśród szeregu otrzymanych związków na szczególną uwagę zasługuje nukleozyd bazujący na 5-fluorouracylu, który wywołuje proces apoptozy w komórkach białaczki monocytarnej i limfocytarnej, pozostając jednocześnie związkiem o niskiej toksyczności.

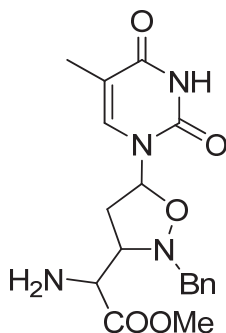
Reakcja Vorbrüggena, jako niezwykle użyteczna metoda syntezy analogów nukleozydów, jest często zastępowana bezpośrednią reakcją nitronu z enaminową pochodną odpowiedniej zasady nukleinowej. Takie podejście syntetyczne pozwoliło otrzymać enancjomerycznie czyste analogi



Rys. 9. Synteza izoksazolidynowych analogów nukleozydów **25a** i **25b**. B = adenina, tymina

25a i **25b** (Rys. 9). Syntezę rozpoczęto od reakcji transestryfikacji nitronu **18** z (1*S*)-endo(-)-borneolem **19** w obecności katalitycznych ilości TiCl₄, otrzymując mieszaninę E:Z (3:1) nitronu **20**. Związek ten posłużył jako substrat w bezpośredniej reakcji 1,3-dipolarnej cykloaddycji z odpowiednią winylonukleozasadą, dając związki **21**–**24**, które w kolejnym etapie przekształcono w enancjomerycznie czyste analogi [24].

Kolejnym przykładem nukleozydu aktywnego biologicznie jest izoksazolidynowa pochodna Polioksyny C (Rys. 10). Jest to antybiotyk wykazujący wysoką aktywność przeciw fitopatogennym grzybom, który znajduje potencjalne zastosowanie w preparatach ochrony roślin [25].



Rys. 10. Izoksazolidynowa pochodna Polioksyny C

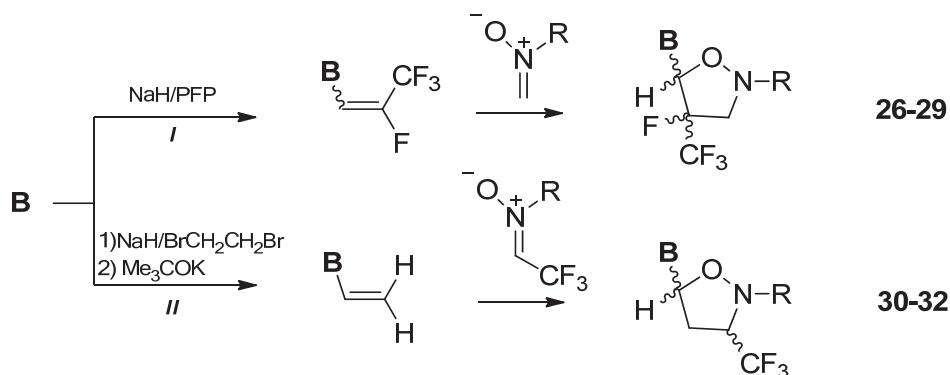
4. Część doświadczalna

Głównym celem badań była m.in. synteza izoksazolidynowych pochodnych nukleozydów purynowych i pirymidynowych, w których pierścień 5-członowy będzie zawierać w swojej strukturze grupę $-\text{CF}_3$ lub $-\text{F}$. Atomy fluoru i wodoru są izosteryczne, co pozwala na zachowanie aktywności biologicznej cząsteczki, jednocześnie nadając jej specyficzne właściwości, takie jak zwiększenie lipofilowości i stabilności metabolicznej. Wysoka elektrojemność fluoru ma również istotny wpływ na modyfikację chmur elektronowych sąsiadujących grup funkcyjnych, np. może zdecydowanie zmniejszyć charakter zasadowy sąsiednich grup aminowych przez efekt indukcyjnego „wyciągania” elektronów.

4.1. Synteza fluorowanych izoksazolidynowych analogów nukleozydów

Strategia syntezy została podzielona na dwie odrębne ścieżki (I i II; Rys. 11). W pierwszej reakcją kluczową była cykloaddycja metylenowego nitronu z fluorowaną winylową pochodną odpowiedniej zasady nukleinowej. W przypadku drugiej, nitron reagujący z winylową pochodną został zmodyfikowany grupą $-\text{CF}_3$.

W myśl przedstawionych powyżej reakcji udało się otrzymać i scharakteryzować za pomocą analizy NMR siedem nowych związków, których wydajności podano w Tab. 1.

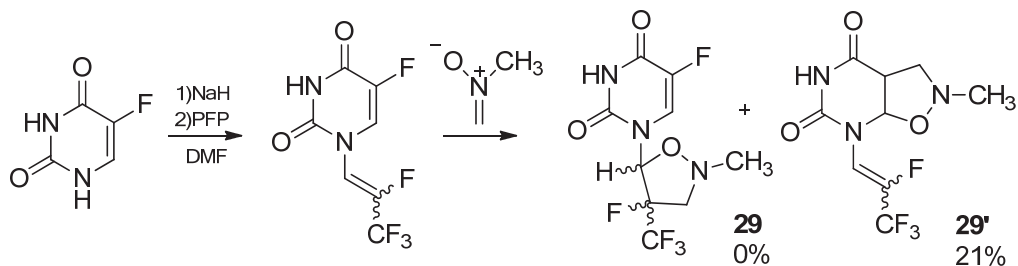


Rys. 11. Strategia syntezy fluorowanych izoksazolidynowych pochodnych nukleozydów

Na szczególną uwagę zasługuje reakcja 1,3-dipolarnej cykloaddycji nitronu *N*-metylowego do fluorowanej winylowej pochodnej 5-fluorouracylu*, w której zamiast zakładanego produktu **29** otrzymano addukt do wiązania C⁵–C⁶ pierścienia pirymidyny **29'** (Rys. 12).

Tabela 1. Wydajności otrzymanych produktów

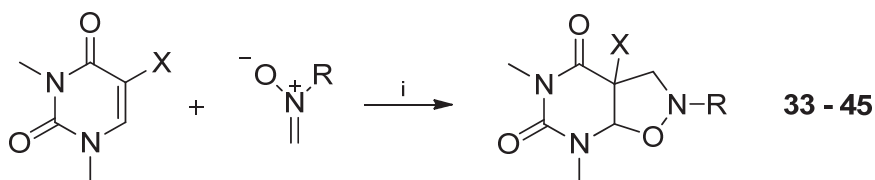
Produkt	Zasada nukleinowa (B)	Droga syntezy	R	Wydajność [%]
26	adenina	I	–CH ₃	46%
27	guanina		–CH ₃	śladowe ilości
28	tymina		–CH ₃	56%
29(29')*	5-fluorouracyl		–CH ₃	21% *
30	adenina	II	–CH ₃	34%
31	tymina		–CH ₃	18%
32	tymina		– <i>t</i> -Bu	54% (wg NMR)



Rys. 12. Synteza związku **29'**

4.2. Synteza skumulowanych izoksazolidynowych pochodnych C⁵-podstawionych uracyli

Wysoka reaktywność wiązania C⁵–C⁶ pierścienia 5-fluorouracylu stała się początkiem drogi syntetycznej prowadzącej do otrzymania nowych związków posiadających w swojej budowie skumulowany układ pierścieni – pięcio- i sześcioczłonowego. W syntezie, oprócz pochodnych 5-fluorouracylu, wykorzystano także uracyl i jego C⁵-podstawione pochodne (Rys. 13).



Rys. 13. Synteza izoksazolidynowych pochodnych uracyli

W powyższej reakcji udało się otrzymać szereg nowych związków. Modyfikacje nie ograniczały się jedynie do różnych grup funkcyjnych przy atomie C⁵, ale także obejmowały różne podstawniki na atomie azotu nitronów, generowanych *in-situ* w reakcjach kondensacji odpowiednich aldehydów z *N*-alkilohydroksyaminami. Sumarycznie syntezę wraz z wydajnościami otrzymanych produktów opisuje Tab. 2.

Struktury otrzymanych cząsteczek zostały potwierdzone za pomocą analizy NMR oraz MS. Analiza spektralna dostarczała wielu interesujących wniosków na temat otrzymanych produktów. W przypadku wszystkich związków można było zaobserwować charakterystyczne poszerzenie sygnałów w widmach. Ponadto w przypadku związku **33** stwierdzono obecność dodatkowego sygnału w ¹⁹F-NMR. Pomimo iż reakcja zachodziła z całkowitą regio- i stereospecyficznością, co powinno prowadzić do otrzymania nierozróżnialnych enancjomerów, konsekwentnie w widmie ¹⁹F-NMR obserwowano obecność dwóch izomerów, które nie były widoczne zarówno w widmie protonowego, jak i węglowego NMR. Jednocześnie z danych literaturowych wynika, że obecność ugrupowania –O–N– w pierścieniu izoksazolidyny w znaczny sposób podnosi energetyczną barierę inwersji atomu azotu w cząsteczce [26]. Obserwowany podwójny sygnał występujący w widmie ¹⁹F-NMR związku **33** wynika zatem z pojawienia się dodatkowego centrum chiralnego na atomie azotu w pierścieniu pięcioczłonowym.

Tabela 2. Wydajności otrzymanych produktów w 1,3-dipolarnej cykloaddycji nitronów do wiązania C⁵–C⁶, C⁵-podstawionych pochodnych uracyli

Produkt	X	R	i	Wydajność [%]
33	–F	–CH ₃	toluen, 24 h, 80°C	78%
34		– <i>t</i> -Bu	toluen, 48 h, 90°C	50%
35		–C ₆ H ₁₁	toluen, 24 h, 80°C	69%
36		–CH ₂ Ph	toluen, 24 h, 80°C	55%
37	–NO ₂	–CH ₃	toluen, 48 h, 60°C	21%
38		– <i>t</i> -Bu	toluen, 48 h, 85–90°C	34%
39		–C ₆ H ₁₁	toluen, 24 h, 70°C	15%
40	–Cl	–CH ₃	toluen, 48 h, 65°C	19%
41	–Br	–CH ₃	toluen, 24 h, 80°C	14%
42	–H	–CH ₃	toluen, 24 h, 60°C	28%
43		– <i>t</i> -Bu	toluen, 24 h, 65°C	19%
44		–C ₆ H ₁₁	toluen, 24 h, 65°C	35%
45		–CH ₂ Ph	toluen, 24 h, 80°C	34%

4.3. Analiza NMR

W celu potwierdzenia występowania zjawiska zahamowanej inwersji na atomie azotu przeprowadzono niskotemperaturową analizę NMR otrzymanych związków. Wraz z obniżaniem temperatury, sygnały pochodzące od odpowiednich atomów w widmie protonowego, fluorowego oraz węglowego NMR ulegały wyraźnemu wyostrzeniu i zdublowaniu, odsłaniając obecność drugiej diastereomerycznej formy związku. Stosunki ilościowe odpowiednich diastereoizomerów w warunkach analizy przedstawia Tab. 3.

Tabela 3. Stosunki ilościowe izomerów w danych warunkach analizy

Produkt	¹ H-NMR stosunek diastereoizomerów	¹ H-NMR stosunek diastereoizomerów – analiza temperaturowa
	TFA	–30°C (CDCl ₃)
1	2	3
33	71:29	74:26
34	77:23	84:16 ^b
35	69:32	72:28
36	67:33	75:25
37	54:46	–
38	60:40	–

cd. tab. 3

1	2	3
39	61:39	–
40	61:39	–
41	64:36	–
42	– ^a	83:17
43	– ^a	81:19 ^b
44	– ^a	79:21
45	– ^a	76:24

^a pod wpływem TFA następuje rozpad 5-członowego pierścienia izoksazolidyny

^b temperatura analizy –50°C

Oprócz analizy niskotemperaturowej, przeprowadzono także analizę NMR z wykorzystaniem kwasu TFA jako rozpuszczalnika. Silnie kwasowe środowisko powoduje protonowanie atomu azotu pierścienia izoksazolidyny, a tym samym całkowicie blokuje jego inwersję. W takich warunkach obecność dwóch diastereoizomerycznych form danego związku była widoczna już w temperaturze pokojowej.

5. Obliczenia teoretyczne

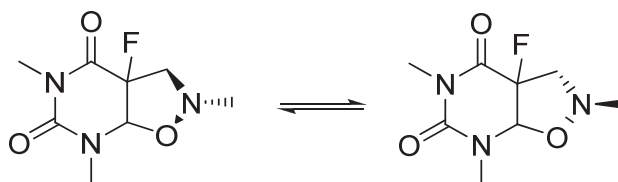
W literaturze można znaleźć wiele odnośników dotyczących zjawiska zahamowanej inwersji na atomie azotu dla pierścieni izoksazolidyny [26–28]. Większość z tych artykułów dostarcza także informacji na temat wysokości bariery energetycznej takiej przemiany, która wyznaczana jest z reguły za pomocą *NMR band shape analysis*. W powyższej publikacji postanowiono zastosować metody obliczeniowe do wyznaczenia energetycznej bariery inwersji.

Metody obliczeniowe chemii kwantowej wykorzystywane są do przewidywania właściwości fizykochemicznych badanych cząsteczek, optymalizacji geometrii, wyznaczania energii danej cząsteczki, a także przewidywania mechanizmu danej reakcji chemicznej poprzez odnalezienie struktur stanów przejściowych pomiędzy substratami a produktami. Obliczenia teoretyczne bazujące na chemii kwantowej mogą mieć istotny wpływ na analizę danych eksperymentalnych, a dokładność otrzymanych wyników zależy w dużej mierze od wyboru odpowiedniej metody obliczeniowej oraz bazy funkcyjnej [29].

W niniejszej publikacji wykorzystano metody chemii kwantowej do zoptymalizowania geometrii związku **33** w dwóch wariantach, różniących się konfiguracją atomu azotu. W celu wyznaczenia teoretycznej bariery

energetycznej inwersji konieczne było także odnalezienie stanu przejściowego pomiędzy wspomnianymi wcześniej strukturami.

W przeprowadzonych badaniach do optymalizacji geometrii cząsteczek zastosowano metody oparte na teorii funkcjonału gęstości (DFT). Metody te bazują na twierdzeniach Hohenberga–Kohna, z których pierwsze pozwala opisywać właściwości układu kwantowego w stanie stacjonarnym na podstawie gęstości elektronowej stanu podstawowego. Z kolei drugie twierdzenie, jako odpowiednik zasady wariacyjnej, opisuje istnienie pewnego funkcjonału spełniającego zasadę minimalnej wartości energii, odpowiadającej tylko gęstości równej gęstości stanu podstawowego [29]. Ze względu na fakt, iż metody DFT w myśl twierdzenia Hohenberga–Kohna, mówiącego o istnieniu funkcjonału gęstości spełniającego zasadę wariacyjną, nie określają dokładnego sposobu wyznaczania tego funkcjonału, jest on wybierany tak, aby obliczone wyniki były możliwie najdokładniej dopasowane do wartości doświadczalnych. W cytowanej publikacji do obliczeń zostały użyte funkcjonały hybrydowe b3lyp, wb97xd oraz m06 z bazami 6-31G oraz 6-31G++(d,p).



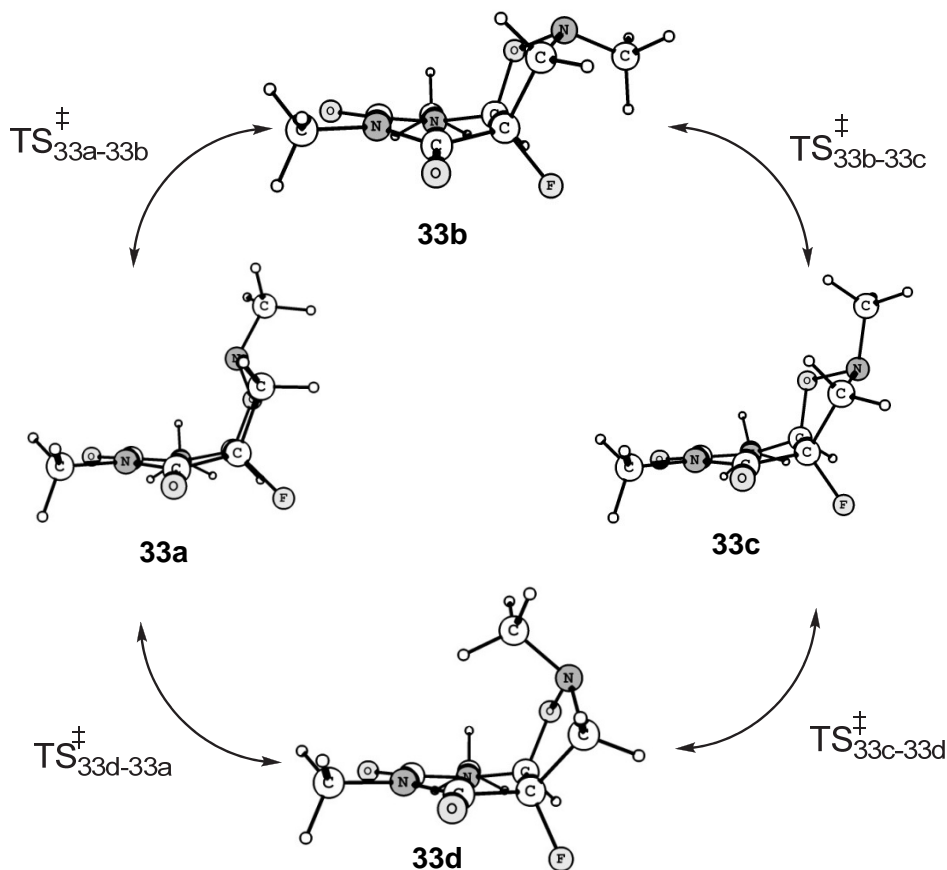
Rys. 14. Inwersja atomu azotu w pięcioczłonowym pierścieniu izoksazolidyny na podstawie związku **33**

Wstępne optymalizacje geometrii, wykorzystujące funkcjonal B3LYP i bazę 6-31d, potwierdziły występowanie dwóch struktur cząsteczki **33**, różniących się od siebie konfiguracją atomu azotu. W celu obliczenia bariery energetycznej konieczne było odnalezienie struktury stanu przejściowego pomiędzy dwoma powyższymi minimami (Rys. 14). Obliczenia pokazały, że zmiana konfiguracji atomu azotu pierścienia izoksazolidynowego jest poprzedzona zmianą jego konformacji, stąd bezpośredni stan przejściowy pomiędzy powyższymi strukturami (Rys. 14) najprawdopodobniej nie istnieje. Takie założenie sprawiło, że liczba poszukiwanych struktur wzrosła łącznie do czterech geometrii opisujących lokalne minimum energetyczne związku **33** oraz kolejno czterech struktur stanów przejściowych między nimi. Obliczenia potwierdziły występowanie wszystkich powyższych struktur, których geometrie zoptymalizowano metodami DFT (b3lyp, wb97xd oraz m06) z bazami 6-31G oraz 6-31G++(d,p) (Rys 15).

Ze względu na nieplanarność pierścienia izoksazolidyny, który może przyjmować konformację półkrzesła (T – ang. *twist*) lub koperty (E – ang. *envelope*), obliczono wartości kąta fazowego pseudorotacji dla każdej geometrii opisującej minimum energetyczne, przypisując jednocześnie każdej strukturze odpowiednią konformację pierścienia (Tab. 4).

Tabela 4. Analiza konformacyjna zoptymalizowanych struktur cząsteczki **33**

Struktura	Kąt fazowy pseudorotacji P[°]	Konformacja
33a	86	^N T _O
33b	249	^N T ^O
33c	263	^N T ^O
33d	117	CH ₂ T ^N



Rys. 15. Inwersja konfiguracji atomu azotu na podstawie cząsteczki **33**

Obliczenia wskazują, że zmiana konfiguracji atomu azotu izoksazolidyny rozpoczyna się od niskoenergetycznej zmiany konformacji pierścienia. Właściwa inwersja konfiguracji atomu azotu jest możliwa dopiero po osiągnięciu jednej z geometrii cząsteczki, która ma tę samą konfigurację azotu, jednak przeciwną konformację pierścienia (**33b** i **33d**) w porównaniu z początkową geometrią (**33a** i **33c**).

Na skutek odnalezienia i optymalizacji wszystkich powyższych struktur możliwe było obliczenie teoretycznej bariery inwersji pomiędzy dwoma strukturami o najniższej energii (**35a** i **35c**). Wyniki obliczeń dla poszczególnych funkcjonałów obrazuje Tab. 5.

Tabela 5. Bariera energetyczna [kcal/mol] inwersji atomu azotu w pierścieniu izoksazolidyny dla przejścia **33a** → **33c** oraz **33c** → **33a**

Funkcjonał Baza	B3LYP 6-31G(d)	B3LYP 6-31++G(d,p)	M06 6-31++G(d,p)	WB97XD 6-31++G(d,p)
$\Delta E_{\text{inv. } 33a - 35c}$	13,85	13,42	13,23	14,12
$\Delta E_{\text{inv. } 35c - 35a}$	12,38	13,52	11,36	12,25

6. Perspektywy

W niniejszej publikacji przedstawiono i pokrótce scharakteryzowano wyniki dotychczasowych badań nad 1,3-dipolarną cykloaddycją nitronów do enaminyowych pochodnych zasad kwasów nukleinowych oraz C⁵-podstawionych uracyli. Metody chemii obliczeniowej pozwoliły przewidzieć najbardziej prawdopodobną drogę zahamowanej inwersji atomu azotu modelowej cząsteczki **33**, a niskotemperaturowa analiza NMR potwierdziła występowanie tego zjawiska dla całego szeregu otrzymanych związków. Głównym celem syntezy wciąż pozostaje otrzymanie szeregu fluorowanych izoksazolidynowych analogów nukleozydów oraz szeroko pojęta funkcjonalizacja ich pięcioczłonowego pierścienia imitującego pierścień rybozy.

Literatura

- [1] Huisgen R. (1963) Kinetics and Mechanism of 1,3-Dipolar Cycloadditions, *Angew. Chem.* 2, 633–645.
- [2] Huisgen R. (1968) On the Mechanism of 1,3-Dipolar Cycloadditions. A Reply, *J. Org. Chem.* 33, 2291.

- [3] Huisgen R. (1976) 1,3-Dipolar cycloadditions. Concerted nature of 1,3-dipolar cycloadditions and the question of diradical intermediates, *J. Org. Chem.* 41, 403–419.
- [4] Mukhtyar S. Saini (2013) Biological significances of heterocyclic compounds, *Int. J. Pharm. Sci. Res.* 4, 66–77.
- [5] Baumann M., Baxendale I.R., Ley S.V., Nikbin N. (2011) An overview of the key routes to the best selling 5-membered ring heterocyclic pharmaceuticals, *J. Org. Chem.* 7, 442–495.
- [6] Silverstein F.E., Faich G., Goldstein J.L., Simon L.S., Pincus T., Whelton A., Makuch R., Eisen G., Agrawal N.M., Stenson W.F., Burr A.M., Zhao W.W., Kent J.D., Lefkowitz J.B., Verburg K.M., Geis G.S. (2000) Gastrointestinal toxicity with celecoxib vs nonsteroidal anti-inflammatory drugs for osteoarthritis and rheumatoid arthritis: the CLASS study: A randomized controlled trial. Celecoxib Long-term Arthritis Safety Study, *J. Am. Med. Assoc.* 284, 1247–1255.
- [7] Oh L.M. (2006) Synthesis of celecoxib via 1,3-dipolar cycloaddition, *Tetrahedron Lett.* 47, 7943–7946.
- [8] Korgaokar S.S., Patil P.H., Shab M.T., Parekh H.H. (1996) Studies on pyrazolines: Preparation and antimicrobial activity of 3-(3'(p-chlorophenylsulphonamidophenyl)-5 aryl-1H/acetyl) pyrazolines, *Indian J. Pharm. Soc.* 58, 222–225.
- [9] Nauduri D., Reddy G.B.S. (1998) Antibacterials and antimycotics: Part 1: Synthesis and activity of 2-pyrazoline derivatives, *Chem. Pharm. Bull.* 46, 1254–1260.
- [10] Uno H., Kurokawa M., Masuda Y., Nishimuura H. (1979) Studies on 3-substituted 1,2-benzisoxazole derivatives. Syntheses of 3-(sulfamoylmethyl)-1,2-benzisoxazole derivatives and their anticonvulsant activities, *J. Med. Chem.* 22, 180–183.
- [11] Shivakumar B., Nargund L.V.G. (1998) Synthesis of substituted fluoro-isoxazoles, Isoxazolines and pyridones AS antimicrobial and antiinflammatory agents, *Indian J. Heterocycl. Chem.* 8, 27–30.
- [12] Diana G.D., Mckinlay M.A., Otto M.J., Akullian V., Oglesby C. (1985) [(4,5-Dihydro-2-oxazolyl)phenoxy]alkyl]isoxazoles. Inhibitors of picornavirus uncoating, *J. Med. Chem.* 28, 1906–1910.
- [13] Tsuda M., Hirano K., Kubota T., Kobayashi J. (1999) Pyrinodemin A, a cytotoxic pyridine alkaloid with an isoxazolidine moiety from sponge *Amphimedon* sp., *Tetrahedron Lett.* 40, 4819–4920.
- [14] Kametani T., Nagahara T., Honda T. (1985) Chiral synthesis of the key intermediates of (+)- and (–)-thienamycin, *J. Org. Chem.* 50, 2327–2331.
- [15] Mellor B.J., Murray P.E., Thomas E.J. (1988) Aspects of the chemistry of dioxolanes: Synthesis of C-nucleoside analogues, *Tetrahedron* 54, 243–256.
- [16] Rassa G., Zanardi F., Cornia M., Casiraghi G. (1996) Model syntheses of thiazolidine nucleoside analogues, *Nucleos. Nucleot.* 15, 1113–1120.
- [17] Faury P., Camplo M., Mourier N., Traubaud C., Niddam V., Kraus J.-L. (1996) Synthesis, structural studies and antiretroviral evaluation of 3'-aza-4'-thia-2',3'-dideoxy-nucleosides (thiazolidine-nucleoside analogues), *Bull. Soc. Chim. Fr.* 133, 553–561.
- [18] Branalt J., Kvarnstrom I., Classon B., Samuelsson B. (1996) Synthesis of [4,5-bis(hydroxymethyl)-1,3-dioxolan-2-yl]nucleosides as potential inhibitors of HIV, *J. Org. Chem.* 61, 3599–3603.
- [19] Balzarini J. (1994) Document Metabolism and mechanism of antiretroviral action of purine and pyrimidine derivatives, *Pharm. World Sci.* 16, 113–126.
- [20] Tronchet J.M.J., Iznaden M., Barbalat-Rey F., Dhimane H., Ricca A., Balzarini J., De Clercq E. (1992) Isoxazolidine analogs of nucleosides, *Eur. J. Med. Chem.* 27, 555–560.

- [21] Vorbruggen H., Kroliekiewicz K., Bennua B. (1981) Nucleoside synthesis with trimethylsilyl triflate and perchlorate as catalysts, *Chem. Ber.* 114, 1234–1255.
- [22] Rong J., Roselt P., Plavec J., Chattopadhyaya J. (1994) The synthesis and conformation of 2'- and 3'-hypermodified tricyclic nucleosides and their use in the synthesis of novel 2'- or 3'-isomeric 4(7)-substituted isoxazolidine-nucleosides, *Tetrahedron* 50, 4921–4936.
- [23] Chiacchio U., Rescifina A., Corsaro A., Pistarà V., Romeo G., Romeo R. (2000) Diastereoselective and enantioselective synthesis of 4'-aza analogues of 2',3'-dideoxy-nucleosides, *Tetrahedron: Asymmetry* 11, 2045–2048.
- [24] Chiacchio U., Corsaro A., Iannazzo D., Piperno A., Procopio A., Rescifina A., Romeo G., Romeo R. (2001) A stereoselective approach to isoxazolidinyl nucleosides, *Eur. J. Org. Chem.* 10, 1893–1898.
- [25] Merino P., Franco S., Merchan F.L., Tejero T. (1998) Asymmetric synthesis of an isoxazolidine nucleoside analog of Thymine Polyoxin C, *Tetrahedron Lett.* 39, 6411–6414.
- [26] Ali S.A., Wazeer M.I.M. (2008) Study of inversion isomerism in some 4,5-*cis*-substituted-2-isoxazolidineethanols by NMR spectroscopy, *Spectrochim. Acta, Part A* 71, 292–295.
- [27] Raban M., Jones F.B., Carlson E.R., Banucci E., LeBel A. (1969) Stereochemistry at Trivalent Nitrogen. Steric and Solvent Effects on Slow Nitrogen Inversion in an Isoxazolidine, *J. Org. Chem.* 35, 1496–1499.
- [28] Hassner A., Maurya R., Friedman O., Gottlieb H.E. (1993) On the Conformation of Fused Five-Membered Heterocyclic Rings Derived from the Intramolecular Oxime Olefin Cycloaddition Reaction, *J. Org. Chem.* 58, 4539–4546.
- [29] Piela L. (2005) *Idee chemii kwantowej*, Wyd. Nauk. PWN, Warszawa, 435–466.

PRZEMIANY FOTOCHEMICZNE STATYN

DOROTA JARMUŻEK, DONATA PLUSKOTA-KARWATKA

Wydział Chemii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza
ul. Umultowska 89b, 61-614 Poznań
e-mail: dorota.jarmuzek@wp.pl, donatap@amu.edu.pl

Hasła do zapamiętania: statyny, metabolity wtórne, reduktaza HMG-CoA, fototrwałość, fototoksyczność, fotosensybilizator

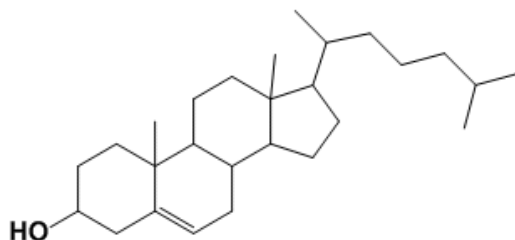
Wykaz skrótów:

reduktaza HMG-CoA	– reduktaza 3-hydrokso-3-metyloglutarylokoenzymu A
HMG-CoA	– 3-hydrokso-3-metyloglutarylokoenzym A
RSV	– rosuwastatyna
FLV	– fluwastatyna
UV	– promieniowanie ultrafioletowe
ESI	– elektrorozpylanie (ang. <i>electrosprey ionisation</i>)
Enz	– reduktaza nanoketydowa
AcCoA	– acetylokoenzym A
MalCoA	– malonylokoenzym A
CYP3A4	– cytochrom P450 3A4
NADPH	– dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy
CH ₃ Met	– S-adenozyno-L-metionina
HCys	– S-adenozyno-L-homocysteina

1. Wprowadzenie

Cholesterol został po raz pierwszy wyizolowany z kamieni żółciowych w 1784 roku. Jego nazwa pochodzi z języka greckiego: *chole* – żółć, *stereos* – stały; jej twórcą jest francuski chemik Michel E. Chevreul. Struktura cholesterolu została określona przez austriackiego botanika Friedericha Reinitzera w 1888 roku. Za badania nad cholesterolem przyznano 13 Nagród Nobla, m.in. dla Heinricha O. Wielanda w 1927 roku oraz Adolfa Windausa w 1928 roku [1].

Cząsteczka cholesterolu składa się z trzech pierścieni 6- i jednego 5-członowego oraz 8-członowego łańcucha węglowego [1, 2] (Rys. 1). W jednym z pierścieni cykloheksylowych obecne jest wiązanie podwójne [2].



Rys. 1. Struktura cholesterolu [2]

Cholesterol jest niezbędny do prawidłowego funkcjonowania organizmu człowieka. Jednak jego podwyższony poziom w osoczu krwi (hipercholesterolemia) może być przyczyną choroby wieńcowej [1, 3–5]. Choroba niedokrwienna serca jest kluczowym objawem klinicznym miażdżycy. Hipercholesterolemia może także przyczyniać się do miażdżycy tętnic obwodowych i krążenia mózgowego [5].

Choroba niedokrwienna serca jest główną przyczyną zgonów w krajach uprzemysłowionych oraz rozwijających się [5]. Dotyka około 13 do 14 milionów dorosłych w USA [6].

W latach 50. i 60. XX wieku do użycia wprowadzonych zostało wiele środków obniżających poziom cholesterolu. Wśród nich były kwas nikotynowy, cholestyramina, neomycyna, sterole roślinne oraz tripanol. Do lat 70. nie znano jednak dobrego leku obniżającego poziom cholesterolu w osoczu krwi [4].

Na początku lat 70. XX wieku z grzybów *Penicillium citrinum* wyizolowano związek ML-236B będący ich wtórnym metabolitem. Wykazano, że związek ten posiada zdolność obniżania poziomu cholesterolu w osoczu krwi. ML-236B był pierwszym przedstawicielem leków z grupy statyn – nowych, skutecznych środków stosowanych w leczeniu hipercholesterolemii. Środki te wykazywały większą skuteczność działania niż ówczesnie znane. W 1987 r. wprowadzono do użycia lek o nazwie *Mevacor*[®], którego składnikiem aktywnym była lowastatyna [5].

Opublikowane w latach 90. XX wieku wyniki badań dotyczących działania statyn spowodowały, że związki te stały się bardzo popularnymi lekami stosowanymi w leczeniu choroby niedokrwiennej serca [7]. Badania wykazały, że środki te są bezpieczne i nie powodują zbyt wielu efektów ubocznych [4].

Obecnie statyny są szeroko stosowane w krajach Europy oraz USA [8, 9]. Aktywnymi składnikami leków są głównie: lowastatyna, simwastatyna, prawastatyna, fluwastatyna, atorwastatyna [4, 10], pitawastatyna oraz rosuwastatyna [10]. Mechanizm działania tej grupy leków polega na odwracalnej inhibicji reduktazy HMG-CoA – enzymu katalizującego kluczowy etap szlaku biosyntezy cholesterolu [1–7, 11, 12].

Bardzo ważnym etapem badań klinicznych leków jest charakterystyka ich trwałości pod wpływem działania różnych czynników środowiska, takich jak: światło, temperatura, wilgotność. Szczególnie istotne są badania dotyczące fototrwałości, czyli odporności leku na działanie promieniowania słonecznego [10]. Statyny należą do grupy leków ulegających stosunkowo szybkiej fotodegradacji. Z danych literaturowych wynika, że fototoksyczność statyn związana jest z właściwościami tworzących się fotoproduktów [9, 10, 13].

2. Podział statyn

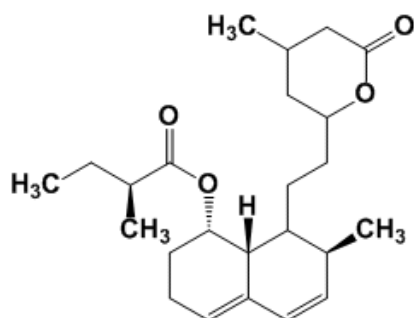
2.1. Odkrycie statyn

Badania nad mikroorganizmami doprowadziły do hipotezy, że organizmy te posiadają mechanizmy umożliwiające obniżanie poziomu cholesterolu we krwi. Zakładano, że wytwarzane przez nie wtórne metabolity hamują działanie reduktazy HMG-CoA katalizującej przekształcanie 3-hydroksy-3-metyloglutarylo-CoA w mewalonian, powodując tym samym zatrzymanie metabolicznego szlaku biosyntezy cholesterolu [1, 5].

Pierwszym wyizolowanym związkami był citrin. Otrzymano go z pleśni *Pythium ultimum*. Związek ten silnie i nieodwracalnie inhibował reduktazę HMG-CoA. Badania przeprowadzane z udziałem zwierząt eksperymentalnych wykazały szkodliwy wpływ citrinu na nerki szczurów [1, 3].

Toksyczność citrinu spowodowała kontynuację badań. Zarówno zielononiebieska pleśń *Penicillium citrinum*, znaleziona w próbkach ryżu, jak i pleśń *Penicillium brevicompactum* wykazywała aktywność w obniżaniu poziomu cholesterolu we krwi. Z pleśni *Penicillium citrinum* [4] za pomocą ekstrakcji rozpuszczalnikiem organicznym, chromatografii oraz krystalizacji wyizolowano trzy aktywne związki [1, 3, 5]. Największą aktywność wykazywał związek o nazwie kompaktyna (ML-236B) (Rys. 2). Pierwsze badania z udziałem kompaktyny prowadzone były m.in. na myszach, psach i kurach. Wśród wszystkich zwierząt z wyjątkiem szczurów kompaktyna wykazywała zdolność obniżania poziomu cholesterolu [1].

Kompaktyna ze względu na swoje podobieństwo strukturalne do HMG-CoA odwracalnie [1, 3] hamowała działanie reduktazy HMG-CoA zgodnie z mechanizmem inhibicji kompetycyjnej [1].

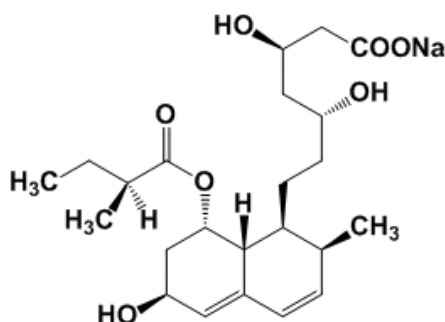


Rys. 2. Struktura kompaktyny (mewastatyny) [3]

2.2. Statyny pochodzenia naturalnego i półsyntetycznego

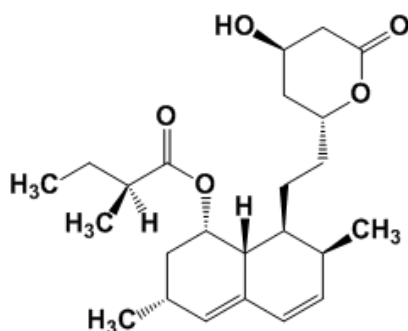
Kompaktyna nazwana mewastatyną stała się prekursorem leków z rodziny statyn [1, 3]. Badania farmakologiczne i toksykologiczne z udziałem mewastatyny nie wykazywały żadnych nieprawidłowości. Jedyną niepokojącą informacją było wykrycie chlóniaka u psów, które otrzymywały znaczną dawkę związku. Mewastatyna wykazywała dużą skuteczność w obniżaniu poziomu cholesterolu we krwi nawet u pacjentów z zaawansowaną hipercholesterolemią [1].

Kontynuacja badań doprowadziła do otrzymania półsyntetycznego leku – prawastatyny (Rys. 3) [3]. Uzyskano go poprzez mikrobiologiczne zmiany u grzybów [4, 5].



Rys. 3. Struktura prawastatyny [3]

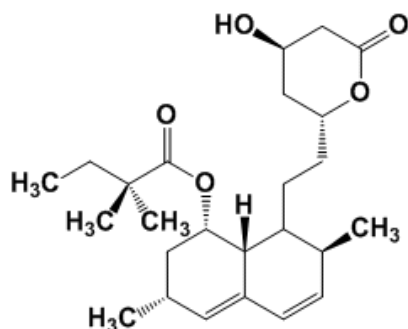
W wyniku dalszych badań, z grzybów *Aspergillus terreus* wyizolowano kolejny związek o budowie podobnej do mewastatyny. Związek ten nazwano mewinolinem [1, 4, 5]. Badania innej grupy uczonych doprowadziły do wyizolowania trzech analogów mewastatyny: monakolinu J, monakolinu K, oraz monakolinu L z grzybów *Monascus ruber*. Monakolin K wykazywał dezaktywujący wpływ na reduktazę HMG-CoA, silniejszy niż mewastatyna [5]. Porównanie struktur monakolinu K i mewinolinu wykazało, że są one identyczne. Oba związki określono później wspólną nazwą: lowastatyna (Rys. 4) [1, 5].



Rys. 4. Struktura lowastatyny [3]

Lowastatyna stała się pierwszym komercyjnym lekiem z grupy statyn stosowanym w leczeniu m.in. hipercholesterolemii [1, 5, 11, 14].

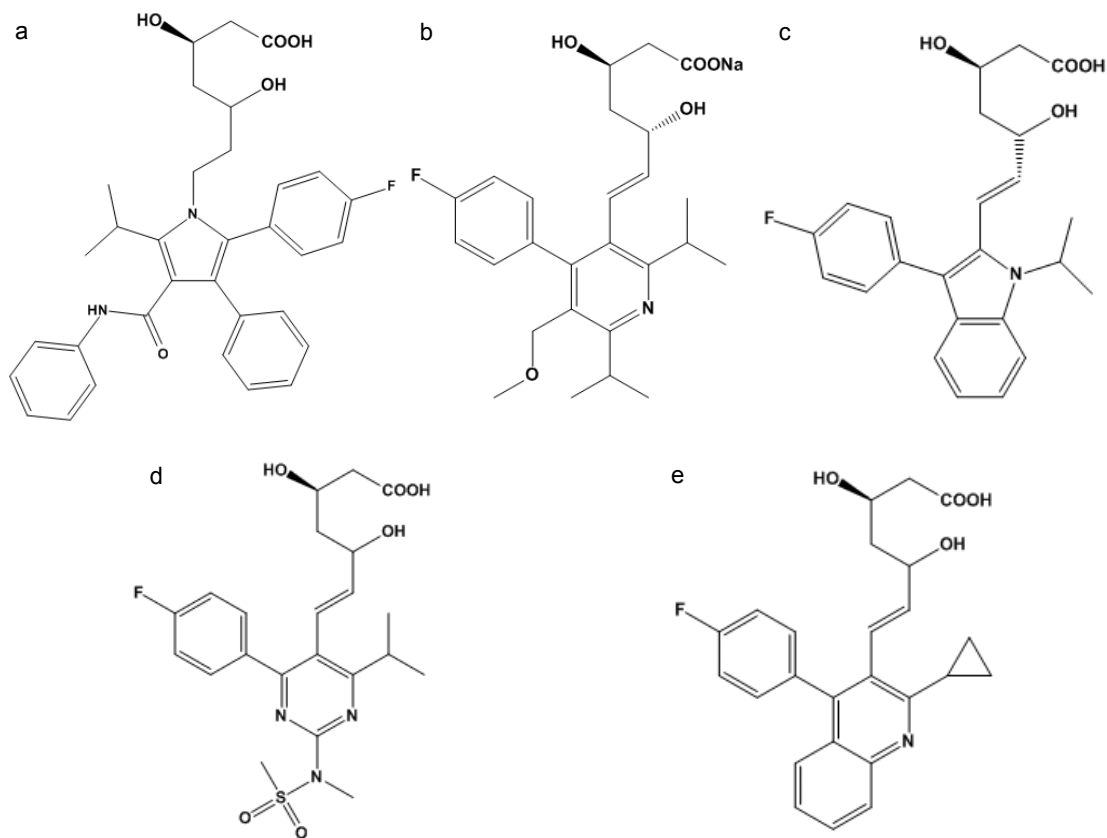
Kolejnym lekiem była simwastatyna – związek półsyntetyczny powstający w wyniku chemicznej modyfikacji naturalnych produktów (Rys. 5) [3, 4].



Rys. 5. Struktura simwastatyny [2]

2.3. Statyny pochodzenia syntetycznego

Modyfikacje w strukturze statyn pochodzenia naturalnego, głównie zastąpienie pierścienia dekaliny pierścieniem aromatycznym, doprowadziły do syntezy nowych związków: fluwastatyny, atorwastatyny, ceriwastatyny [2, 11], rosuwastatyny [1–3] i pitawastatyny (Rys. 6) [15].



Rys. 6. Struktura: a – atorwastatyny, b – ceriwastatyny, c – fluwastatyny, d – rosuwastatyny [2], e – pitawastatyny [15]

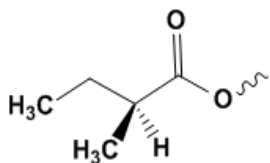
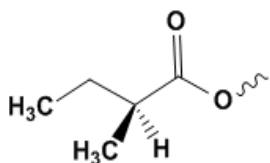
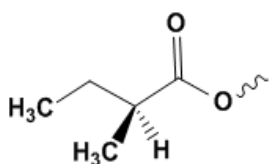
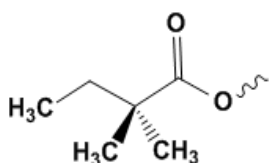
3. Budowa statyn

Statyny, w zależności od pochodzenia, mają różną budowę. Wspólnym dla wszystkich statyn fragmentem strukturalnym jest ugrupowanie o budowie podobnej do występującego w HMG-CoA [2, 4, 6, 16].

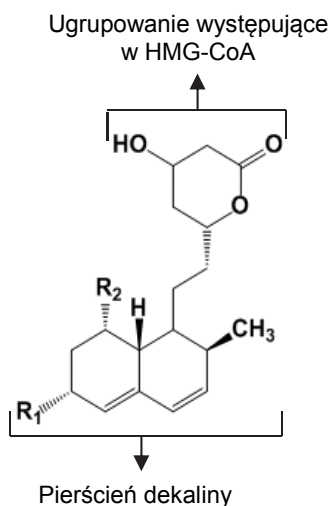
3.1. Statyny typu 1

Ze względu na budowę, inhibitory reduktazy HMG-CoA dzieli się na typu 1 i 2. Do grupy związków typu 1 należą statyny pochodzenia naturalnego i półsyntetycznego: mewastatyna, lowastatyna, simwastatyna oraz prawastatyna [2, 4]. Statyny są analogami strukturalnymi [2, 4, 6, 16]. Głównym elementem ich budowy jest ugrupowanie poliketydowe oraz układ pierścieniowy będący pochodną dekaliny [2]. Różnice w budowie stanowią podstawniki obecne przy atomach węgla C6 (R_1) i C8 (R_2) pierścienia dekaliny (Rys. 7, Tab. 1) [2, 4].

Tabela 1. Różnice w strukturze statyn typu 1

Statyna	R_1	R_2
Mewastatyna	H	
Lowastatyna	CH ₃	
Prawastatyna	OH	
Simwastatyna	CH ₃	

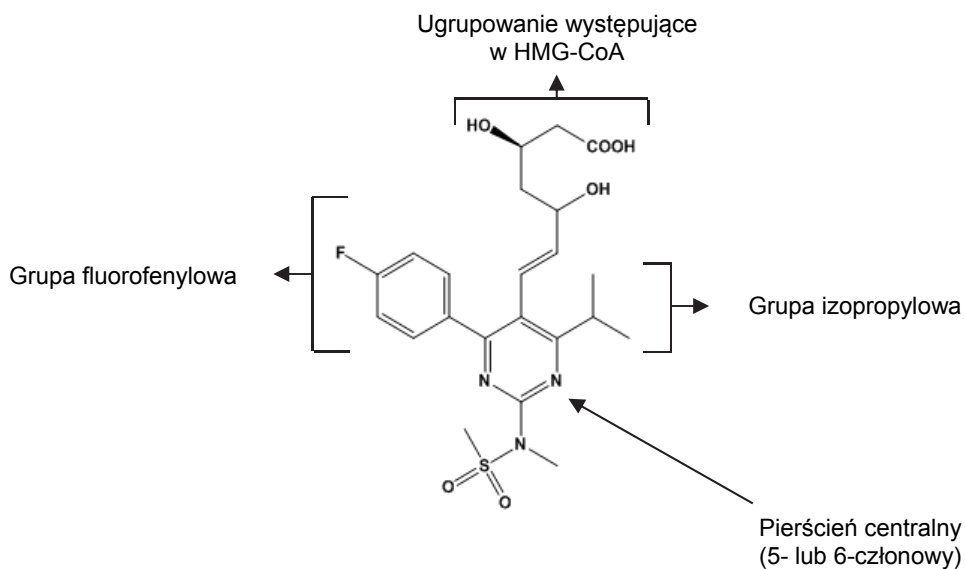
W mewastatynie, lowastatynie oraz prawastatynie przy atomie węgla C8 występuje ugrupowanie kwasu metylomasłowego, podczas gdy w simwastatynie – kwasu dimetylomasłowego [4].



Rys. 7. Struktura statyn typu 1 [2]

3.2. Statyny typu 2

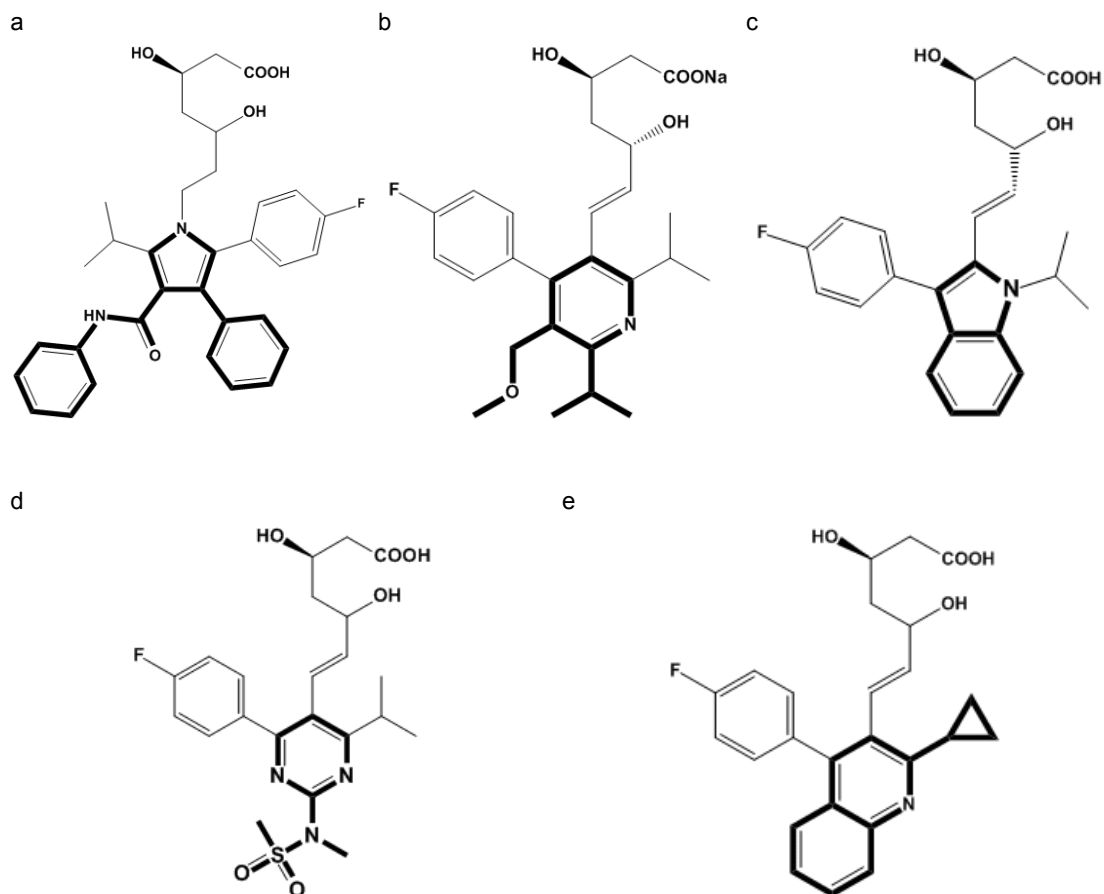
Do grupy związków typu 2 należą statyny pochodzenia syntetycznego: fluwastatyna, rosuwastatyna, atorwastatyna, ceriwastatyna [2, 4, 6], pitawastatyna [15]. Cechą charakterystyczną tych związków jest obec-



Rys. 8. Struktura statyn typu 2 [2]

ność grupy izopropylowej oraz fluorofenylowej [2]. Jedynie pitawastatyna zamiast grupy izopropylowej posiada pierścień cyklopropanowy [15]. Inhibitory te posiadają także w swojej strukturze pierścień 5- lub 6-członowy zawierający atomy azotu (Rys. 8) [2, 6].

Ceriwastatyna oraz pitawastatyna [18] zawierają pierścień pirydynowy, rosuwastatyna – pirymidynowy, fluwastatyna – pirolinowy oraz atorwastatyna – pirolowy. Oprócz elementów wspólnych, każda z wymienionych statyn posiada w swej strukturze charakterystyczne dla siebie ugrupowania, zaznaczone na Rys. 9 [2, 4, 6].



Rys. 9. Budowa statyn typu 2 z zaznaczeniem charakterystycznych elementów struktury; a – atorwastatyna, b – ceriwastatyna, c – fluwastatyna, d – rosuwastatyna, e – pitawastatyna [2, 4, 15]

4. Biosynteza statyn

Statyny ze względu na budowę zalicza się do grupy związków poliketydowych. Inhibitory reduktazy HMG-CoA syntezowane są przez grzyby strzępkowe. Biotechnologiczna produkcja statyn prowadzona jest głównie przy użyciu grzybów z gatunku *Penicillium*, *Monascus* oraz *Aspergillus* [17–19].

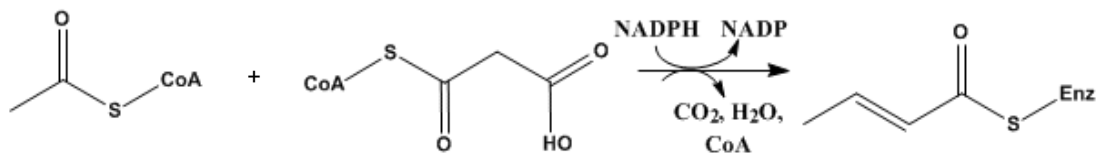
Największą wydajność biosyntezy lowastatyny uzyskuje się z grzybów *Aspergillus terreus* i ich mutantów. Modyfikowane genetycznie gatunki *Aspergillus terreus* wykazują większą wydajność biosyntezy w stosunku do ich naturalnych prekursorów. Zastosowanie mutantów umożliwia uniknięcie tworzenia produktów ubocznych [17].

Biosynteza związków poliketydowych zachodzi w dwóch etapach: w pierwszym, tzw. etapie PKS, bierze udział syntaza nanoketydowa (Enz). Enzym zawiera kilka miejsc aktywnych o różnych właściwościach. Podczas drugiego etapu, zwanego *post PKS tailoring*, zachodzi modyfikacja produktu z etapu PKS [17, 18]. Sumaryczny zapis reakcji został przedstawiony na Rys. 10 [17].



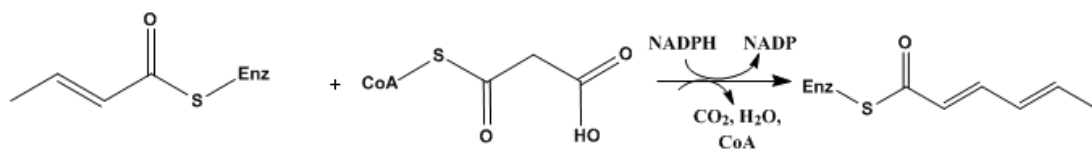
Rys. 10. Biosynteza statyn [17]

Etap PKS biosyntezy lowastatyny składa się z 9 podetapów, w których następuje wydłużenie łańcucha węglowego [33, 34]. W pierwszej reakcji, katalizowanej przez ketoreduktazę, do acetylo-CoA (AcCoA) przyłączony zostaje malonylo-CoA (MalCoA), dając diketyd. Następnie zachodzi dekarboksylacja produktu pośredniego. Reakcja zachodzi w obecności NADPH. W etapie tym zostaje również usunięta z produktu cząsteczka wody i tworzy się wiązanie podwójne (Rys. 11) [17].



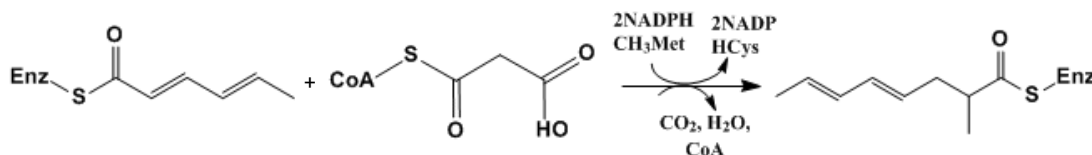
Rys. 11. Schemat syntezy diketydu [17]

Tworzenie triketydu zachodzi poprzez przyłączenie do powstałego di-ketydu kolejnej cząsteczki MalCoA, a następnie dehydratację i dekarboksylację (Rys. 12) [17].



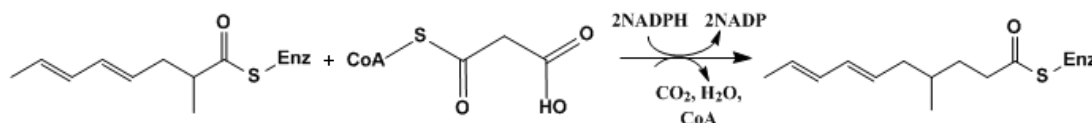
Rys. 12. Schemat syntezy triketydu [17]

Synteza tetraketydu również zachodzi w wyniku addycji cząsteczki MalCoA, dehydratacji oraz dekarboksylacji. Następnie do powstałego produktu przyłączona zostaje grupa metylowa pochodząca z S-adenozyl-L-metioniny (CH-Met) oraz atom wodoru z cząsteczki NADPH. Reakcje te katalizowane są odpowiednio przez metylotransferazę oraz enoiloreduktazę (Rys. 13) [17].

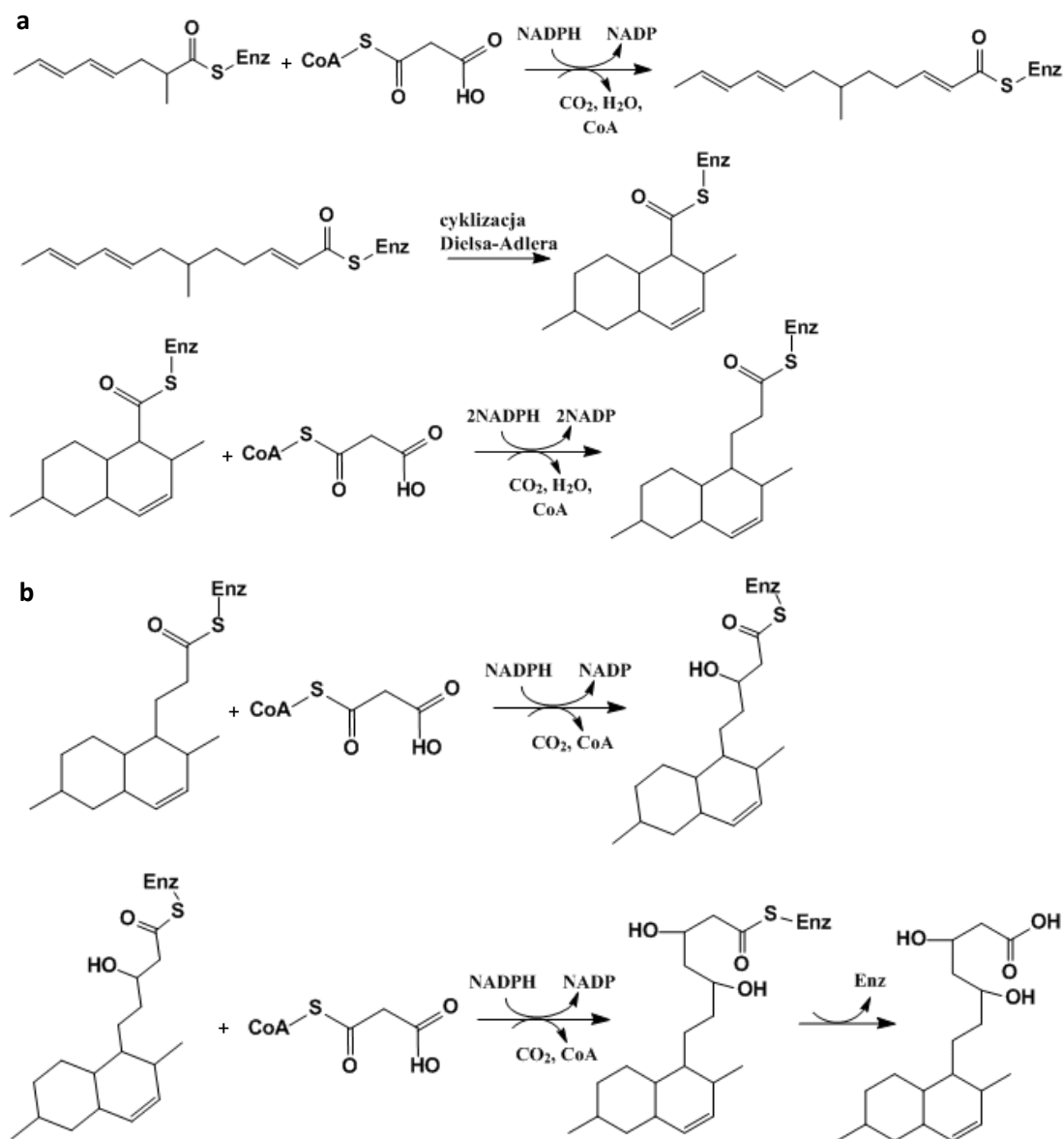


Rys. 13. Schemat syntezy tetraketydu [17]

Na kolejny etap ponownie składa się wydłużenie łańcucha węglowego, dekarboksylacja, dehydratacja oraz redukcja powstałego pentaketydu atomem wodoru pochodzącym z cząsteczki NADPH. Reakcje te również katalizowane są odpowiednio przez ketoreduktazę, dehydratazę oraz enoiloreduktazę (Rys. 14) [17].



Rys. 14. Schemat pentaketydu [17]

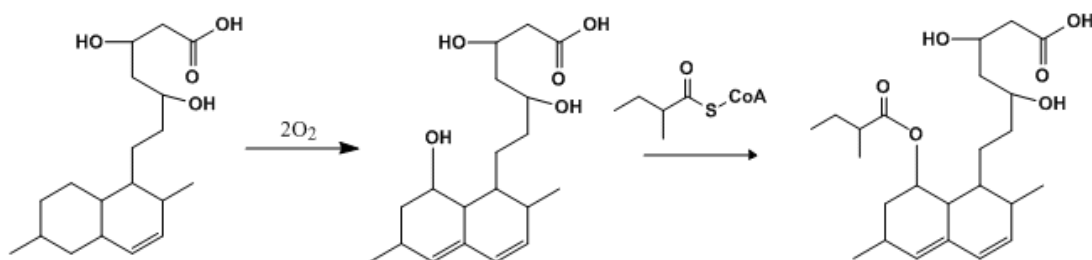


Rys. 15. Schemat syntezy (a) heksaketydu, (b) 4a,4-dihydromonakoliny L [17]

Przyłączenie następnej cząsteczki MalCoA do pentaketydu oraz dekarboksylacja i dehydratacja prowadzi do powstania heksaketydu, który ulega reakcji cyklizacji Dielsa–Adlera; do cyklicznego powstałego produktu pośredniego przyłączona zostaje cząsteczka MalCoA. Reakcje te kata-

lizowane są przez ketoreduktazę, dehydrogenazę oraz enoiloreduktazę (Rys. 15a). Końcowe etapy związane są z przyłączeniem MalCoA i wytworzeniem nanoketydu. Ostatecznie z powstałego produktu zostaje usunięty enzym, dając 4a,4-dihydromonakolinę L (Rys. 15b) [17].

W etapie *post* PKS dochodzi do utlenienia 4a,4-dihydromonakoliny L, a następnie zachodzi reakcja transestryfikacji z kwasem (2*R*)-metylo-masłowym (Rys. 16). W wyniku ostatniego etapu biosyntezy powstaje forma hydroksykwasowa lowastatyny [17, 18].



Rys. 16. Schemat syntezy lowastatyny [17]

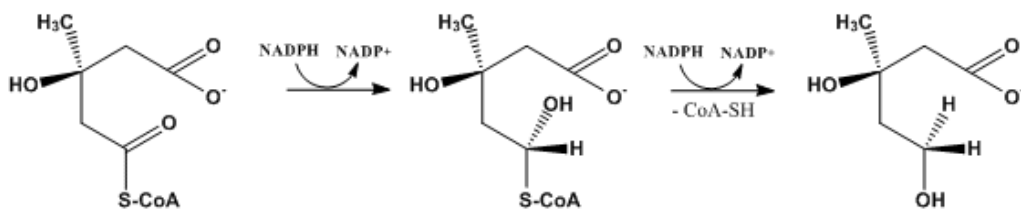
Statyny w mikroorganizmach syntezowane są w postaci hydroksykwasów. Podczas wydzielania związków z podłoży fermentacyjnych zachodzi reakcja laktonizacji i powstają aktywne biologicznie formy statyn [17].

Na wydajność procesów fermentacyjnych grzybów istotny wpływ ma skład stosowanego podłoża, m.in. zawartość i źródło węgla, azotu, fosforu, a także wartość pH oraz nasycenie tlenem. Badania wykazały, że najlepszym źródłem węgla są węglowodory wolno przyswajalne, np. mieszanina laktozy i glicerolu. Deficyt azotu również korzystnie wpływa na wydajność procesu syntezy lowastatyny [17, 19].

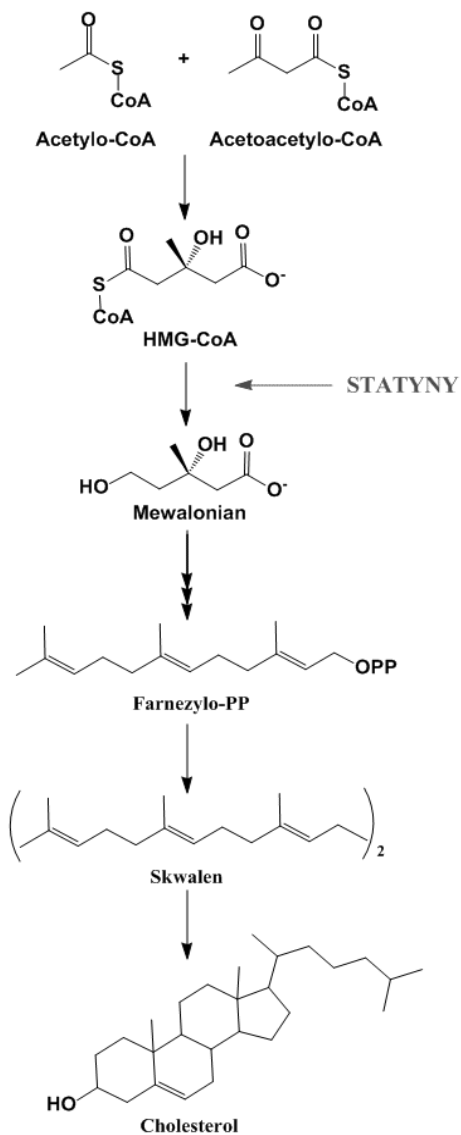
5. Mechanizm działania statyn

5.1. Biosynteza cholesterolu

Cholesterol jest związkiem steroidowym, niezbędnym składnikiem błon komórkowych oraz substratem w biosyntezie m.in. kwasów żółciowych i hormonów steroidowych [4]. Cholesterol występujący w organizmie ma pochodzenie egzo- i endogenne [1, 4].



Rys. 17. Mechanizm przekształcenia HMG-CoA w mewalonian [3]



Rys. 18. Szlak metaboliczny biosyntezy cholesterolu z zaznaczeniem miejsca działania statyn [2]

Egzogenny cholesterol jest absorbowany wraz z dietą i stanowi około 1/3 całkowitego cholesterolu, pozostałe 2/3 to cholesterol endogenny syntezowany głównie w wątrobie [1].

Szlak metaboliczny biosyntezy cholesterolu składa się z kilku etapów [1, 4], w których bierze udział 25 enzymów [4]. Jednym z nich jest reduktaza 3-hydroksy-3-metyloglutarylokoenzymu A (reduktaza HMG-CoA). Enzym ten katalizuje reakcję przekształcenia 3-hydroksy-3-metyloglutarylokoenzymu A (HMG-CoA) w mewalonian, stanowiącą kluczowy etap decydujący o szybkości biosyntezy cholesterolu (Rys. 17) [1–6, 12, 20–23].

Działanie statyn polega na zahamowaniu aktywności reduktazy HMG-CoA. Mechanizm działania opiera się na odwracalnej inhibicji kompetycyjnej [1–6, 12, 20–23], czyli współzawodnictwie pomiędzy substratem a inhibitorem o miejsce aktywne enzymu [24].

Inhibicja reduktazy HMG-CoA hamuje biosyntezę cholesterolu w wątrobie [1] (Rys. 18), a tym samym umożliwia obniżenie jego poziomu we krwi [1–6, 12, 20–23].

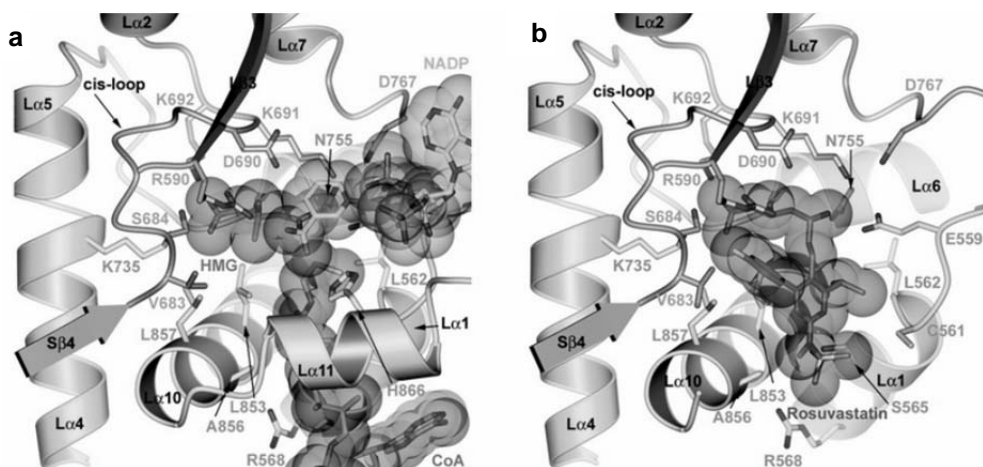
Zablokowanie szlaku metabolicznego biosyntezy cholesterolu powoduje zwiększenie na powierzchni wątroby liczby receptorów odpowiedzialnych za wychwytywanie z osocza krwi cząsteczek cholesterolu LDL, zwiększającego m.in. ryzyko choroby wieńcowej [2, 4, 12, 14, 20]. Na skutek działania tych receptorów zwiększa się stosunek cholesterolu HDL do LDL i jednocześnie obniża się jego całkowity poziom we krwi [4].

5.2. Budowa miejsca aktywnego HMG-CoA

Reduktaza HMG-CoA jest ściśle związanym tetramerem, jednak w katalizie kluczową rolę odgrywają jej dimery [2].

Do miejsca aktywnego enzymu muszą być doprowadzone dwie cząsteczki substratu. Reduktaza HMG-CoA w miejscu wiązania HMG-CoA zawiera pętlę (*cis-loop*), składającą się z aminokwasów: Ser⁶⁸⁴, Asp⁶⁹⁰, Lys⁵⁹¹, Lys⁶⁹², których reszty umożliwiają prawidłowe ułożenie ugrupowania HMG substratu [2]. Reszty Glu⁵⁵⁹ i His⁸⁶⁶ [2] tworzą wąską kieszeń, która wiąże kwas pantotenowy z ugrupowania CoA substratu (Rys. 19a) [6].

Statyny ze względu na to, że zawierają w swej strukturze fragment o budowie podobnej do obecnego w HMG-CoA, mogą oddziaływać z miejscem aktywnym reduktazy [1–6, 12, 20–23]. Posiadają zdolność dostosowania konformacji hydrofobowych grup do kształtu kieszeni miejsca aktywnego (Rys. 19b) [6].



Rys. 19. Struktura kompleksu aktywnego: a – enzym–substrat (HMG-CoA), b – enzym–inhibitor (statyny) [6]

Oddziaływania fragmentu strukturalnego statyn podobnego do ugrupowania HMG z miejscem aktywnym enzymu mają charakter jonowy lub polarny [2]. Ugrupowanie to oddziałuje z tymi samymi resztami aminokwasowymi co substrat [4]. Sztwyne hydrofobowe pierścienie statyn są wiązane pomiędzy helisami Lα1 i Lα10 tworzącymi płytki rowek (*shallow Groove*) [2, 6]. Hydrofobowe łańcuchy reszt aminokwasów Leu⁵⁶², Val⁶⁸³, Leu⁸⁵³, Ala⁸³⁶, Leu⁸⁵⁷ tworzą oddziaływania van der Waalsa ze statynami [6].

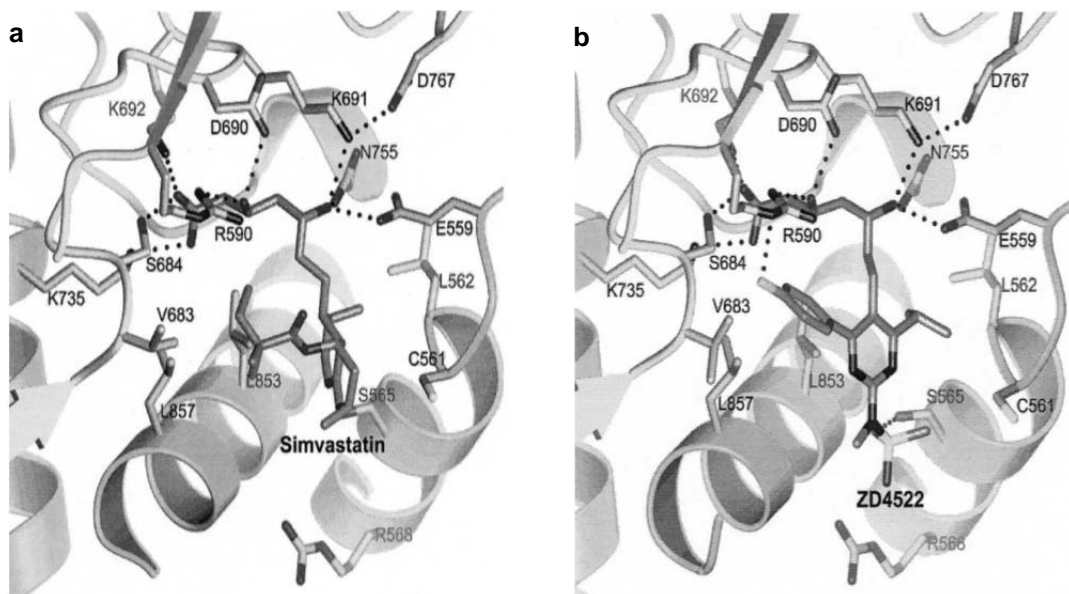
5.3. Inhibicja reduktazy HMG-CoA

Statyny typu 1 (inhibitory typu 1) tworzą liczne wiązania wodorowe, a pierścień dekaliny oddziałuje z helisami enzymu (Rys. 20a) [2, 6].

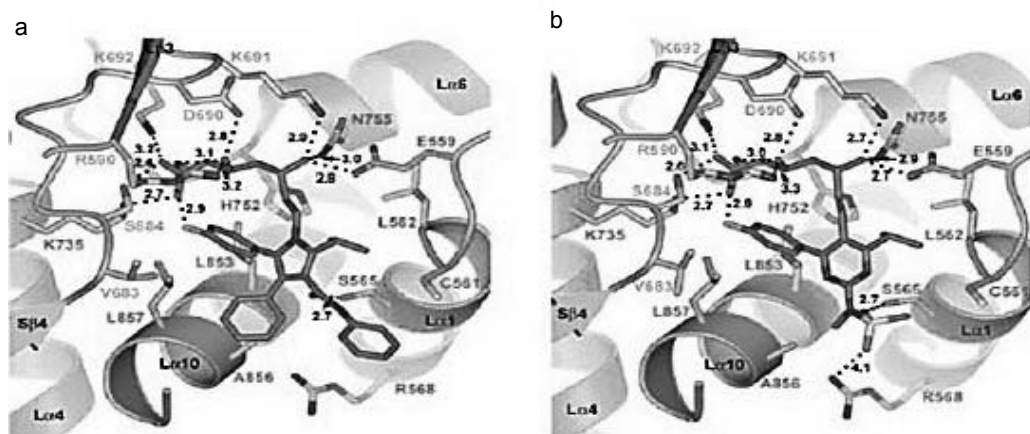
W inhibitorach typu 2 ugrupowanie izopropylowe zastępuje pierścień dekaliny. Statyny te generują dodatkowe wiązania z enzymem ze względu na obecność grupy fluorofenyłowej oddziałującej z grupą guanidynową reszty Arg⁵⁹⁰ [2, 6]. Obecne są również polarne interakcje pomiędzy ε atomem azotu argininy a atomem fluoru. Ugrupowanie butyryłowe inhibitorów typu 1 wiązane jest w podobnym obszarze co grupa fluorofenyłowa (Rys. 20b) [6].

Każda ze statyn wiąże się w charakterystyczny dla siebie sposób z miejscem aktywnym enzymu. Na szczególną uwagę zasługują: rosuwastatyna oraz atorwastatyna. Tworzą one wiązania wodorowe między resztą Ser⁵⁶⁵ a atomem tlenu z grupy metylosulfonowej w przypadku ro-

suwastatyny i atomem tlenu z grupy karbonylowej w atorwastatynie (Rys. 21a). Ponadto elektroujemna grupa metylosulfonowa rosuwastatyny tworzy polarne oddziaływania z łańcuchem Arg⁵⁶⁸ (Rys. 21b) [2, 6, 20].



Rys. 20. Struktura kompleksu aktywnego: a – enzym–statyna typu 1, b – enzym–statyna typu 2 [2]



Rys. 21. Struktura kompleksu aktywnego enzym–statyny: a – atorwastatyna, b – rosuwastatyna [6]. Oddziaływania pomiędzy ugrupowaniem inhibitora podobnym do odpowiedniego ugrupowania substratu oznaczono linią przerywaną

6. Fototoksyczność i fototrwałość statyn

Promieniowanie z zakresu UV-Vis może istotnie wpływać na działanie leków. Może przyczyniać się do zmiany ich trwałości i w konsekwencji prowadzić do toksyczności [25].

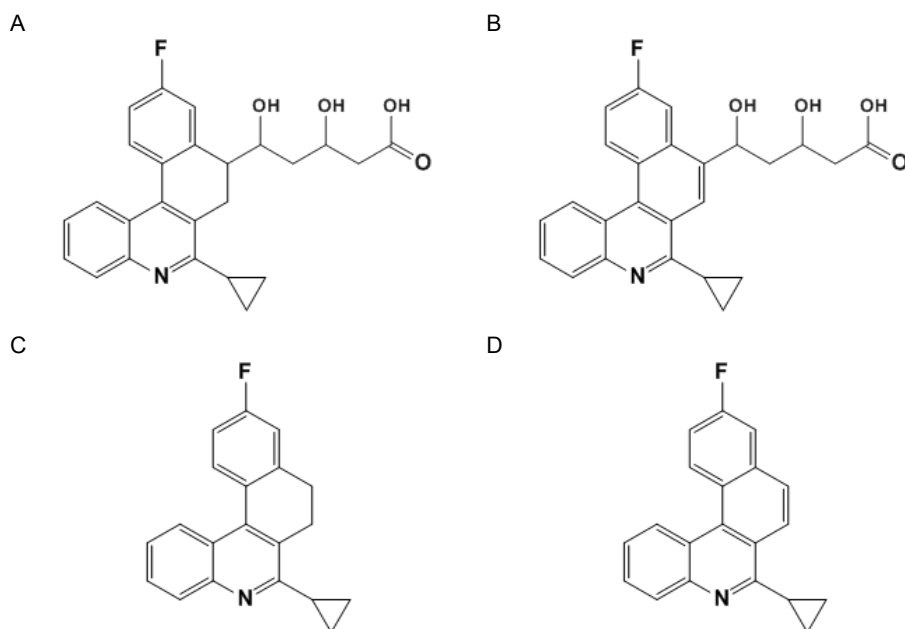
Fototrwałość leków jest definiowana jako wpływ promieniowania na szybkość degradacji związku. Zjawisko to związane jest nie tylko z dekompozycją związku, ale także z tworzeniem się m.in. wolnych rodników, uwolnieniem energii lub luminescencją [23].

Większość związków mających właściwości fototoksyczne charakteryzuje się obecnością w strukturze przynajmniej jednego wiązania podwójnego lub pierścienia aromatycznego. Taka budowa umożliwia absorpcję promieniowania przez elektrony, w wyniku czego cząsteczka przechodzi z singletowego stanu podstawowego w trypletowy stan wzbudzony. Podczas powrotu do stanu podstawowego uwalniany jest nadmiar energii. Proces ten może prowadzić do wytworzenia np. reaktywnych form tlenu, takich jak: tlen singletowy, anion ponadtlenkowy, rodnik wodorotlenkowy czy hydroksylowy. Te indywidualne chemiczne są bardzo reaktywne i powodują np. uszkodzenie membran komórkowych lub cząsteczek DNA. Na skutek tego zostają aktywowane systemy ochronne organizmu, których działanie może przejawiać się m.in. stanami zapalnymi skóry [25].

Statyny należą do leków mogących wykazywać fototoksyczne właściwości. Związki te pod wpływem działania promieniowania UV-Vis stosunkowo łatwo ulegają degradacji [10]. Wysoką reaktywność fotochemiczną wykazują głównie statyny syntetyczne [25], wśród statyn naturalnych degradacji może ulegać lowastatyna [27]. Promieniowanie, jego rodzaj oraz energia, a także obecność argonu, odległość od źródła promieniowania mają istotny wpływ na powstające fotoprodukty [8–12, 22, 25, 27–30]. Na szybkość i wydajność procesu wpływa także polarność rozpuszczalnika [10, 29].

6.1. Właściwości fotochemiczne pitawastatyny

Pitawastatyna absorbuje promieniowanie z zakresu UVA. Produktami naświetlania roztworu soli wapniowej pitawastatyny są związki A–D (Rys. 22). Fotoprodukty te charakteryzują się obecnością podobnych grup chromoforowych, różnią się natomiast ugrupowaniami determinującymi polarność związków [25].

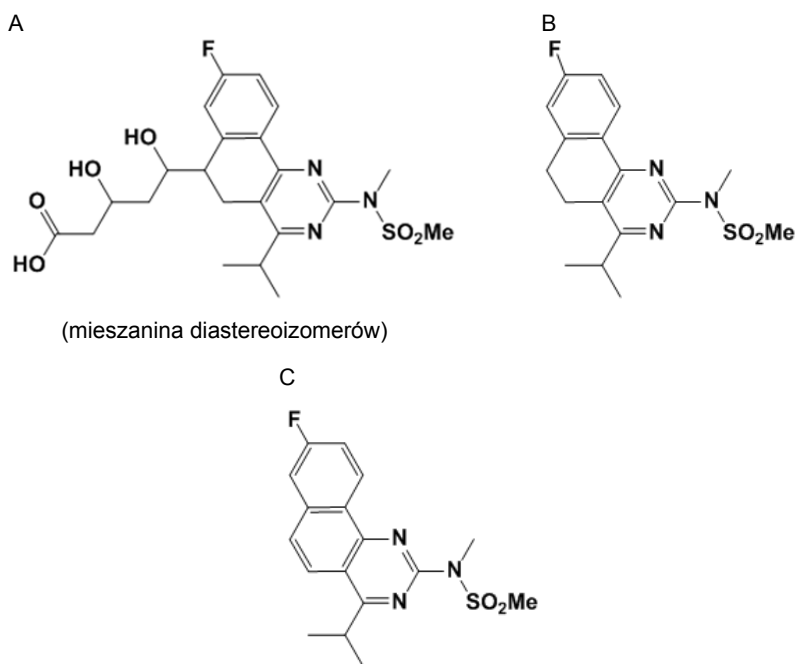


Rys. 22. Fotoprodukty pitawastatyny [25]

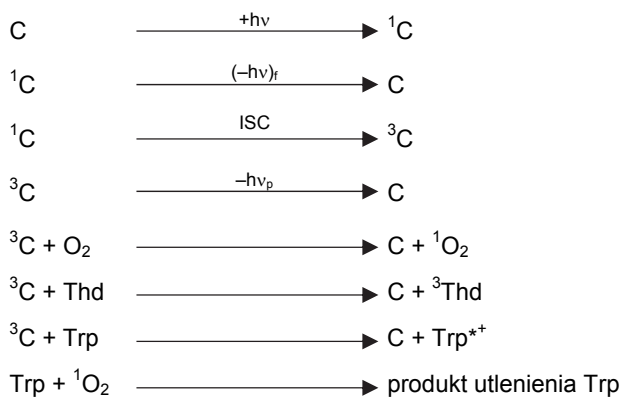
6.2. Właściwości fotochemiczne rosuwastatyny

Podobnie jak pitawastatyna, rosuwastatyna absorbuje promieniowanie z zakresu UVA. W wyniku przemian fotochemicznych rosuwastatyny, prowadzonych w atmosferze powietrza, powstają trzy fotoprodukty A–C (Rys. 23). Naświetlanie rosuwastatyny w atmosferze argonu prowadzi do otrzymania związków B i C (Rys. 23) [22]. Po trzech dniach naświetlania związek A ulega przekształceniu w fotoprodukty B i C [22]. Stwierdzono, że związek C wykazuje silniejszą absorpcję promieniowania UVA niż rosuwastatyna [8].

Fototoksyczność rosuwastatyny wynika głównie z właściwości fotoproduktu C. Wzbudzenie związku C może prowadzić m.in. do fluorescencji (F) lub konwersji międzysystemowej (ISC), czyli do jego przejścia ze stanu singletowego w stan trypletowy (3C). Fotoprodukt C w trypletowym stanie wzbudzonym może reagować także z obecnymi w środowisku cząsteczkami tlenu, dając tlen singletowy (1O_2) oraz z białkami. W wyniku interakcji fotoproduktu z tymidyną może dojść do jej przekształcenia w pochodne (Thd \leftrightarrow Thd), co powoduje patologiczne zmiany w cząsteczkach DNA (Rys. 24) [8].



Rys. 23. Fotoprodukty rosuwastatyny [22]

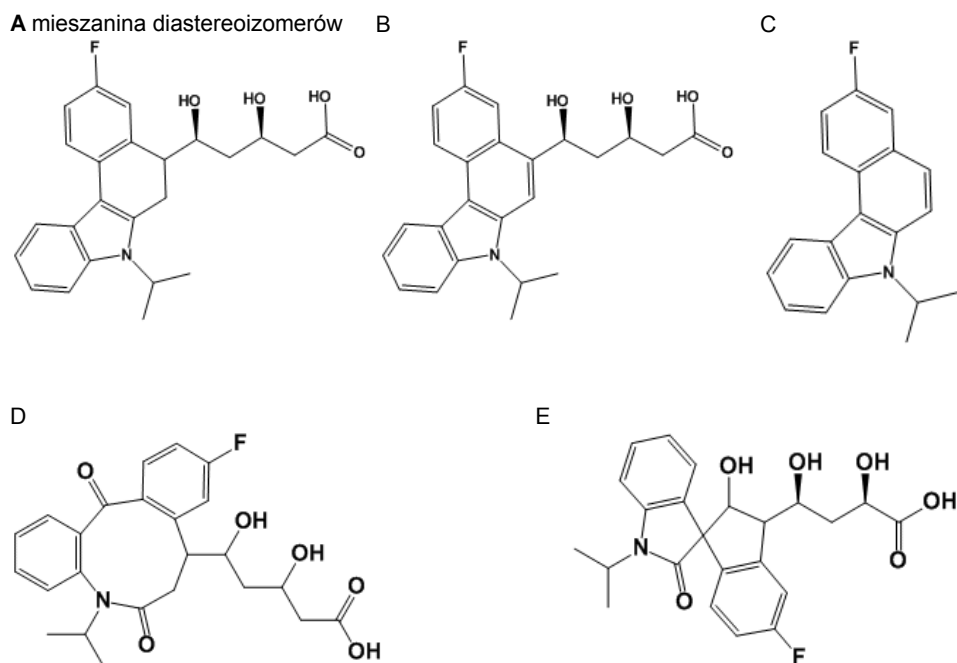


Rys. 24. Reaktywność głównego fotoproduktu C rosuwastatyny [8]

6.3. Właściwości fotochemiczne fluwastatyny

Fluwastatyna absorbuje promieniowanie z zakresu UVA (długość fali ok. 365 nm) [28, 29]. Ze względu na strukturę fluwastatyna może występować w postaci izomeru Z i E. Aktywną biologicznie formą jest trans-

fluwastatyna [28, 29]. Reakcja jej fotodegradacji zachodzi zgodnie z kinetyką pierwszego rzędu [30]. W zależności od warunków, w jakich prowadzone jest naświetlanie, powstają różne produkty. W atmosferze argonu jedynym otrzymanym związkiem jest fotoprodukt A. W atmosferze tlenu powstają związki oznaczone jako B–E (Rys. 25) [28].

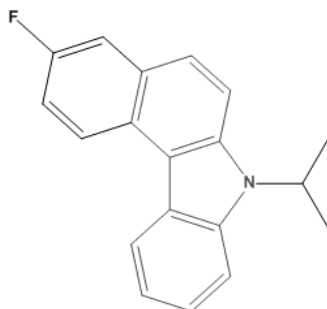


Rys. 25. Struktury fotoproduktów fluwastatyny [28]

Badania fototoksyczności fluwastatyny i fotoproduktu C prowadzono przy użyciu ludzkich keratynocytów NTC-2544 oraz fibroblastów 3T3. Badano żywotność tych komórek narażonych na działanie fluwastatyny i fotoproduktu C [27].

Otrzymane wyniki sugerują, że fototoksyczne działanie fluwastatyny, jak i fotoproduktu C związane jest z mechanizmem rodnikowym. Ogrzewanie keratynocytów w obecności fluwastatyny bez naświetlania, nie powodowało zmniejszenia żywotności komórek [27].

Fotoprodukt C wykazuje znaczny wzrost fototoksyczności przy stężeniu 10-krotnie mniejszym niż fluwastatyna. Właściwości te mogą być związane z budową związku C, który posiada ugrupowanie karbazylowe (benzokarbazole) i może działać jako silny fotosensybilizator (Rys. 26) [27].



Rys. 26. Struktura fotoproduktu C z ugrupowaniem karbazylowym [27]

7. Podsumowanie

Statyny to grupa związków zarówno pochodzenia naturalnego: mewastatyna i lowastatyna, półsyntetycznego: simwastatyna i prawastatyna, a także syntetycznego: fluwastatyna, atorwastatyna, ceriwastatyna [4, 5], rosuwastatyna [1, 3–5, 27] i pitawastatyna [15]. Na skutek podobieństwa strukturalnego do HMG-CoA działają one jako inhibitory reduktazy HMG-CoA. Stanowią skuteczne leki obniżające poziom cholesterolu we krwi [1, 3, 5]. Konsekwencją zróżnicowanej budowy statyn jest charakterystyczny dla każdej z nich sposób wiązania się z reduktazą HMG-CoA. Obecność różnych grup funkcyjnych w strukturze wpływa na zdolność statyn do hamowania działania tego enzymu [2, 6].

Mimo wielu zalet statyny wykazują także działania niepożądane. Należy do nich miopatia, objawiająca się bólem mięśni lub ich osłabieniem. Jej przyczyną jest zwiększenie stężenia kinazy kreatynowej w osoczu krwi. Miopatia występuje jednak tylko u 1 na 1000 pacjentów stosujących farmaceutyki zawierające statyny. Podwyższony poziom leku w surowicy krwi może powodować także gorączkę lub ogólne złe samopoczucie. Zaburzenie metabolizmu statyn może być związane z przyjmowaniem jednocześnie innych leków, które są inhibitorami cytochromu P450 3A4 (CYP3A4). Należą do nich np. azolowe leki przeciwgrzybiczne, inhibitory proteazy, cylosporyna czy erytromycyna. Do innych niepożądanych działań statyn należą zaburzenia czynności wątroby, niewydolność nerek czy niedoczynność tarczycy [11].

Statyny łatwo ulegają fotodegradacji pod wpływem promieniowania UV (głównie w zakresie UVA). Może to być związane z obecnością w ich strukturze pierścienia aromatycznego i wynikającą z tego zdolnością do ulegania 6π -elektrocyclizacji [7].

Fototoksyczność statyn związana jest z właściwościami ich fotoproduktów. Związki te ze względu na swoją strukturę mogą posiadać właściwości fotosensybilizujące, jak np. fotoprodukt fluwastatyny zawierający ugrupowanie karbazyłowe [27].

Literatura

- [1] Endo A. (2010) A historical perspective on the discovery of statins, *Proc. Jpn. Ser. B* 86, 484–493.
- [2] Istvan E. (2003) Statin inhibition of HMG-CoA reductase: a 3-dimensional view, *Atheroscler. Suppl.* 4, 3–8.
- [3] Endo A. (2004) The discovery and development of HMG-CoA reductase inhibitors, *Atheroscler. Suppl.* 5, 67–80.
- [4] Manzoni M., Rollini M. (2002) Biosynthesis and biotechnological production of statins by filamentous fungi and application of these cholesterol-lowering drugs, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58, 555–564.
- [5] Endo A. (2004) The origin of the statins, *International Congress Series* 1262, 3–8.
- [6] Istvan E., Deisenhofer J. (2001) Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase, *Science* 292, 1160–1164.
- [7] Grobelny P. (2008) *Trwałość fotochemiczna wybranych inhibitorów reduktazy HMG-CoA (statyn)*, rozpr. dokt., 6, 48–54, 115.
- [8] Astarita A., DellaGreca M., Iesce M.R., Montanaro S., Previtera L., Temussi F. (2007) Polycyclic compounds by sunlight exposure of the drug rosuvastatin in water, *J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry* 187, 263–268.
- [9] Cermola F., DellaGreca M., Iesce M.R., Montanaro S., Previtera L., Temussi F. (2006) Photochemical behavior of the drug atorvastatin in water, *Tetrahedron* 62, 7390–7395.
- [10] Litvić M., Šmic K., Vinković V., Filipan-Litvić M. (2013) A study of photodegradation of drug rosuvastatin calcium in solid state and solution under UV and visible light irradiation: The influence of certain dyes as efficient stabilizers, *J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry* 252, 84–92.
- [11] Maron D.J., Fazio S., Linton M.F. (2000) Current perspectives on statins, *Circulation* 101, 207–213.
- [12] Almuti K., Rimawi R., Spevack D., Ostfeld R.J. (2006) Effects of statins beyond lipid lowering: Potential for clinical benefits, *Intern. J. Cardiol.* 109, 7–15.
- [13] Wiśniewska K. (2014) *Kwantowochemiczne badanie swobody konformacyjnej rosuwastatyny i mechanizmu przemiany pomiędzy jej formą aktywną a nieaktywną w środowisku o różnym odczynie pH*, praca magist., 26, 60, 69, 79, 81–87, 91–93.
- [14] Paoletti R., Bolego C., Cignarella A. (2005) Lipid and non-lipid effects of statins, *Handbook Experim. Pharmacol.* 170, 365–388.
- [15] Qi X., Ding L., Wen A., Zhou N., Du X., Shakya S. (2013) Simple LC-MS/MS methods for simultaneous determination of pitavastatin and its lactone metabolite in human plasma and urine involving a procedure for inhibiting the conversion of pitavastatin lactone to pitavastatin in plasma and its application to a pharmacokinetic study, *J. Pharmac. Biomed. Anal.* 72, 8–15.

- [16] Kotyla P.J. (2014) Plejotropowe działanie inhibitorów 3-hydroksy-3-metyloglutarylo-koenzymu A (statyn). Potencjał leczniczy w układowych chorobach tkanki łącznej, *Ann. Acad. Med. Stetin* 60, 1, 39–46.
- [17] Bizukojć M., Ledakowicz S. (2005) Biosynteza lowastatyny przez *Aspergillus terreus*, *Biotechnologia. Monografie* 2 (2), 55–67.
- [18] Pawlak M., Bizukojć M. (2012) Intensyfikacja biosyntezy lowastatyny przy użyciu laktozy i glicerolu jako źródeł węgla w procesach okresowych oraz *discontinuous fed-batch* i *continuous fed-batch*, *Inż. Ap. Chem.* 51, 4, 164–166.
- [19] Bizukojć M., Ledakowicz S. (2009) Biosynteza metabolitów wtórnych przez *Asspergillus terreus*, *Inż. Asp. Chem.* 48, 3, 23–25.
- [20] Olsson A.G., McTaggart F., Raza A. (2002) Rosuvastatin: A Highly Effective New HMG-CoA Reductase Inhibitor, *Cardiovas. Drug Review*. 20, 303–328.
- [21] Utkov H.E., Price A.M., Cafiero M. (2011) MP2, density functional theory, and semi-empirical calculations of the interaction energies between a series of statin-drug-like molecules and the HMG-CoA reductase active site, *Computat. Theoret. Chem.* 967, 171–178.
- [22] Nardi G., Lihiaubet-Vallet V., Leonardo-Garcia P., Miranda M.A. (2011) Potential Phototoxicity of Rosuvastatin Mediated by Its Dihydrophenanthrene-like Photoproduct, *Chem. Res. Toxicol.* 24, 1779–1785.
- [23] Tønnesen H.H. (2004) Photostability Testing of Drugs and Drug Formulations, *CRC Press LLC*, 2.
- [24] Stryer L. (2003) *Biochemia*, Wyd. Nauk. PWN, Warszawa, 206–207.
- [25] Grobelny P., Viola G., Vedaldi D., Dall’Acqua F., Gliszczyńska-Świgło A., Mielcarek J. (2009) Photostability of piavastatin-A novel HMG-CoA reductase inhibitor, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 50, 597–601.
- [26] Kumar S.B. (2013) Phototoxicity of Drugs, *J. Pharm. Sci. Res.* 5(12), 275–276.
- [27] Viola G., Grobelny P., Linardi M.A., Salvador A., Basso G., Mielcarek J., Dall’Acqua S., Vedaldi D., Dall’Acqua F. (2010) The Phototoxicity of Fluvastatin, an HMG-CoA Reductase Inhibitor, its Mediated by the Formation of a Benzocarbazole-like Photoproduct, *Toxicol. Sci.* 118(1), 236–250.
- [28] Cermola F., DellaGreca M., Iesce M.R., Montanaro S., Previtiera L., Temussi F., Brigante M. (2007) Irradiation of fluvastatin in water structure elucidation of photoproducts, *J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry* 189, 264–271.
- [29] Mielcarek J., Kula M., Zych R., Grobelny P. (2005) Kinetic studies on fluvastatin photodegradation in solution, *React. Kinet. Catal. Lett.* 86, 119–126.
- [30] Mantanaro S., Lhiaubet-Vallet V., Iesce M.R., Previtiera L., Miranda M.A. (2009) A Mechanistic Study on the Phototoxicity of Atorvastatin: Singlet Oxygen Generation by a Phenanthrene-like Photoproduct, *Chem. Res. Toxicol.* 22, 173–178.

LEUKEMIOGENEZA ORAZ WSPÓŁCZESNE METODY TERAPII PRZECIWNOWOTWOROWYCH NA PRZYKŁADZIE OSTREJ BIAŁACZKI SZPIKOWEJ – AML

JAN LICA, MAJUS MISIAK, ANDRZEJ SKŁADANOWSKI*

Katedra Technologii Leków i Biochemii, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska
ul. Gabriela Narutowicza 11/12, 80-233 Gdańsk

* e-mail: askladan@pg.gda.pl

Hasła do zapamiętania: AML, leukemiopoeza, komórki pierwotne nowotworu, terapia przeciwnowotworowa

Wykaz skrótów:

- AML – ostra białaczka szpikowa (ang. *acute myeloid leukemia*)
- ALL – ostra białaczka limfoblastyczna
(ang. *acute lymphoblastic leukemia*)
- HSC – komórka macierzysta hematopoezy
(ang. *hematopoietic stem cell*)
- LT-HSC – komórka macierzysta hematopoezy długiego czasu podziału
(ang. *long term hematopoietic stem cell*)
- ST-HSC – komórka macierzysta hematopoezy krótkiego czasu podziału
(ang. *short term hematopoietic stem cell*)
- MPP – multipotentny progenitor (ang. *multi potent progenitor*)
- CMP – wspólny mieloidalny progenitor
(ang. *common myeloid progenitor*)
- MEP – progenitor linii rozwojowej megakariocytów i erytrocytów
(ang. *megakaryocyte-erythroid progenitor*)
- GMP – progenitor linii rozwojowej granulocytów i monocytów
(ang. *granulocyte-macrophage progenitor*)
- GDM1 – hodowla *in vitro* pierwotnego AML
- KG1 – hodowla *in vitro* pierwotnego AML
- HL-60 – hodowla *in vitro* dojrzałego AML

- NB-4 – hodowla *in vitro* dojrzałego AML
GM-CSF – cytokina wpływająca na krwiotworzenie (ang. *granulocyte macrophage colony stimulating factor*)

1. Leukemogeneza AML

Ostra białaczka szpikowa (AML – *acute myeloid leukemia*) jest najczęściej występującym typem białaczki u osób dorosłych. Jednocześnie AML jest jedną z najlepiej poznanych i opisanych chorób nowotworowych, zwłaszcza w kwestii mechanizmów molekularnych warunkujących jej powstawanie i progresję. Rozwój poszczególnych stadiów białaczki (leukemiopoeza), mimo znacznych zaburzeń w funkcjonowaniu komórek wskutek akumulacji mutacji, wykazuje wysoki stopień homologii do rozwoju zdrowych komórek krwi (hematopoezy). W trakcie leukemo- i hematopoezy komórki przejawiają typową dla określonego stadium morfologię, ulegają także zmianie specyficzne procesy metaboliczne [1–4]. Coraz rozleglejsza wiedza o procesach leukemio- i hematogenezy pozwala na udoskonalanie modeli, które opisują przyczyny oraz pozwalają na klasyfikację poszczególnych faz rozwoju choroby [5–9].

Uzupełniające się wzajemnie wyniki badań klinicznych oraz wyniki doświadczeń prowadzonych w warunkach *in vivo* z zastosowaniem modeli zwierzęcych (głównie myszy) oraz *in vitro* z udziałem modeli komórkowych pozwalają przypuszczać, iż AML rozwija się z komórki macierzystej odpowiedzialnej za proces hematopoezy o długim czasie podziału (LT-HSC – *long term hematopoietic stem cell*), która w wyniku mutacji nabywa cech patogennych. Przypuszcza się, że tych patogennych cech nabiera ona już na etapie wczesnej embriogenezy, przynajmniej w przypadku pojawiających się we wczesnych etapach życia człowieka tzw. form dziecięcych AML. W ten sposób patogenna komórka LT-HSC w procesie samoodnowy tworzy zmutowaną komórkę LT-HSC i pierwsze takie zaburzenia mogą wystąpić już w fazie wczesnej embriogenezy. Powstała zmutowana komórka LT-HSC jest zdolna do przekazywania mutacji nie tylko w dalszych cyklach samoodnowy (zwiększając frakcję zmutowanych komórek LT-HSC nawet do 99%), ale i dalszych podziałach LT-HSC prowadzących do powstania kolejnego stadium rozwojowego – ST-HSC (ST-HSC – *short term hematopoietic stem cell* – komórka macierzysta krótkiego podziału). Należy przy tym podkreślić, że liczba mutacji w komórkach tej linii może się stopniowo zwiększać. Gdy nagromadzenie mutacji w komórkach ST-HSC osiągnie poziom krytyczny (często wystarczy, że muta-

cje wystąpią w obrębie jednego, krytycznego genu, np. FLT3), prowadzi to do powstania oligopotentnego progenitora CMP (CMP – *common myeloid progenitor*) – kolejnego stadium rozwojowego tej choroby.

Komórki CMP, w tym również te zmutowane, nie mają zdolności do samoodnowy, ale są one zdolne do podziałów asymetrycznych. W wyniku tych podziałów powstają oligopotentne progenitory MEP i GMP (MEP – *megakaryocyte-erythroid progenitor*, GMP – *granulocyte-macrophage progenitor*) o zmniejszonym potencjale proliferacyjnym. Te z kolei, w wyniku następnego podziału asymetrycznego, dają w efekcie specyficzne liniowo prekursorzy – „blasty”. Komórki powstałe z podziału blasta różnicują się na drodze podziałów symetrycznych aż do stadium dojrzałego, w którym ustaje aktywność mitotyczna. W pełni dojrzała postać terminalna ulega rozpadowi w wyniku indukcji procesu śmierci apoptotycznej. Kolejne cykle poliploidyzacja–depoliploidyzacja blastów powodują bardzo szybki przyrost ilości zróżnicowanych komórek o zbliżonej budowie lecz o zmienionej funkcji, co zaburza homeostazę organizmu. Istotne znaczenie dla różnicowania się w kierunku określonej linii proliferacyjnej komórek wydają się mieć nie tylko wewnętrzne, ale i zewnętrzne czynniki, w tym niewątpliwie oddziaływania międzykomórkowe [10–12].

Mimo obserwowanej na powierzchni pierwotnych komórek AML ekspresji receptorów typowych dla pierwotnych komórek białaczki limfoblastycznej (ALL – *acute lymphoblastic leukemia*), morfologia komórek AML oraz ekspresja specyficznych enzymów nie jest zmieniona [13, 14]. Obserwowana u pacjentów z zaawansowanym AML infiltracja ośrodków namnażania limfocytów przez komórki AML (przy jednoczesnym stwierdzonym braku białaczki typu ALL) wynika prawdopodobnie z ekspresji specyficznych markerów błonowych typowych dla progenitorów ALL na powierzchni progenitorów AML. Komórki tworzące nowe kolonie posiadają ograniczoną zdolność proliferacji. Jednocześnie można u nich zaobserwować mechanizmy, jakich nie obserwuje się w komórkach od stadium CMP. Pozwala to przypuszczać, że we wczesnych etapach tworzenia nowych kolonii biorą udział komórki, u których te mechanizmy jeszcze nie zanikły: ST-HSC lub długo żyjącego progenitora MPP (MPP – *multi potent progenitor*).

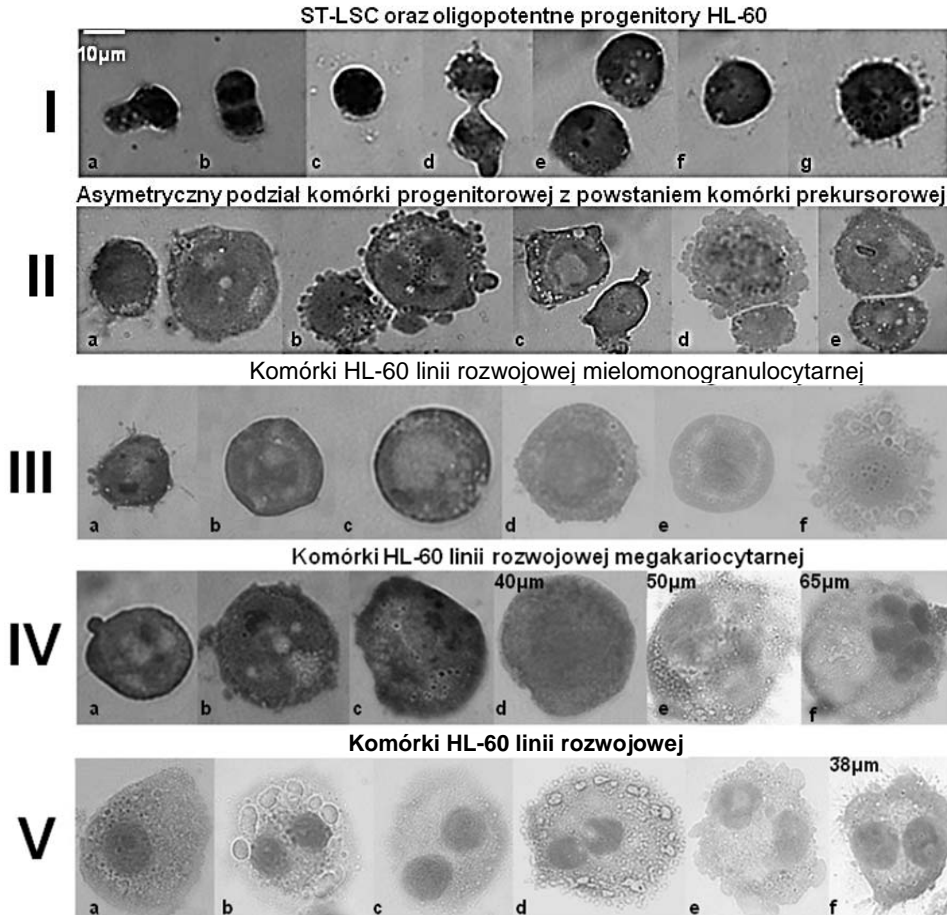
Zarówno u pacjentów, jak i w doświadczeniach na modelach zwierzęcych *in vivo* i komórkowych *in vitro*, w nowo tworzących się komórkach uwidoczniają się coraz większe różnice genetyczne względem komórek pierwotnych. Komórki powstające w procesie samoodnowy, kolejne pokolenia HSC AML (większa liczba mutacji jako wynik np. niestabilności genomu), wraz z czynnikami środowiskowymi (wynik działania zdarzeń losowych) tworzą coraz bardziej zróżnicowane komórki potomne (mikro-

ewolucja AML). W świetle prezentowanych danych, przebieg leukemio-poezy AML u pacjentów oraz w modelach *in vivo* i liniach *in vitro* (linie komórkowe GDM1, KG1, HL-60, NB-4) powinien być wysoce podobny. Różnice (brak komórki o cechach LT-HSC oraz komórek stadiów pośrednich prowadzących do powstania ST-HSC) pomiędzy procesami leukemio-poezy u pacjentów i w modelach *in vivo* a hodowlami komórkowymi mogą występować w przypadku bardziej dojrzałych komórek AML (HL-60, NB-4).

W hodowli komórek AML *in vitro* tego typu żywotność linii możliwa jest wskutek samoodnowy komórek ST-HSC obecnych stale w populacji. Gdyby za ciągłość hodowli dojrzałej AML *in vitro* odpowiadał wyłącznie oligopotentny progenitor AML, zgodnie z hematopoetycznym modelem starzenia się komórek AML linia utraciłaby zdolność wzrostu i proliferacji [15]. Do chwili obecnej brak jest doniesień literaturowych przedstawiających model leukemio-poezy dla bardziej dojrzałych komórek AML *in vitro* (HL-60, NB-4).

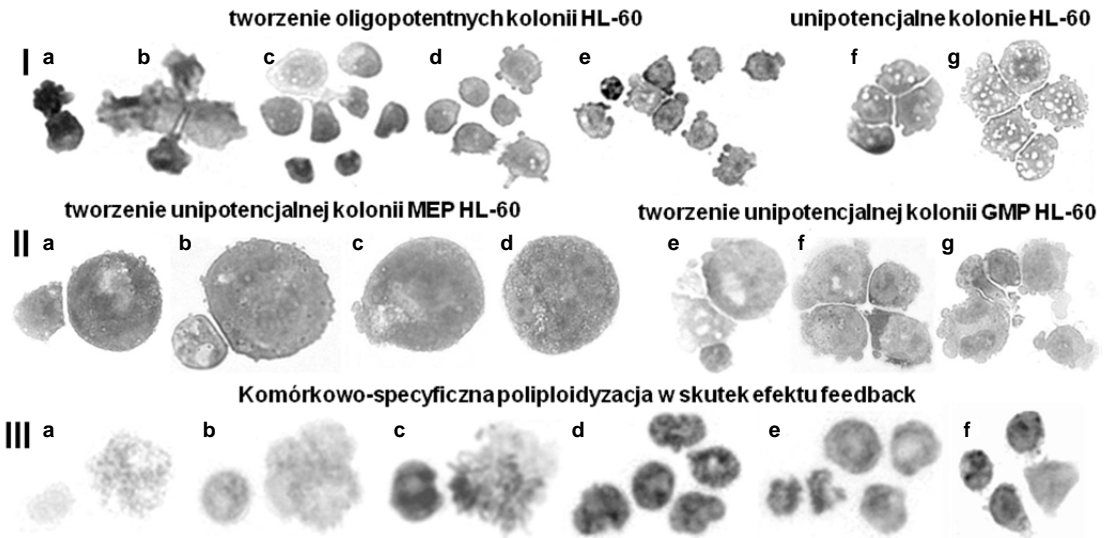
Zakładając brak LT-HSC w populacji komórek dojrzałych AML *in vitro* (i wynikające z ich proliferacji – epigenetyczne zmiany w ST-HSC), model leukemogenezy rozpoczynający się od samoodnowy ST-HSC powinien przebiegać identycznie. Godnym odnotowania jest fakt, że S.J. Collins, tuż po otrzymaniu hodowli komórek HL-60 zdolnych do ciągłej proliferacji, sugerował możliwą obecność w niej komórek macierzystych [16]. Późniejsze obserwacje wykazały istnienie zjawiska skracania czasu podwojenia hodowli HL-60 wraz ze wzrostem frakcji komórek bardziej dojrzałych; zahamowanie wzrostu komórek w hodowli wraz z pojawieniem się komórek w początkowych stadiach terminalnego zróżnicowania (metamielocyty, komórki bez zdolności mitotycznej). Ponadto zachowana jest zdolność do podlegania procesowi apoptozy komórek w stadium terminalnie dojrzałym. W dalszych badaniach nad HL-60 zaobserwowano komórki posiadające zdolność asymetrycznego podziału oraz potwierdzono obecność w hodowli frakcji komórek o zwiększonej ekspresji receptorów typowych dla komórek HSC. Wykazano również pełną oligopotentność linii, zależną od zastosowanego czynnika, w zakresie progenitora GMP oraz częściową – progenitora MEP (osteoklasty). Wskazywało na to uzyskiwanie różnych postaci terminalnie zróżnicowanych komórek, z częściowo zachowanymi specyficznymi cechami morfologicznymi, cytogenetycznymi i funkcjonalnymi każdej z sublinii [17–28]. Jedynie częściowo wykazaną oligopotentność progenitora MEP można tłumaczyć znikomą ilością komórek wywodzących się od MEP (np. stają się coraz mniejszą frakcją komórek w porównaniu z ilością komórek pochodzących od dominującego w hodowli prekursora GMP). Zakładana obecność w populacji komórek HL-60 proli-

ferujących komórek typu ST-HSC skutkowałyby powstawaniem komórek CMP, a zatem i pełną mielopotentnością linii. Ze względu na wysoką frakcję bardziej zróżnicowanych komórek, częstość występowania w populacji komórek pochodzących z MEP (komórki pierwotne AML) może być bardzo niska i stosunkowo trudna do wykrycia podczas analizy.

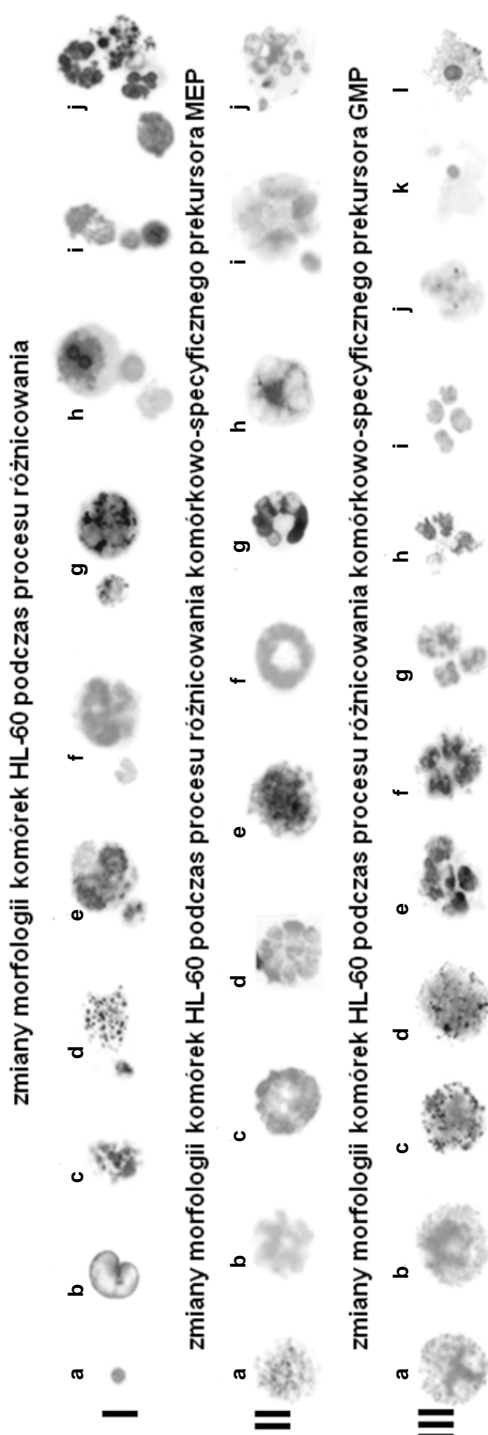


Rys. 1. Morfologia różnicujących się komórek linii HL-60. Rząd I: (a) komórka ST-HSC; (b) samoodnawiająca komórka typu ST-HSC; (c, d) podział asymetryczny komórki typu ST-HSC; (e–g) progenitory typu CMP, MEP. Rząd II: (a–e) podział asymetryczny progenitora przy jednoczesnej poliploidyzacji błasta powodowanej zjawiskiem *feedback*. Rząd III: (a–f) stadia komórkowe podczas różnicowania prekursora typu GMP. Rząd IV: (a–f) stadia komórkowe podczas różnicowania prekursora MEP linii megakariocytarnej. Rząd V: (a–f) komórki linii rozwojowej osteoklastów. Komórki HL-60 wybarwiono metodą May-Grunwald-Giemsy, oryginalne powiększenie 1000×

Wydaje się, że nie bez znaczenia dla procesu różnicowania się komórek AML jest sposób hodowli komórek linii AML. Na przykład w hodowli komórek GDM1 czy KG1 (zawierających stosunkowo mało zróżnicowane komórki AML), poprzez częste pasażę utrzymujące gęstość komórkową poniżej 0,5 mln komórek/ml, nie pozwala się na osiągnięcie krytycznego stężenia wydzielanych przez nie czynników (efekt *feedback*) powodujących ich dalsze różnicowanie. Ponadto dla podtrzymania wzrostu komórek, do hodowli dodaje się związek GM-CSF odpowiedzialny za samoodnowę komórek macierzystych. W hodowli komórek linii HL-60 i NB-4, które zawierają w większości komórki AML o wysokim stopniu zróżnicowania, pasażowanych przy gęstościach komórkowych 0,2–0,8 mln komórek/ml oraz bez suplementacji GM-CSF dominują heterogenne frakcje dojrzałych komórek. Z tych względów oba modele komórkowe AML (mniej i bardziej zróżnicowane) różniły się początkowym procentowym składem subpopulacji komórek macierzystych i blastycznych.

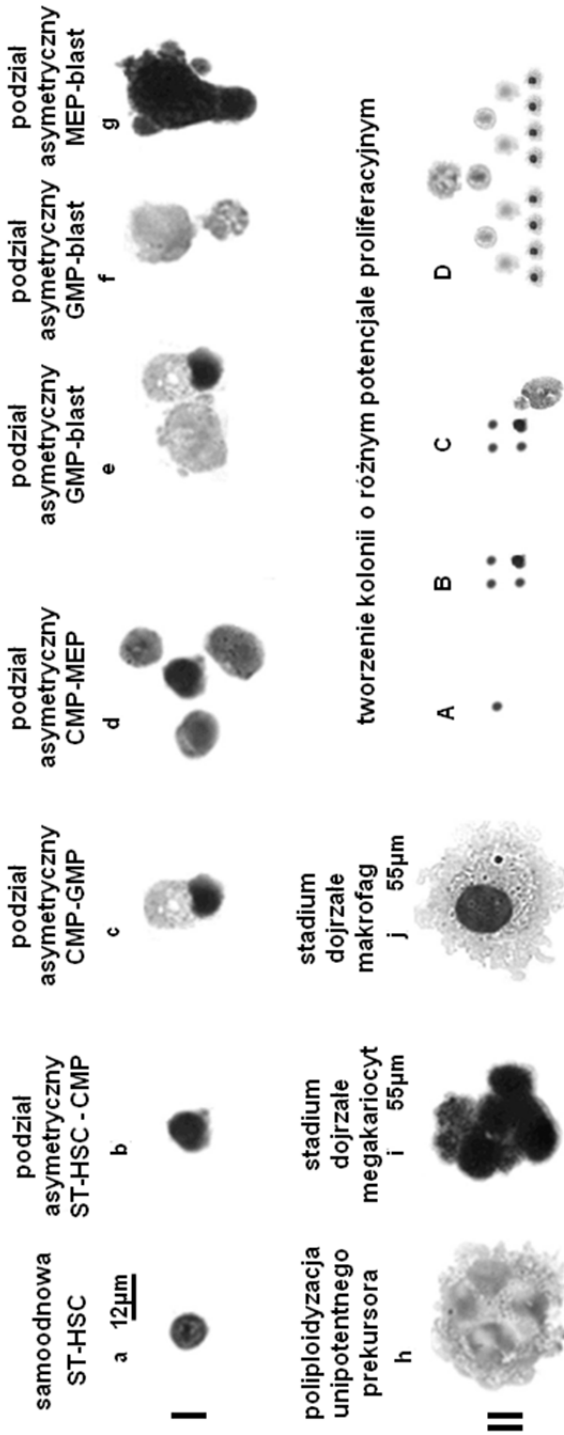


Rys. 2. Tworzenie kolonii oligopotentnych komórek HL-60. Rząd I: (a) samoodnawiająca się komórka HL-60 typu ST-HSC; (b) pierwszy podział asymetryczny komórek typu ST-HSC; (c–g) różne typy kolonii tworzone przez komórki typu ST-HSC i oligopotentne progenitory wywodzące się z tych komórek i zawierające komórkowo-specyficzne prekursor. Rząd II: (a–d) asymetryczny podział progenitora typu MEP i powstanie komórkowo-specyficznego prekursora megakarioblasta; (e–g) asymetryczny podział progenitora typu GMP, powstanie komórkowo-specyficznego prekursora oraz jego asymetryczna depolipoidyzacja. Rząd III: (a–f) proces depolipoidyzacji prekursorów uzależniony od wpływu progenitora (ang. *feedback effect*). Komórki barwiono przeżyciowo bądź po utrwaleniu w 70% etanolu za pomocą mieszaniny barwników (Hoechst 33342, May-Grunwald-Giemsa) i fotografowano w mikroskopie fluorescencyjnym, oświetlając preparat światłem białym i UV, oryginalne powiększenie 400×



Rys. 3. Zmiany morfologii komórek HL-60 w trakcie różnicowania się. Rząd I: (a) multi/oligo potentna komórka o mocno skondensowanej chromatynie (w fazie G1 cyklu komórkowego); (b, c) komórka progenitorowa w trakcie asymetrycznego podziału; (d–j) poliploidyzacja komórkowo-specyficznego prekursorów, uzależniona od czynników wydzielanych przez progenitora (and. *feedback effect*) – wysoka aktywność mitotyczna. Rząd II: (a–i) zmiana morfologii jąder komórek towarzyszące poliploidyzacji megakarioblasta od momentu mitoklonacji; f) dojrzały megakarioblast (średnica 64 μM). Rząd III: (a–k) zmiany morfologii jąder komórek towarzyszące poliploidyzacji blasta typu mielo-mono; obserwowana wysoka aktywność mitochondrialna komórek podczas dojrzewania i formowania się jąder komórek potomnych; koncentracja mitochondriów przed rozdziałem; l) makrofag (średnica 36 μM). Na zdjęciach przedstawione HL-60 barwione przeźycytowo za pomocą barwników: Hoechst 33342 + sulforodamina 101; Hoechst 33342 + Mitotracker Green; Hoechst 33342 + JCI; Hoechst 33342 + oranż akrydyny, oryginalne powiększenie 400 \times

Model leukemopoezy HL-60



Rys. 4. Model etapów leukemopoezy opartej na samoodnowie i proliferacji komórek ST-HSC w modelu HL-60. Rząd I: (a) komórka ST-HSC. Po osiągnięciu krytycznej liczby ST-HSC w formowanej kolonii zachodzi pierwszy podział asymetryczny; (b) CMP – komórka powstała z ST-HSC na skutek podziału asymetrycznego; (c) asymetryczny podział CMP, podczas którego powstaje bardziej ograniczony proliferacyjnie progenitor GMP; (d) centralnie ułożony CMP otoczony bardziej ograniczonymi proliferacyjnie progenitorami MEP; (e) dalsze różnicowanie kolonii w następstwie podziału asymetrycznego GMP i powstanie z jego podziału liniowo-specyficznego prekursora – blasta; (f) asymetryczny podział GMP; (g) asymetryczny podział MEP. Rząd II: (a) poliploidyzacja komórki w stadium blasta. Komórka ta dzieli się następnie na drodze specyficznego podziału asymetrycznego – depolipoidyzacji. W wyniku podziału powstają (poza megakarioblastem) 2–3 komórki (liczba zależy od sublinii) z zachowaną zdolnością podziału symetrycznego i dalszego różnicowania się. Wydaje się, że istotne znaczenie dla różnicowania w kierunku określonej linii proliferacyjnej komórek mają nie tylko wewnętrzne, ale

i zewnętrzne czynniki, w tym niewątpliwe oddziaływanie międzykomórkowe. Powstałe z takiego podziału 2–3 komórki posiadają różny potencjał proliferacyjny. Jedna komórka pozostaje w stadium zróżnicowania blasta (powtarzając proces depoliploidyzacji), pozostałe stają się komórkami bardziej dojrzałymi; (b) megakariocyt – przykład komórki terminalnego stadium szlaku rozwojowego MEP; (c) makrofaż – komórka terminalnego stadium szlaku rozwojowego GMP. (A–C) formowanie kolonii od najbardziej potencyjnej komórki ST-HSC. Powstałe z ST-HSC komórki CMP posiadają zdolność tworzenia kolonii (początkowo zaś uzależnione są od wydzielanych przez ST-HSC czynników). Częstsze i dalsze asymetryczne podziały progenitorów skutkują znacznym przyrostem kolonii o ograniczonym poziomie potencjalności; (d) schemat, na przykładzie prekursora granulocytarnego, obrazujący dalsze różnicowanie powstałych z depoliploidyzacji komórek (blast–promielocyt–mielocyt–metamielocyt). Komórki te ostatecznie utraciły zdolności proliferacyjne. Komórki odmiennych sublinii stadiów rozwojowych granulocyta również przechodzą specyficzne stadia rozwojowe. Komórki barwiono metodą May-Grunwald-Giemsa, oryginalne powiększenie 1000x

Tabela 1. Wybrane parametry morfologiczne i fizjologiczne komórek szlaku rozwojowego granulocytów hodowlanego AML *in vitro* HL-60. Wyboru markerów dokonano, opierając się na standardach klinicznych EURO-FLOW (*Leukemia* 2012, 26, 1986–2010), mając na uwadze zdolność komórki określenia stadium do jednoczesnej ekspresji na swojej powierzchni receptorów charakterystycznych dla różnych sublinii

Komórka	Średnica [µm]	Stosunek objętości jądro/cytoplazma, pH cytoplazmy	Morfologia jądra	Granularność	Tworzenie kolonii	Czas podziału	Właściwości podziałowe	Ekspresja specyficznych markerów błonowych
HSC STD	9–12	bardzo wysoki; bardzo zasadowa	cygaretozowate; mocno skondensowana niedojrzała chromatyna; brak jąderek	brak	wczesne kolonie	–	samoodnowa; asymetryczny podział	HLA-DR+, CD7+, CD66c-/-+, CD56-, CD13-
CMP	12–15	bardzo wysoki; bardzo zasadowa	owalne; mocno skondensowana niedojrzała chromatyna; brak jąderek	brak lub bardzo rzadkie	tak	10 dni	asymetryczny podział	HLA-DR+, CD7+, CD66c+, CD56-, CD13-/+
GMP	15–20	bardzo wysoki; bardzo zasadowa	owalne; mocno skondensowana niedojrzała chromatyna; brak jąderek	brak lub bardzo rzadkie	tak	5 dni	asymetryczny podział	HLA-DR+, CD7+, CD66c+, CD56-, CD13-/+
Blast	20–50	wysoki; bardzo zasadowa	początkowo owalne; niedojrzała chromatyna; 3 jąderka	brak lub rzadkie	brak	2 dni	asymetryczna depolipoidyzacja	HLA-DR-, CD7+, CD66c+, CD56-, CD13+
Promie-locyt	20–18	dość wysoki; zależne od postaci granulocyta	owalne; niedojrzała chromatyna; 1 jąderko	liczne pierwotne	brak	1 dzień	symetryczny z towarzyszącym różnicowaniem	HLA-DR-, CD7+, CD66c-, CD56-, CD13+
Mielocyt	19–17	średni; zależne od postaci granulocyta	owalne; dojrzała chromatyna; brak jąderek	rzadkie pierwotne; liczne wtórne zależne od postaci granulocyta	brak	1 dzień	symetryczny z towarzyszącym różnicowaniem	HLA-DR-, CD7-, CD66c-, CD56-, CD13+
Metamie-locyt	18–14	zniejszy; zależne od postaci granulocyta	nerkowate z wcięciem wielkości 1/4 średnicy; dojrzała chromatyna; brak jąderek	bardzo rzadkie pierwotne; coraz liczniejsze wtórne zależne od postaci granulocyta	brak	brak	brak	HLA-DR-, CD7-, CD66c-, CD56+, CD13-

Dobrze opisane specyficzne cechy morfologiczne, cytochemiczne oraz fenotypowe każdego ze stadiów leukemogenezy pozwalają na dość dokładne rozróżnienie poszczególnych populacji komórek AML. Na podstawie otrzymanych przez nas wyników doświadczeń (które zaprezentowano na Rys. 1–3 oraz w Tab. 1) opracowaliśmy model leukemopoezy dojrzalego AML (Rys. 4) pozwalający wnioskować, jak ciągłość hodowli tych komórek zależna jest od proliferacji komórek o cechach HSC.

2. Obecne podejścia terapeutyczne stosowane w leczeniu AML

Heterogenność populacji komórek AML i związane z nią różnice w poziomie ekspresji białek będących celami molekularnymi cytostatyków wymuszają stosowanie terapii wielolekowych. Realizowany protokół leczenia oparty jest na stanie zdrowia pacjenta, kariotypie komórek AML oraz zwłaszcza na powtarzających się mutacjach dotyczących genów *NPM1*, *FLT3*, *CEBPA*, *MLL* czy też *RAS* [29]. Szczegółowe poznanie mechanizmów molekularnych odpowiedzialnych za patogenezę AML nie znalazło dotychczas przełożenia na skuteczne terapie zmierzające do eliminacji wszystkich komórek związanych z tą chorobą. Stosowana obecnie chemioterapia oparta jest przede wszystkim na połączeniu analogów nukleozydów (antymetabolitów) z antracyklinami (inhibitorami topoisomerazy DNA typu II – Topo II α i Topo II β). Standardem w terapii indukcyjnej pozostaje, wprowadzona na początku lat 80., kombinacja arabinozydu cytozyny (ara-C) z daunorubicyną (D) (w kombinacji 3+7 D-ara-C: 3 dni daunorubicyna, 7 dni ara-C) [30]. Jako alternatywa dla daunorubicyny wykorzystywany jest inny antybiotyk antracyklinowy – idarubicyna. Cytostatyki z innych grup chemicznych – mitoksantron, etopozyd czy amsakryna – są używane zdecydowanie rzadziej [31] i w większości przypadków nie udało się wykazać ich przewagi nad standardową terapią [32]. Podobnie do terapii przeciwnowotworowej przeciw AML włączane są również antymetabolity inne niż ara-C. Stosowanie nowych analogów nukleozydów, takich jak fludarabina czy kłofarabina [33], pozwala tylko na niewielką poprawę skuteczności terapii. Wprowadzenie kladrybiny do standardowej terapii indukcyjnej zwiększyło całkowitą remisję i przeżywalność o 10% [34], jednak nie daje nadziei na długoterminowe opanowanie choroby.

Jak wspomniano wyżej, dobór terapii oparty jest o stan zdrowia pacjenta, kariotyp komórek AML, oraz mutacje dotyczące genów *NPM1*, *FLT3*, *CEBPA*, *MLL* czy też *RAS* [29]. Postęp w leczeniu opiera się zatem głównie na odpowiednim doborze dawki i kombinacji standardowych cy-

tostatyków przy jednoczesnym dążeniu do allogenicznego przeszczepu szpiku. Podejście to pozwala zwykle na początkowe osiągnięcie całkowitej remisji, jednak przeszczep szpiku nadal pozostaje konieczny, aby można było mówić o całkowitym wyleczeniu [35, 36]. W przypadku pacjentów, u których remisja choroby następuje po 6 miesiącach lub szybciej, wskazane są alternatywne podejścia terapeutyczne [35]. Można w nich zastosować inhibitory kinaz tyrozynowych czy telomerazy [37], jednak wykazują one niezadowalającą aktywność antynowotworową. Częsta aktywacja więcej niż jednego szlaku sygnalizacji wewnątrzkomórkowej w komórkach AML [38] i wzajemne powiązanie tych szlaków [39] dają niestety niewielkie nadzieje na osiągnięcie sukcesu terapeutycznego.

Odmienny pod względem mechanizmu działania lek (gemtuzumab ozogamycyny – GO), przeciwciało skierowane na białko CD33, którego ekspresja charakterystyczna jest dla linii mieloidalnej, połączone z silnie toksyczną pochodną kalicheamycyny – wycofany z użytku w 2010 r. [40, 41] – przywrócono jako produkt leczniczy na mocy rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady z 2013 r. [K(2013)1711]. Badania nad heterogennością AML i związanych z nią różnic w poziomie ekspresji białek błonowych poszerzyły wachlarz epitopów możliwych do użycia w celowanej chemioterapii AML o: CD44, D47, CD90, CD96, CD123. Zaproponowano zastosowanie aktywującego przeciwciała wobec receptora CD44 [42], którego ekspresja jest częstsza w AML niż w innych komórkach układu krwionośnego [43]. Związanie CD44 przeciwciałem osłabia wiązanie komórek z zajmowaną przez nie niszą i indukuje jednocześnie ich różnicowanie. Sygnalizacja na drodze CXCR4-SDF1 stanowi kluczowy punkt w regulacji proliferacji HSC [44, 45]. W modelu *in vivo* u myszy połączenie specyficznego inhibitora CXCR4 – AMD3100 – ze standardową chemioterapią zaowocowało uwolnieniem nieodróżnicowanych komórek ze szpiku i zwiększeniem skuteczności cytotoksycznej takiej terapii [46].

W innym podejściu, białka błonowe występujące na powierzchni komórek AML mogą znaleźć również zastosowanie, jako marker, w terapiach biologicznych z wykorzystaniem komórek linii limfoidalnej lub mieloidalnej. Podejście to miałyby na celu skierowanie odpowiedzi immunologicznej limfocytów cytotoksycznych T lub komórek NK specyficznie względem komórek AML. Dotychczas jednak wprowadzanie do krwi pacjenta modyfikowanych genetycznie limfocytów cytotoksycznych T nakierowanych na wybrany antygen wykazuje niewielki efekt terapeutyczny wobec białaczek. Lepszy efekt terapeutyczny można by uzyskać poprzez bardziej specyficzny mechanizm – fagocytozę. Z powodu ekspresji na powierzchni komórek pnia AML białka (hamując fagocytozę) CD47, wiążącego się z receptorem SIRPα występującym na powierzchni komórek żer-

nych, terapia ta jest udoskonalana. W tym świetle obiecujące wydaje się podejście zaproponowane przez Irvinga Weissmanna, aby stymulować fagocytozę przez przeciwciała blokujące CD47 lub SIRP α .

3. Wykorzystanie nowych podejść terapeutycznych

Terapie cytotoksyczne oparte na analogach nukleozydów oraz na antracyklinach wykazują znaczą skuteczność – głównie w eliminacji populacji częściowo różnicowanych komórek. W wielu przypadkach cytotoksyczna chemioterapia nie eliminuje nawet komórek bardziej zróżnicowanych, nie mówiąc już o komórkach prekursorowych AML.

W komórkach pierwotnych AML można zauważyć znaczne różnice w procesach metabolicznych oraz w ekspresji białek będących celami molekularnymi cytostatyków. Te różnice oraz wykazana eksperymentalnie oporność komórek pierwotnych AML, wynikająca z nadekspresji białek błonowych rodziny ABC i białek opiekuńczych HSP, czynią tę populację mniej wrażliwą na szereg cytostatyków. Eksperymentalne porównania wartości IC₅₀ dla linii pierwotnych i dojrzałych AML, wyznaczone na potrzeby CancerDR (*Cancer Drug Resistance Database* [47]), wykazują znaczne różnice między tymi liniami w podatności na cytostatyki. Wartość IC₅₀ cytostatyku, którego mechanizm cytotoksyczny powodujący uszkodzenia DNA (zaburzenia naprawy DNA, replikacji, mitozy), zaburzenia funkcji cytoskieletu (mikrotubule) oraz procesów metabolicznych opartych na białkach (Topo II α , DHFR) podlegających ekspresji w komórkach form bardziej dojrzałych, jest znacznie niższa dla AML dojrzałego. Wartość IC₅₀ cytostatyków o działaniu na białka podlegające ekspresji u form pierwotnych (Topo II β) jest jednakowa dla AML w komórkach pierwotnych i zróżnicowanych.

W efekcie stosowania standardowej chemioterapii obserwowana jest remisja choroby. Ma to związek ze śmiercią proliferujących i terminalnie zróżnicowanych komórek AML. Komórki macierzyste o długim czasie podziału pozostają jednak nienaruszone. Stają się one źródłem nawrotu choroby [48]. Szanse na znaczące poprawienie ogólnej przeżywalności pacjentów dają terapie, których celem będą komórki macierzyste HSC. W tym celu terapię należałoby skierować przeciwko mechanizmowi różniącemu te stadia. Najbardziej atrakcyjnym wydaje się mało poznany mechanizm samoodnowy. Proces samoodnowy jest wynikiem interakcji komórki HSC z mikrośrodowiskiem – komponentami komórkowymi tworzonych niszy. Jest on wspólny dla komórek pnia wszystkich linii zarodkowych [49].

Większa aktywność szlaków sygnalizacyjnych Wnt/ β -katenina, Notch, Hedgehog jest charakterystyczna dla wielu typów komórek macierzystych [50, 51]. Dla wielu białek stanowiących kluczowe pętle w tych szlakach zostały opracowane małowcząsteczkowe, selektywne inhibitory; aktywacja szlaku Notch hamuje samoodnowę HSC, co stwarza interesujące możliwości terapeutyczne [51–53]. Wyniki doświadczeń dotyczących kontroli szlaków odpowiadających za samoodnowę zachęcają do rozwijania tego kierunku (Tab. 2).

Tabela 2. Ważniejsze czynniki transkrypcyjne (TF) zaangażowane pośrednio bądź bezpośrednio w proces samoodnowy komórek LSC oraz ich znaczenie dla prognozy przebiegu klinicznego choroby

Gen	Opis i funkcja	Samo- odnowa	Prognoza	Litera- tura
β -katenina	Czynnik transkrypcyjny aktywowany przez kanoniczny szlak Wnt, indukuje ekspresję genów odpowiedzialnych za samoodnowę	promuje	zła	[10, 50, 55, 56]
Bmi1	Czynnik transkrypcyjny z grupy polycomb odpowiedzialny za samoodnowę w komórkach macierzystych nerwowych i hematopoetycznych	promuje	zła	[57, 58]
C/EBP α	CCAAT/enhancer binding protein α , forma białka CEBP występująca w komórkach linii mieloidalnej, niezbędna do różnicowania granulocytów i neutrofilii, regulowanie proliferacji. Mutacje inaktywujące w ~10% AML, promują samoodnowę, występują SNP, w tym transwersja 836T>G	hamuje	dobra w przypadku braku mutacji	[59–61]
FOXO	Regulacja wzrostu, zatrzymanie różnicowania	hamuje	brak danych (FOXO1), zła (inaktywacja FOXO3A)	[62–64]
MLL	Tworzy geny fuzyjne, m.in. MLL-AF9, MLL-ENL, stymuluje Myb, Hox9A, Meis1	promuje	zła	[65–67]
NF κ B	Odpowiedź komórkowa na stres, wolne rodniki, cytokiny i inne	promuje	brak danych	[68]
Sox4	SRY-related-HMG-box 4, TF zaangażowany w rozwój embrionalny i rozwój limfocytów B	promuje	brak danych dla AML, zła w innych nowotworach	[69]

4. Perspektywy

Przyszłością terapii w AML (ale także innych obserwowanych u pacjentów zespołów mielodysplastycznych/proliferacyjnych), których przyczyną są komórki HSC, wydaje się etapowa, celowana terapia mieszana. Znając przypuszczalną przyczynę tej choroby, czyli komórki LT-HSC i jed-

nocześnie niemożność jej jednoznacznego rozpoznania pod względem genetycznym, morfologicznym, cytogenetycznym, fenotypowym w komórkach zróżnicowanych, wydaje się, że celem terapii powinny stać się komórki macierzyste hematopojezy.

Kombinacja terapii standardowej (eliminującej zróżnicowane komórki AML) z celowaną terapią biologiczną oraz selektywnymi małowzrostkowymi modulatorami samoodnowy (skierowanymi na komórki macierzyste AML) powinna wykazywać wysoką skuteczność kliniczną. W ten sposób konwencjonalny cytostatyk zmniejszałby masę nowotworu poprzez eliminację i różnicowanie bardziej dojrzałych komórek AML do terminalnych stadiów pochodzących z progenitora GMP. Terminalnie zróżnicowane komórki AML, z zachowaną zdolnością do fagocytozy, mogłyby zostać wykorzystane w celu bezpośredniej eliminacji HSC. Skierowanie odpowiedzi komórkowej neutrofilii przeciwko HSC można by uzyskać poprzez zastosowanie sprzężonego z przeciwciałem – typowym dla komórek macierzystych (HLA-DR lub innym) – uczulaczem (stymulator fagocytozy) nieinicjującym stanu zapalnego. Małowzrostkowy inhibitor samoodnowy służyłby do eliminacji populacji resztkowej/szczątkowej LT-HSC.

Literatura

- [1] Jan M., Snyder T.M., Corces-Zimmerman M.R., Vyas P., Weissman I.L., Quake S.R., Majeti R. (2012) Clonal evolution of preleukemic hematopoietic stem cells precedes human acute myeloid leukemia, *Sci. Transl. Med.* 4, 149.
- [2] Gal H., Amariglio N., Trakhtenbrot L., Margalit O., Avigdor A., Nagler A., Tavor S., Lapidot T. (2006) Gene expression profiles of AML derived stem cells; similarity to hematopoietic stem cells, *Leukemia* 20, 2147–2154.
- [3] Shlush L.I., Zandi S., Mitchell A., Chen W.C., Brandwein J.M., Gupta V., Kennedy J.A., Schimmer A.D., Schuh A.C., Yee K.W., McLeod J.L., Doedens M., Medeiros J.J.F., Marke R., Kim H.J., Lee K., McPherson J.D., Hudson T.D., Brown A.M.K., Trinh Q.M., et al. (2014) Identification of pre-leukaemic haematopoietic stem cells in acute leukaemia, *Nature* 506, 328–333.
- [4] Weissman I.L. (2015) Evolution of normal and neoplastic tissue stem cells: progress after Robert Hooke, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B., Biol. Sci.* 370, 1–10.
- [5] Bonnet D., Dick J.E. (1997) Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell, *Nat. Med.* 3, 730–737.
- [6] Hope K.J., Jin L., Dick J.E. (2004) Acute myeloid leukemia originates from a hierarchy of leukemic stem cell classes that differ in self-renewal capacity, *Nat. Immunol.* 5, 738–743.
- [7] Vardiman J.W., Thiele J., et al. (2009) The 2008 revision of the WHO classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes, *Blood* 114, 937–952.

- [8] Walter M.J., Shen D., Ding L., Shao J., Koboldt D.C., Chen K., Larson D.E., McLellan M.D., Dooling D., Abbott R., Fulton R., Magrini V., Schmidt H., Kalicki-Veizer J., O’Laughlin M., Fan X., Grilott M., Witowski S., Heath S., Frater J.L., et al. (2012) Clonal architecture of secondary acute myeloid leukemia, *N. Engl. J. Med.* 366, 1090–1098.
- [9] Notta F., Zandi S., Takayama N., Dobson S., Gan O.I., Wilson G., Kaufmann K.B., Mcleod J., Laurenti E., Dunant C.F., Mcpherson J.D., Stein L.D., Dror Y., Dick J.E. (2015) Distinct routes of lineage development reshape the human blood hierarchy across ontogeny, *Science* (w druku).
- [10] Kim J.A., Shim S.J., Lee G.Y., Yim H.W., Kim T.M., Kim M., Leem S.H., Lee J.W., Min C.K., Oh I.H. (2015) Microenvironmental remodeling as a parameter and prognostic factor of heterogeneous leukemogenesis in acute myeloid leukemia, *Cancer Res.* 75, 2222–2231.
- [11] Tabe Y., Konopleva M. (2015) Role of Microenvironment in Resistance to Therapy in AML, *Curr. Hematol. Malig. Rep.* 10, 96–103.
- [12] Ghiaur G., Wroblewski M., Loges S. (2015) AML and its microenvironment: a molecular conversation, *Semin. Hematol.* 52, 200–206.
- [13] Klobušická M., Kusenda J., Babušíková O. (2005) Myeloid enzymes profile related to the immunophenotypic characteristics of blast cells from patients with acute myeloid leukemia (AML) at diagnosis, *Neoplasma* 52, 211–218.
- [14] Ratei R., Karawajew L., Schabath R., Ehrfeldt A., Grunert F., Ludwig W.D. (2008) Differential expression of the carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules panCD66, CD66a, CD66c and of sialyl-Lewis x (CD15s) on blast cells of acute leukemias, *Int. J. Hematol.* 87, 137–143.
- [15] Marciniak-Czochra A., Stiehl T., Wagner W. (2009) Modeling of replicative senescence in hematopoietic development, *Aging (Albany, NY)* 1, 723–732.
- [16] Collins S.J., Gallo R.C., Gallagher R.E. (1977) Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture, *Nature* 270, 347–349.
- [17] Gallagher R., Collins S.J., Trujillo J., McCreddie K., Ahearn M., Tsai S., Metzgar R., Aulakh G., Ting R., Ruscetti F., Gallo R.C. (1979) Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia, *Blood* 54, 713–733.
- [18] Boss M.A., Delia D., Robinson J.B., Greaves M.F. (1980) Differentiation-linked expression of cell surface markers on HL-60 leukemic cells, *Blood* 56, 910–916.
- [19] Birnie G.D. (1988) The HL60 cell line: a model system for studying human myeloid cell differentiation, *Br. J. Cancer. Suppl.* 9, 41–45.
- [20] Collins S.J. (1987) The HL-60 promyelocytic leukemia cell line: proliferation, differentiation and cellular oncogene expression, *Blood* 70, 1233–1244.
- [21] Schwartz E.L., Maher A.M. (1988) Enhanced mitogenic responsiveness to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in HL-60 promyelocytic leukemia cells upon induction of differentiation, *Cancer Res.* 48, 2683–2687.
- [22] Yoneda T., Alsina M.M., Garcia J.L., Mundy G.R. (2015) Differentiation of HL-60 cells into cells with the osteoclast phenotype, *Endocrinology* 129, 683–689.
- [23] Matsuhisa T. (1995) Asymmetric cell division in human leukemic promyelocytic cells (HL-60), *Cell Biol. Int.* 19, 785–789.
- [24] Trayner I.D., Bustorff T., Etches A.E., Mufti G.J., Foss Y., Farzaneh F. (1998) Changes in antigen expression on differentiating HL60 cells treated with dimethylsulphoxide, all-trans retinoic acid, 1,25-dihydroxyvitamin D3 or 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate, *Leuk. Res.* 22, 537–547.

- [25] Geary S.M., Ashman L.K. (1996) HL-60 myeloid leukaemia cells acquire immunostimulatory capability upon treatment with retinoic acid: analysis of the responding population and mechanism of cytotoxic lymphocyte activation, *Immuno.* 88, 428–440.
- [26] Olins A.L., Olins D.E. (2004) Cytoskeletal influences on nuclear shape in granulocytic HL-60 cells, *BMC Cell Biol.* 5, 30.
- [27] White S.L., Belov L., Barber N., Hodgkin P.D., Christopherson R.I. (2005) Immunophenotypic changes induced on human HL60 leukaemia cells by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 and 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate, *Leuk. Res.* 29, 1141–1151.
- [28] Barber N., Belov L., Christopherson R.I. (2008) All-trans retinoic acid induces different immunophenotypic changes on human HL60 and NB4 myeloid leukaemias, *Leuk. Res.* 32, 315–322.
- [29] Schlenk R.F., Döhner K., Krauter J., Fröhling S., Corbacioglu A., Bullinger L., Habdank M., Späth D., Morgan M., Benner A., Schlegelberger B., Heil G., Ganser A., Döhner H. (2008) Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia, *N. Engl. J. Med.* 358, 1909–1918.
- [30] Yates J., Gliwell O., Wiernik P., Cooper M.R., Steinberg D., Dosik H.R., Hoagland L.C., Patrick H., Gottlieb A. (1982) Cytosine arabinoside with daunorubicin or adriamycin for therapy of acute myelocytic leukemia: A CALGB Study, *Blood* 60, 454–462.
- [31] Tallman M.S., Gilliland D.G., Rowe J.M. (2005) Drug therapy for acute myeloid leukemia, *Blood* 106, 1154–1163.
- [32] Anderson J.E., Kopecky K.J., Willman C.L., Head D., O'Donnell M.R., Luthardt F.W., Norwood T.H., Chen I.M., Balcerzak S.P., Johnson D.B., Appelbaum F.R. (2002) Outcome after induction chemotherapy for older patients with acute myeloid leukemia is not improved with mitoxantrone and etoposide compared to cytarabine and daunorubicin: A Southwest Oncology Group study, *Blood* 100, 3869–3876.
- [33] Kantarjian H.M., Erba H.P., Claxton D., Arellano M., Lyons R.M., Kovascovics T., Gabrilove J., Craig M., Douer D., Maris M., Petersdorf S., Shami P.J., Yeager A.M., Eckert S., Abichandani R., Faderl S. (2010) Phase II study of clofarabine monotherapy in previously untreated older adults with acute myeloid leukemia and unfavorable prognostic factors, *J. Clin. Oncol.* 28, 549–555.
- [34] Holowiecki J., Grosicki S., Giebel S., Robak T., Kyrzcz-Krzemien S., Kuliczowski K., Skotnicki A.B., Hellmann A., Sulek K., Dmoszynska A., Kloczko J., Jedrzejczak W.W., Zdziarska B., Warzocha K., Zawilska K., Komarnicki M., Kielbinski M., Piatkowska-Jakubas B., Wierzbowska A., Wach M., Haus O. (2012) Cladribine, but not fludarabine, added to daunorubicin and cytarabine during induction prolongs survival of patients with acute myeloid leukemia: A multicenter, randomized phase III study, *J. Clin. Oncol.* 30, 2441–2448.
- [35] Szer J. (2012) The prevalent predicament of relapsed acute myeloid leukemia, *Am. Soc. Hematol. Educ. Pro.* 2012, 43–48.
- [36] Shimoni A., Nagler A. (2005) Allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation in patients with acute myeloid leukemia in first complete remission: new answers for an old question, *Leukemia* 19, 891–893.
- [37] Bruedigam C., Bagger F.O., Heidel F.H., Paine Kuhn C., Guignes S., Song A., Austin R., Vu T., Lee E., Riyat S., Moore A.S., Lock R.B., Bullinger L., Hill G.R., Armstrong S.A., Williams D.A., Lane S.W. (2014) Telomerase inhibition effectively targets mouse and human AML stem cells and delays relapse following chemotherapy, *Cell Stem Cell* 15, 775–790.

- [38] Kornblau S.M., Womble M., Qiu Y.H., Jackson C.E., Chen W., Konopleva M., Estey E.H., Andreeff M. (2006) Simultaneous activation of multiple signal transduction pathways confers poor prognosis in acute myelogenous leukemia, *Blood* 108, 2358–2365.
- [39] Steelman L.S., Abrams S.L., Whelan J., Bertrand F.E., Ludwig D.E., Bäsecke J., Libra M., Stivala F., Milella M., Tafuri A., Lunghi P., Bonati A., Martelli A.M., McCubrey J.A. (2008) Contributions of the Raf/MEK/ERK, PI3K/PTEN/Akt/mTOR and Jak/STAT pathways to leukemia, *Leukemia* 22, 686–707.
- [40] Bross P.F., Beitz J., Chen G., Chen X.H., Duffy E., Kieffer L., Roy S., Sridhara R., Rahman A., Williams G., Pazdur R. (2001) Approval summary: gemtuzumab ozogamicin in relapsed acute myeloid leukemia, *Clin. Cancer Res.* 7, 1490–1496.
- [41] Sievers E.L., Appelbaum F.R., Spielberger R.T., Forman S.J., Flowers D., Smith F.O., Shannon-Dorey K., Berger M.S., Bernstein I.D. (1999) Selective ablation of acute myeloid leukemia using antibody-targeted chemotherapy: a phase I study of an anti-CD33 calicheamicin immunoconjugate, *Blood* 93, 3678–3684.
- [42] Jin L., Hope K.J., Zhai Q., Smadja-Joffe F., Dick J.E. (2006) Targeting of CD44 eradicates human acute myeloid leukemic stem cells, *Nat. Med.* 12, 1167–1174.
- [43] Bendall L.J., Bradstock K.F., Gottlieb D.J. (2000) Expression of CD44 variant exons in acute myeloid leukemia is more common and more complex than that observed in normal blood, bone marrow or CD34+ cells, *Leukemia* 14, 1239–1246.
- [44] Liles W.C., Broxmeyer H.E., Rodger E., Wood B., Hu K., Cooper S., Hangoc G., Bridger G.J., Henson G.W., Calandra G., Dale D.C. (2003) Brief report Mobilization of hematopoietic progenitor cells in healthy volunteers by AMD3100, a CXCR4 antagonist, *Blood* 102, 2728–2730.
- [45] Aiuti A., Webb I.J., Bleul C., Springer T., Gutierrez-Ramos J.C. (1997) The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD34+ hematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of CD34+ progenitors to peripheral blood, *J. Exp. Med.* 185, 111–120.
- [46] Nervi B., Ramirez P., Rettig M.P., Uy G.L., Holt M.S., Ritchey J.K., Prior J.L., Piwnicka-Worms D., Bridger G., Ley T.J., DiPersio F.J. (2009) Chemosensitization of acute myeloid leukemia (AML) following mobilization by the CXCR4 antagonist AMD3100, *Blood* 113, 6206–6214.
- [47] Kumar R., Chaudhary K., Gupta S., Singh H., Kumar S., Gautam A., Kapoor P., Raghava G.P. (2013) Cancer DR: cancer drug resistance database, *Sci. Rep.* 3, 1445.
- [48] Ishikawa F., Yoshida S., Saito Y., Hijikata A., Kitamura H., Tanaka S., Nakamura R., Tanaka T., Tomiyama H., Saito N., Fukata M., Miyamoto T., Lyons B., Ohshima K., Uchida N., Taniguchi S., Ohara O., Akashi K., Harada M., Shultz L.D. (2007) Chemotherapy-resistant human AML stem cells home to and engraft within the bone-marrow endosteal region, *Nat. Biotechnol.* 25, 1315–1321.
- [49] Takebe N., Harris P.J., Warren R.Q., Ivy S.P. (2011) Targeting cancer stem cells by inhibiting Wnt, Notch, and Hedgehog pathways, *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 8, 97–106.
- [50] Attar E.C., Scadden D.T. (2004) Regulation of hematopoietic stem cell growth, *Leukemia* 18, 1760–1768.
- [51] Clevers H. (2011) The cancer stem cell: premises, promises and challenges, *Nat. Med.* 17, 313–319.
- [52] Lobry C., Ntziachristos P., Ndiaye-Lobry D., Oh P., Cimmino L., Zhu N., Araldi E., Hu W., Freund J., Abdel-Wahab O., Ibrahim S., Skokos D., Armstrong A.A., Levine R.L., Park C.Y., Aifantis I. (2013) Notch pathway activation targets AML-initiating cell homeostasis and differentiation, *J. Exp. Med.* 210, 301–319.

- [53] Kannan S., Sutphin R.M., Hall M.G., Golfman L.S., Fang W., Nolo R.M., Akers L.J., Hammitt R.A., McMurray S.J., Kornblau S.M., Melnick A.M., Figueroa M.E., Zweidler-McKay P.A. (2013) Notch activation inhibits AML growth and survival: a potential therapeutic approach, *J. Exp. Med.* 210, 321–337.
- [54] Fiskus W., Sharma S., Saha S., Shah B., Devaraj S.G.T., Sun B., Horrigan S., Leveque C., Zu Y., Iyer S., Bhalla K.N. (2014) Pre-clinical efficacy of combined therapy with novel β -catenin antagonist BC2059 and histone deacetylase inhibitor against AML cells, *Leukemia* 29, 1267–1278.
- [55] Wang Y., Krivtsov A.V., Sinha A.U., North T.E., Goessling W., Feng Z., Zon L.I., Armstrong S.A. (2010) The Wnt/ β -catenin pathway is required for the development of leukemia stem cells in AML, *Science* 327, 1650–1653.
- [56] Ysebaert L., Chicanne G., Demur C., De Toni F., Prade-Houdellier N., Ruidavets J.B., Mansat-De Mas V., Rigal-Huguet F., Laurent G., Payrastre B., Manenti S., Racaud-Sultan C. (2006) Expression of β -catenin by acute myeloid leukemia cells predicts enhanced clonogenic capacities and poor prognosis, *Leukemia* 20, 1211–1216.
- [57] Lessard J., Sauvageau G. (2003) Bmi-1 determines the proliferative capacity of normal and leukaemic stem cells, *Nature* 423, 255–260.
- [58] Chowdhury M., Mihara K., Yasunaga S., Ohtaki M., Takihara Y., Kimura A. (2007) Expression of Polycomb-group (PcG) protein BMI-1 predicts prognosis in patients with acute myeloid leukemia, *Leukemia* 21, 1116–1122.
- [59] Preudhomme C., Sagot C., Boissel N., Cayuela J., Tigaud I., Botton D., Thomas X., Raffoux E., Lamandin C., Castaigne S., Fenaux P. (2002) Favorable prognostic significance of CEBPA mutations in patients with *de novo* acute myeloid leukemia: a study from the *Acute Leukemia French Association (ALFA)*, *Blood* 100, 2717–2723.
- [60] Zhang P., Iwasaki-Arai J., Iwasaki H., Fenyus M.L., Dayaram T., Owens B.M., Shigematsu H., Levantini E., Huettner C.S., Lekstrom-Himes J.A., Akashi K., Tenen D.G., (2004) Enhancement of hematopoietic stem cell repopulating capacity and self-renewal in the absence of the transcription factor C/EBP, *Immunity* 21, 853–863.
- [61] Gombart A.F., Hofmann W.K., Kawano S., Takeuchi S., Krug U., Kwok S.H., Larsen R.J., Asou H., Miller C.W., Hoelzer D., Koefler H.P. (2002) Mutations in the gene encoding the transcription factor CCAAT/enhancer binding protein alpha in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemias, *Blood* 99, 1332–1340.
- [62] Kornblau S.M., Singh N., Qiu Y., Chen W., Zhang N., Coombes K.R. (2010) Highly phosphorylated FOXO3A is an adverse prognostic factor in acute myeloid leukemia, *Clin. Cancer Res.* 16, 1865–1874.
- [63] Dennis M.K., Field A.S., Burai R., Ramesh C., Whitney K., Bologna C.G., Oprea T.I., Yamaguchi Y., Hayashi S., Sklar L.A., Hathaway H.J., Arterburn J.B., Prossnitz E.R. (2011) AKT/FOXO signaling enforces reversible differentiation blockade in myeloid leukemias, *Cell* 146, 358–366.
- [64] Orford K.W., Scadden D.T. (2008) Deconstructing stem cell self-renewal: genetic insights into cell-cycle regulation, *Nat. Rev. Genet.* 9, 115–128.
- [65] Krivtsov A.V., Twomey D., Feng Z., Stubbs M.C., Wang Y., Faber J., Levine J.E., Wang J., Hahn W.C., Gilliland D.G., Golub T.R., Armstrong S.A. (2006) Transformation from committed progenitor to leukaemia stem cell initiated by MLL-AF9, *Nature* 442, 818–822.
- [66] Zuber J., Rappaport A.R., Luo W., Wang E., Chen C., Vaseva A.V., Shi J., Weissmueller S., Fellman C., Taylor M.J., Weissenboeck M., Graeber T.G., Kogan S.C., Vakoc C.R., Lowe S.W. (2011) An integrated approach to dissecting oncogene addic-

- tion implicates a Myb-coordinated self-renewal program as essential for leukemia maintenance, *Genes Dev.* 25, 1628–1640.
- [67] Grimwade D., Hills R.K., Moorman A.V., Walker H., Chatters S., Goldstone A.H., Wheatley K., Harrison C.J., Burnett A.K. (2010) Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukaemia: Determination of prognostic significance of rarer recurring chromosomal abnormalities amongst 5,876 younger adult patients treated in the UK Medical Research Council trials, *Blood* 116, 354–365.
- [68] Guzman M.L., Neering S.J., Upchurch D., Grimes B., Howard D.S., Rizzieri A.A., Luger S.M., Jordan C.T. (2001) Nuclear factor-kappaB is constitutively activated in primitive human acute myelogenous leukemia cells, *Blood* 98, 2301–2307.
- [69] Zhang H., Alberich-Jorda M., Amabile G., Yang H., Staber P.B., DiRuscio A., Welner R.S., Ebralidze A., Zhang J., Levantini E., Lefebvre V., Valk P.J.M., Delwel R., Hoogenkamp M., Nerlov C., Cammenga J., Saez B., Scadden D.T., Bonifer C., Ye M., et al. (2013) Sox4 is a key oncogenic target in C/EBP α mutant acute myeloid leukemia, *Cancer Cell* 24, 575–588.

NOWOCZESNE METODY ZWALCZANIA BIOFILMU BAKTERYJNEGO JAMY USTNEJ

MAGDALENA WIELGOSIŃSKA, EWELINA ZIELIŃSKA,
KAROLINA NISKA, MAGDALENA GÓRSKA, MICHAŁ WOŹNIAK

Katedra i Zakład Chemii Medycznej, Gdański Uniwersytet Medyczny
ul. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk
e-mail: magdalena.wielgosinska@gmail.com

Hasła do zapamiętania: biofilm, płytka nazębna, bakterie

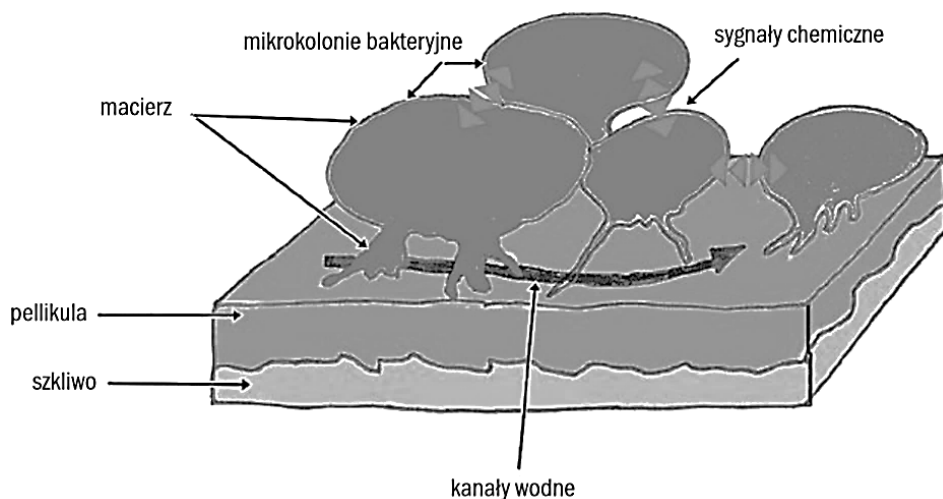
Wykaz skrótów:

EPC – polimery białkowo-cukrowe
(ang. *egg phosphatidilethanolamine*)
acyl-HSL – acetylowane laktony homoseryny

1. Biofilm bakteryjny

Bakterie w ludzkim organizmie występują w formie planktonu, czyli jako zbiór luźno rozproszonych komórek. Ponadto mogą one występować w formie biofilmu, czyli przestrzennej, złożonej struktury komórkowej, otoczonej produkowaną przez siebie macierzą [24]. Macierz ta zbudowana jest głównie z polimerów białkowo-cukrowych (EPC). Chroni ona bakterie przed wnikaniem chemioterapeutyków do wnętrza komórki oraz przed atakiem ze strony układu odpornościowego gospodarza [16, 19].

Dojrzały biofilm składa się z komórek bakteryjnych (5–25%) oraz substancji pozakomórkowej (75–95%) [9, 16]. Mikrokolonie bakteryjne, tworzące biofilm, połączone są ze sobą siecią otwartych kanałów wodnych, przez które dostarczane są do bakterii substancje odżywcze i usuwane zbędne produkty przemiany materii (Rys. 1).



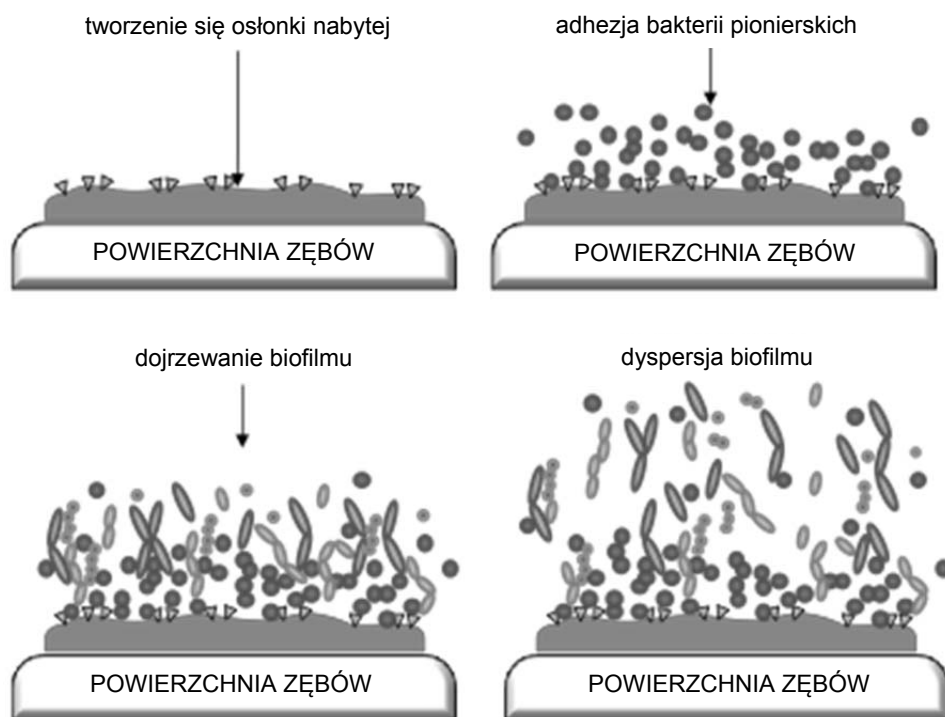
Rys. 1. Schemat budowy biofilmu bakteryjnego tworzącego płytkę nazębną [4]

Szacuje się, że około 95% mikroorganizmów jest zdolnych do tworzenia biofilmów [36]. Poza bakteriami, są to również grzyby, drożdże i pierwotniaki. Formowanie biofilmu zachodzi w środowisku wilgotnym. Jest to naturalna cecha wszystkich bakterii wchodzących w skład mikroflory błon śluzowych i skóry. Również bakterie chorobotwórcze, które wnikają do organizmu w formie planktonicznej, po początkowym etapie adhezji do komórek gospodarza kolonizują tkankę, w następstwie czego tworzą biofilm [16, 19].

Najczęstszymi bakteriami wchodzącymi w skład biofilmu jamy ustnej są bakterie typu *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Spirochaetes*, *Fusobakteria* (do nich należy 96% gatunków bakterii) oraz *Euryaracheota*, *Chlamydia*, *Chloroflexi*, SR1, *Synergistetes*, *Tenericutes* i TM7 (pozostałe 4% gatunków bakterii) [39]. Klasycznym przykładem biofilmu bakteryjnego jest płytka nazębna [4, 20].

2. Etapy formowania biofilmu w jamie ustnej

Do powstawania biofilmu w jamie ustnej niezbędne są produkty gospodarza, takie jak np. obumarłe komórki nabłonka czy zawarte w ślinie glikoproteiny i immunoglobuliny [4]. Tworzą one na powierzchni tkanki cienką warstwę zwaną osłonką nabytą (Rys. 2).



Rys. 2. Tworzenie się biofilmu jamy ustnej [44]

Osłonka nabyta powstaje już w ciągu kilku minut od wyszczotkowania zębów. Mechanizm jej tworzenia sprowadza się do fizykochemicznych oddziaływań pomiędzy składnikami śliny a powierzchnią zębów. Ze względu na siły tych oddziaływań można je podzielić na następujące trzy typy:

- długiego zasięgu (50–100 nm) – występujące pomiędzy dwoma oddziałującymi komponentami; należą do nich siły Kulomba, oddziaływanie van der Waalsa i oddziaływanie dipol–dipol;
- średniego zasięgu (10–50 nm), do których należą oddziaływania hydrofobowe;
- krótkiego zasięgu (mniej niż 5 nm), do których należą wiązania kowalencyjne, wiązania jonowe, oddziaływania elektrostatyczne, wiązania wodorowe, wiązania jonowe oraz oddziaływania kwas–zasada Lewisa [3].

Powstanie osłonki nabytej z białek gospodarza i obumarłych komórek jest pierwszym etapem formowania biofilmu. Osłonka ta z jednej strony stanowi ochronę zęba przed czynnikami powodującymi erozję szkliwa,

z drugiej zaś – posiada receptory umożliwiające przyłączanie bakterii, przez co zapoczątkowuje kolejny etap powstawania biofilmu, zwany adhezją bakterii pionierskich [24]. Drobnoustroje zaczynają przylegać do powierzchni osłonki. Jest to możliwe na skutek działania sił elektrostatycznych, hydrofobowych i van der Waalsa [19]. Ten etap jest jeszcze procesem odwracalnym. W momencie gdy bakterie pionierskie (*Streptococcus mutans*) zaczął wydzielać składniki macierzy (polimery białkowo-cukrowe) do otoczenia, proces staje się już nieodwracalny. Dochodzi wtedy do ścisłej adhezji mikroorganizmów zarówno do osłonki nabytej, jak i do samych siebie. W skutecznym przyleganiu dużą rolę odgrywają zarówno specjalne wyrostki bakteryjne – fimbrie – jak i oddziaływania fizykochemiczne (wiązania wodorowe, siły van der Waalsa, oddziaływania elektrostatyczne) [12, 16]. W procesie początkowej adhezji udział biorą bakterie zwane wczesnymi kolonizatorami. Należą do nich bakterie z rodzajów *Eikenella*, *Actinomyces*, *Streptococcus*, *Neiseria*, *Haemophilus*, *Prevotella*, *Capnocytophaga*, *Propionibacterium* i *Veillonella* [2, 6, 8, 29, 39].

Bakterie z rodzajów *Eubacterium*, *Treponema* oraz *Actinomyces actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis* i *Fusobacterium*, tworzące kolonie w drugiej kolejności [39], rozpoznają na powierzchni bakterii pionierskich odpowiednie polisacharydy lub białka receptorowe i przyłączają się do nich, tworząc koagregaty. Warto zwrócić uwagę na brak losowości w łączeniu się bakterii. Każda komórka zdolna jest do rozpoznawania specyficznych receptorów białkowych. W związku z tym trzeba zauważyć, że struktura płytki nazębnej jest wysoce zorganizowana. Tylko specyficzne gatunki bakterii mogą współtworzyć bioilm. Są to m.in. *Streptococcus mutans* czy *Streptococcus nucleatum* [16].

W czasie wzrostu i dojrzewania biofilmu skład bakterii wciąż ulega zmianie: zmniejsza się liczba bakterii należących do rodzajów *Streptococcus* i *Neiseria*, a rośnie tych z rodzajów *Actinomyces*, *Fusobacterium*, *Veillonella* i *Corynebacterium* [29].

Ostatnim etapem tworzenia biofilmu jest jego rozpad (dyspersja, rozproszenie). Z powodu ciągłego przepływu śliny, która ma właściwości erozyjne, od płytki nazębnej nieustannie odłączają się bakterie. Mają one również zdolność aktywnego, czyli samodzielnego, odłączania się w poszukiwaniu źródeł składników odżywczych lub innych miejsc kolonizacji [16].

Bakterie wewnątrz biofilmu oddziałują między sobą, tworząc tym samym wysoce zorganizowaną strukturę. Mogą one oddziaływać na siebie zarówno w sposób synergistyczny (np. komunikacja metaboliczna), jak i współzawodniczyć ze sobą, np. o składniki pokarmowe lub miejsce przy-

łączenia się. Na podstawie badań odkryto różne mechanizmy współzawodnictwa bakterii (takie jak np. wydzielanie nadtlenu wodoru czy synteza bakteriocyn) oraz ich „porozumiewania się”. Jednym z takich mechanizmów chemicznej komunikacji bakterii jest tzw. quorum sensing (co tłumaczy się jako „zmysł gęstościowy”, „rozpoznanie liczebności” lub „zmysł tłoku”) [9]. Poprzez ten mechanizm bakterie regulują procesy metaboliczne w zależności od gęstości populacji komórek w danym miejscu. Oznacza to, że zanim bakterie wytworzą np. polisacharydową otoczkę biofilmu, „oceniają” liczbę spokrewnionych bakterii w danym miejscu [36]. Bakterie jednego lub różnych gatunków komunikują się ze sobą poprzez wytwarzanie i wydzielanie do otoczenia autoinduktorów (molekuł sygnałowych). System komunikacji bakterii Gram-dodatnich różni się nieco od systemu bakterii Gram-ujemnych. Bakterie Gram-dodatnie porozumiewają się poprzez molekuły białkowe, a przekazywanie sygnału polega na kaskadzie reakcji fosforylacji i defosforylacji. Bakterie Gram-ujemne kontaktują się poprzez wytwarzanie niskocząsteczkowych acetylowanych laktonów homoseryny (acyl-HSL) [3]. Wydzielane substancje wpływają na procesy metaboliczne komórek znajdujących się w pobliżu. Gdy zgromadzi się określona liczba komórek, rośnie również stężenie cząsteczek sygnałowych. Przekracza ono w końcu wartość progową i wpływa tym samym na ekspresję określonych genów [36]. Ze względu na konieczność zachowania małych odległości pomiędzy bakteriami ten system komunikacji nie występuje u bakterii w formie planktonu [3].

3. Wpływ biofilmu na zęby, tkanki miękkie w jamie ustnej oraz sprzęt stomatologiczny

Mikroflorę jamy ustnej stanowi ponad 700 gatunków bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych. Kolonizują one zęby, język, błonę śluzową, podniebienie twarde, kieszonki dziąsłowe itp. [24, 25, 35]. Bytowanie bakterii nie jest przypadkowe – określone mikroorganizmy preferują konkretne miejsca w jamie ustnej w zależności od ich zasobności w składniki odżywcze czy tlen. Należy pamiętać, że wpływ bakterii na ludzki organizm nie zawsze jest negatywny. Zdecydowana bowiem część mikroflory jest korzystna lub wręcz niezbędna dla naszego zdrowia. Również płytka nazębna, z jednej strony, jest częścią obrony naszego organizmu – zapobiega bowiem kolonizacji egzogennych mikroorganizmów, często patogennych. Dla zachowania zdrowia jamy ustnej konieczne jest zachowanie jej fizjologicznego stanu, a do tego niezbędny jest

prawidłowy przepływ śliny oraz odpowiednia higiena jamy ustnej. Gdy zabraknie któregoś z tych punktów, z łatwością dochodzi do powstania nieprawidłowego biofilmu, a płytka nazębna, kumulując się w nadmiarze, utrudnia swobodny przepływ śliny i jej działanie buforujące i przeciwbakteryjne [19]. Nadmiar biofilmu o nieprawidłowym składzie lub zachwianie równowagi między bakteriami staje się czynnikiem etiologicznym m.in. próchnicy zębów (zwiększona ilość bakterii z gatunku *Streptococcus mutans*) oraz zapalenia przyzębia (bakterie z gatunku *Porphyromonas gingivalis*) lub zapalenia dziąseł [14, 21, 24, 35]. Jednak najbardziej powszechnym skutkiem działania biofilmów jest demineralizacja szkliwa oraz powstawanie w jej wyniku plam próchnicowych (tzw. białe plamy). Niestety, zjawisko to jest bardzo częste – potwierdzono je klinicznie u 49% pacjentów z aparatem ortodontycznym i u 11% bez aparatu [11, 24].

Biofilm jest jednym z głównych czynników opóźniających gojenie ran oraz powodujących ostre zakażenie rany przewlekłej [17, 30]. Obecność biofilmów zaburza procesy immunologiczne, ziarninowanie i naskórkowanie rany [31].

Odkryto, że biofilmy, poza tkankami organizmu, tworzą się również na powierzchni tworzyw sztucznych, ceramiki i metali, czyli na powierzchni materiałów, z których w stomatologii tworzone są protezy, implanty, aparaty ortodontyczne czy chociażby sprzęt medyczny [36]. W procesie przylegania bakterii do powierzchni innych niż tkanki organizmu istotne znaczenie ma budowa biomateriału. Chropowatość powierzchni znacznie ułatwia adhezję bakterii. Szczególnie korzystne warunki do kolonizacji mikroorganizmów istnieją na materiałach wykonanych z polichlorku winylu i na lateksie pokrytym silikonem [36]. Bakterie pokrywają materiały obce tuż po ich wprowadzeniu do jamy ustnej. Z tego względu podczas zabiegów stomatologicznych występujące w biofilmach drobnoustroje natychmiast osadzają się na powierzchni wyrobów medycznych. Obecność biofilmu na powierzchni narzędzi i sprzętów stomatologicznych znacznie utrudnia proces sterylizacji. Istotne jest stosowanie preparatów rozpuszczających biofilm do dezynfekcji ślinociągów, spluwaczek i innych wyrobów medycznych, które mają kontakt z jamą ustną pacjenta [26].

4. Oporność biofilmu na antybiotyki

Bakterie tworzące biofilm wykazują dużą oporność na większość antybiotyków, dlatego antybiotykoterapii nie stosuje się jako zasadniczego leczenia. Substancje przeciwbakteryjne mogą być wprawdzie stosowa-

ne przy mechanicznym usuwaniu płytki nazębnej, aby uniknąć skutków bakteriemii, ale jest to forma leczenia tylko wspomagającego [4]. Stosowanie antybiotyków jako zasadniczej terapii leczenia biofilmu jamy ustnej jest bezzasadne z kilku powodów. Wykazano bowiem doświadczalnie, że do zlikwidowania bakterii tworzących biofilm konieczne jest stężenie substancji przeciwbakteryjnej kilkuset-, a nawet tysiąckrotnie wyższe niż to, które niszczy wolno żyjące bakterie [23, 33]. Przyczyną niewrażliwości bakterii w biofilmach na działanie antybiotyków jest ich osłonka, zbudowana z polimerów białkowo-cukrowych. Utrudnia ona bowiem dyfuzję substancji przeciwbakteryjnych w głąb biofilmu [4]. Zmniejsza ona także efektywność działania komórek obronnych organizmu [36].

Dla działania antybiotyków nie bez znaczenia są też warunki życiowe panujące wewnątrz biofilmu. Zasadniczo różnią się one od warunków panujących na zewnątrz, szczególnie jeśli chodzi o zawartość tlenu: wewnątrz biofilmu znajduje się go zdecydowanie mniej, czasami panują tam nawet warunki beztlenowe. Z tego względu część komórek przechodzi w stan anabiozy, przez co ich metabolizm i podziały ulegają spowolnieniu. Część substancji przeciwbakteryjnych działa wyłącznie na komórki aktywne metabolicznie i dzielące się, co utrudnia usuwanie biofilmu [18, 33]. Mimo zdecydowanych przesłanek mówiących o braku zasadności stosowania antybiotyków w zwalczaniu biofilmu w jamie ustnej, są one używane. Jednocześnie działają tylko objawowo, zmniejszając objawy zakażenia wskutek zadziałania na bakterie w formie planktonu oraz te, które znajdują się na skraju biofilmu – po zaprzestaniu leczenia zwykle dochodzi do nawrotów i nasilenia objawów, ponieważ drobnoustroje, które przetrwały antybiotykoterapię, wykorzystują martwe komórki jako źródło składników odżywczych. Wskutek tego biofilm potrafi odtworzyć się do początkowych rozmiarów już w ciągu kilku godzin [4, 7, 23].

Rosnąca antybiotykooporność powoduje konieczność szukania nowych narzędzi do walki z infekcjami bakteryjnymi.

5. Nowoczesne metody przeciwdziałania powstawaniu biofilmu

Szacuje się, że aż 65% wszystkich zakażeń stanowią zakażenia przebiegające z powstawaniem biofilmu bakteryjnego lub grzybiczego [4]. Jako że biofilm bakteryjny wykazuje wysoką oporność na większość obecnie dostępnych środków przeciwdrobnoustrojowych oraz wybitnie zwiększoną tolerancję na antybiotykoterapię, konieczne jest poszukiwa-

nie nowoczesnych metod jego leczenia. W dostępnej literaturze można natknąć się na kilka innowacyjnych metod walki z biofilmem jamy ustnej, bez konieczności sięgania po antybiotykoterapię. Metody te zostały opisane poniżej.

5.1. Terapia z zastosowaniem nanocząsteczek metali

Jednym z nowoczesnych sposobów zwalczania biofilmu jest stosowanie nanocząsteczek niektórych metali, m.in. srebra, złota i ditlenku tytanu. Ich używanie w medycynie jest coraz bardziej powszechne ze względu na wyjątkowe właściwości, pozwalające np. modyfikować strukturę, kształt, wielkość i rozproszenie cząstek [15]. Przez tę modyfikację możliwe jest uzyskanie cząstek o zwiększonej powierzchni aktywnej, co ma wpływ na zwiększenie reaktywności oraz właściwości biobójczych [15]. Nanocząsteczki już dziś są z powodzeniem używane w medycynie, np. do bezpośredniego dostarczania leków. Na skutek małych rozmiarów nanocząsteczki sprawnie i z łatwością penetrują błony biologiczne i inne bariery ustrojowe, przez co umożliwiają dotarcie potencjalnego leku do trudno dostępnych struktur [31]. Zaobserwowano również, że nanocząsteczki niektórych metali mają właściwości przeciwdrobnoustrojowe. Właściwości przeciwbakteryjne w obecności promieniowania UV posiadają np. nanocząsteczki ditlenku tytanu (TiO_2NPs) [38]. Ich działanie przeciwbakteryjne polega na destabilizacji błony komórkowej, co uszkadza komórkę bakteryjną, a w konsekwencji powoduje jej śmierć. Ze względu na konieczność obecności światła w działaniu przeciwbakteryjnym nanocząsteczek ditlenku tytanu, stosowanie ich jest mniej skuteczne niż na przykład nanocząsteczek złota. Te również wykazują właściwości przeciwbakteryjne [28], jednak nie potrzebują do tego działania promieniowania UV.

Silne właściwości zarówno bakteriobójcze, jak i grzybobójcze i zapalne wykazują nanocząsteczki srebra [40]. Mechanizm tego działania ciągle jest na etapie badań, jednak przypuszcza się, że nanocząsteczki srebra przyłączają się do osłon komórkowych (ściany i błony komórkowej) i tym samym zakłócają ich podstawowe funkcje. Poprzez zaburzenie selektywnej przepuszczalności błony komórkowej zakłócony zostaje transport protonów przez błonę komórkową i produkcja ATP. Dochodzi do kumulowania we wnętrzu komórki produktów przemiany materii, inhibicji syntezy ściany komórkowej i w konsekwencji – do śmierci komórki [15, 27]. Co więcej, nanocząsteczki srebra reagują z grupami tiolowymi ($-\text{SH}$),

zmieniając konformację białek lub dezaktywując je, przez co bakterie tracą możliwość ich syntezy [15]. Działanie srebra na komórki bakterii jest wielokierunkowe i ostatecznie prowadzi do ich śmierci. Na podstawie wieloletnich badań i obserwacji stwierdza się, że nanocząsteczki z pewnością mogą znaleźć zastosowanie w zwalczaniu biofilmu bakteryjnego. Zanim jednak nanocząsteczki metali będą użyte w codziennym leczeniu, konieczne są dalsze badania w tej dziedzinie [27].

5.2. Terapia bakteriofagami

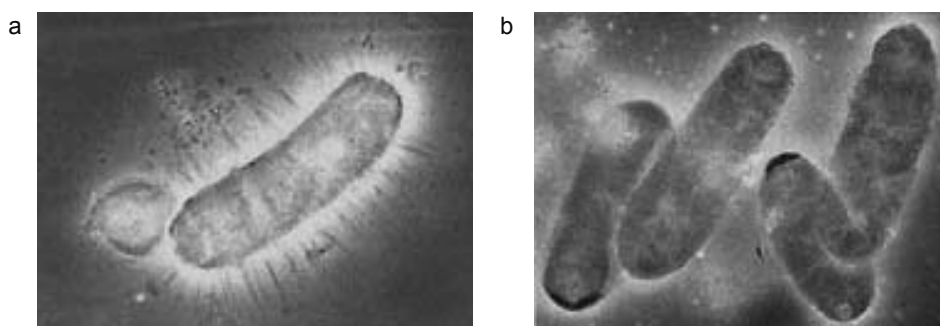
Kolejną z innowacyjnych metod zwalczania biofilmu jest terapia bakteriofagami. Bakteriofagi to wirusy infekujące bakterie. W zwalczaniu biofilmu zastosowanie znajdują jedynie fagi, które przeprowadzają cykl lityczny – w przeciwieństwie do cyklu lizogenicznego prowadzi on do zniszczenia komórki bakterii [1]. Smith i Huggins w swoim badaniu udowodnili, że fagi mają zdolność rozprzestrzeniania się na cały biofilm, z czego wynika, że do zwalczania biofilmu wystarczyć mogą nawet pojedyncze dawki bakteriofagów [34]. Co istotne, niektóre z fagów wytwarzają depolimerazy – enzymy, które zdolne są do niszczenia substancji polimerycznych tworzących macierz biofilmu [13, 34]. Obecnie prowadzi się badania mające na celu otrzymanie rekombinowanej depolimerazy egzopolisacharydu (EPS), kodowanej przez fagi, która jest zdolna do degradacji biofilmu bakteryjnego [42]. Otrzymanie takiego enzymu umożliwiłoby chemioterapeutom docieranie do wnętrza biofilmów, przez co antybiotykoterapia wreszcie stanie się skuteczna w ich zwalczaniu.

5.3. Pokrywanie biomateriałów politetrafluoroetylenem

Długotrwałe leczenie ortodontyczne sprzyja powstawaniu biofilmu bakteryjnego w jamie ustnej. Aparat ortodontyczny zarówno utrudnia utrzymanie odpowiedniej higieny jamy ustnej (utrudnione szczotkowanie zębów oraz przepływ śliny), jak i umożliwia bakteriom tworzenie biofilmu na nowej powierzchni, jaką są biomateriały stosowane w leczeniu ortodontycznym. Obecnie w ortodoncji możliwe jest pokrycie zamków i drutów aparatów ortodontycznych substancjami zmniejszającymi adhezję bakterii [24, 32]. Demling i wsp. udowodnili, że znaczne zahamowanie tworzenia się biofilmu uzyskuje się wskutek pokrycia aparatu ortodontycznego politetrafluoroetylenem [5, 24].

5.4. Taurolidyna i jej pochodne

Taurolidyna, syntetyczna pochodna tauryny, jest lekiem o właściwościach przeciwadherentnych, antyproliferacyjnych oraz przeciwzapalnych i przeciwbakteryjnych [24]. Jej działanie bakteriobójcze polega na hamowaniu wiązania lipopolisacharydu i uszkodzeniu ściany komórkowej bakterii, dlatego może być stosowana w leczeniu zakażeń bakteryjnych związanych z powstawaniem biofilmu. Nie bez znaczenia dla jej działania na biofilm bakteryjny są jej właściwości przeciwadherentne. Polegają one na niszczeniu wici i fimbrii komórek bakteryjnych, przez co zdolność tworzenia kolonii staje się ograniczona (Rys. 3a i b)



Rys. 3. a – *E. coli* przed zastosowaniem taurolidyny, b – *E. coli* 4 minuty po zastosowaniu roztworu taurolidyny, widoczna utrata wici i fimbrii [45]

W ostatnich latach trwają eksperymenty badawcze nad pochodnymi tauryny i taurolidyny. Pasich i wsp. przeprowadzili badania nad holoaminami tauryny – chloroaminą tauryny (TauCl) i bromoaminą tauryny (TauBr) [24]. W ich wyniku stwierdzono, że TauBr wykazuje silniejsze działanie bakteriobójcze i przeciw pasożytnicze niż TauCl i – podawana razem z DN-azą – może z powodzeniem zwalczać biofilm jamy ustnej [24]. Wywnioskowano tym samym, że holoaminy tauryny mogą znaleźć zastosowanie w stomatologii zachowawczej i ortodoncji.

5.5. Mucyny zawarte w śluzie

Jednym z najnowszych sposobów walki z biofilmem bakteryjnym mogą okazać się mucyny, czyli białka zawarte w śluzie. Przeprowadzono eksperyment na bakterii z gatunku *Pseudomonas aeruginosa*, który

polegał na hodowaniu ich w medium z dodatkiem mucyn [43]. Zaobserwowano, że bakterie tak hodowane nie są w stanie utworzyć skupisk, które są niezbędne do powstania formy biofilmu. Bakterie w kleistym medium poruszały się pojedynczo, utraciły swoją zjadliwość i stały się niegroźne. Wynik eksperymentu daje nadzieję na wykorzystanie w przyszłości śluzu lub samych mucyn do kontroli nad biofilmami bakteryjnymi, np. poprzez powlekanie nimi sprzętów medycznych.

6. Zwalczanie biofilmu i profilaktyka jego powstawania

Jako że większość metod zwalczania biofilmu pozostaje wciąż na etapie eksperymentalnym, najlepszą metodą walki z biofilmem jest niedopuszczenie do skolonizowania zagrożonej powierzchni poprzez zachowanie odpowiedniej higieny jamy ustnej [36]. Mechaniczne usuwanie bakterii z zębów i otaczających tkanek zapewnia usunięcie większości biofilmu, który zdążył nagromadzić się od czasu poprzedniego szczotkowania. Potwierdzono klinicznie, że skuteczność domowych zabiegów higienicznych zwiększa połączenie triklosanu, kopolimeru eteru poliwinylometylowego i kwasu maleinowego (PVM/MA) oraz fluorku, które znajdują się w pastach do zębów. Triklosan to związek przeciwbakteryjny o szerokim spektrum działania, którego aktywne stężenie utrzymuje się do 12 godzin [22, 41].

W codziennej higienie jamy ustnej należy także pamiętać o używaniu specjalnych produktów do czyszczenia przestrzeni międzyzębowych oraz o stosowaniu płynów do płukania ust o działaniu przeciwbakteryjnym. W wielu z nich znajduje się chlorheksydyna – jedna z najbardziej popularnych substancji o działaniu bakteriobójczym i bakteriostatycznym. Ze względu na jej niepożądane działania, takie jak przebarwienia tkanek miękkich i metaliczny smak w ustach, nie powinno się długotrwale stosować jej w codziennej higienie jamy ustnej [10, 24].

Codziennie zabiegi higieniczne w obrębie jamy ustnej, połączone ze stosowaniem odpowiednich środków przeciwbakteryjnych, pozwalają kontrolować biofilm bakteryjny i u większości pacjentów wystarczają do zapewnienia dobrego stanu zdrowia jamy ustnej pomiędzy wizytami u lekarza stomatologa. O regularnych wizytach kontrolnych w gabinecie stomatologicznym nie należy zapominać – profesjonalne usuwanie biofilmu i kamienia nazębnego przez higienistkę lub lekarza dentystę jest niezbędne do zachowania dobrego stanu tkanek przyzębia. U zdecydowa-

nej większości pacjentów wystarczą regularne wizyty, najczęściej co 6 miesięcy.

Zabiegi u lekarza dentysty sprowadzają się najczęściej do skalingu, wygładzania korzeni i oczyszczania za pomocą ultradźwięków lub ewentualnych zabiegów chirurgicznych przeprowadzanych w celu usunięcia zawartości głębokich kieszeni przyzębnych, których pacjent nie byłby w stanie wykonać samodzielnie podczas domowych czynności higienicznych [22].

Należy pamiętać, że codzienna pielęgnacja ma kluczowe znaczenie w profilaktyce i zwalczaniu biofilmu bakteryjnego jamy ustnej.

7. Perspektywy

Biofilm jest główną przyczyną dwóch najczęstszych chorób jamy ustnej: próchnicy i chorób przyzębia [24]. Ze względu na skomplikowaną specyfikę zakażeń spowodowanych przez biofilmy – ich przewlekłość, trudności w leczeniu i tendencję do nawrotów – naukowcy zmuszeni są poszukiwać innowacyjnych strategii leczniczych biofilmu bakteryjnego. Coraz większe zainteresowanie środowisk badawczych tym zagadnieniem daje nadzieję na skuteczne zwalczanie biofilmów bakteryjnych w przyszłości. Dotychczas większość metod leczniczych jest w fazie badań, dlatego obecnie najlepszą metodą walki z biofilmem jest niedopuszczenie do skolonizowania zagrożonej powierzchni, poprzez codzienną staranną higienę jamy ustnej. Kontrolę nad biofilmem bakteryjnym jamy ustnej zapewni regularne używanie preparatów przeciwbakteryjnych, takich jak pasty do zębów, płyny do płukania i nici dentystyczne do czyszczenia przestrzeni międzyzębowych. Właściwa, konsekwentna higiena jamy ustnej jest najlepszym sposobem na zwalczanie biofilmu bakteryjnego i zachowanie zdrowia jamy ustnej.

Literatura

- [1] Azeredo J., Sutherland I.W. (2008) The use of phages for the removal of infectious biofilms, *Curr. Pharm. Biotechnol.* 9(4).
- [2] Cate J.M. (2006) Biofilms, a new approach to the microbiology of dental plaque, *Odontol.* 94, 1–9.
- [3] Czaczyk K., Myszką K. (2007) Mechanizmy warunkujące oporność biofilmów bakteryjnych na czynniki antymikrobiologiczne, *Biotechnol.* 76, 40–52.
- [4] Dardzińska W., Dworecka-Kaszak B. (2014) Biofilm bakteryjny płytki nazębnej i jego znaczenie w chorobach jamy ustnej psów i kotów, *Życ. Wet.* 3, 216–221.

- [5] Demling A., Elter C., Heidenblut T., Bach F.W., Hahn A., Schwestka-Polly R., Stiesch M., Heuer W. (2010) Reduction of biofilm on orthodontic brackets with the use of polytetrafluoroethylene coating, *Europ. J. Orthod.* 32, 414–418.
- [6] Dige I., Nyengaard J.R., Kilian M., Nyvad B. (2009) Application of stereological principles for quantification of bacteria in intact dental biofilms, *Oral Microb. Immun.* 24, 69–75.
- [7] Donlan R.M. (2002) Biofilms: microbial life on surfaces, *Emerg. Infect. Dis.* 8, 136–151.
- [8] Foster J.S., Kolenbrander P.E. (2004) Development of a multispecies oral bacterial community in a saliva-conditioned flow cell, *Appl. Env. Microb.* 70, 4340–4348.
- [9] Geesey G.G., Lewandowski Z., Flemming H.C. (1994) *Biof. Bioc. Ind. Wat. Syst.* 66.
- [10] Guggenheim B., Meier A. (2011) *In vitro* effect of chlorhexidine mouth rinses on poly-species biofilms, *Schweiz. Monatsschr. Zahnmed.* 121, 432–441.
- [11] Handler-Olsen S., Sandvik K., El-Agroudi M.A., Øgaard B. (2012) The incidence of caries and white spot lesions in orthodontically treated adolescents with a comprehensive caries prophylactic regimen – a prospective study, *Europ. J. Orthod.* 34, 633–639.
- [12] Hannig C., Hannig M. (2009) The oral cavity – a key system to understand substratum-dependent bioadhesion on solid surfaces in man, *Clin. Oral Invest.* 13, 123–139.
- [13] Harper D., Parracho H., Walker J., Sharp R., Hughes G., Werthé N.M., Lehman S., Morales S. (2001) Bacteriophages and Biofilms, *Antib.* 3, 270–284.
- [14] He X.S., Shi W.Y. (2009) Oral microbiology: past, present and future, *Int. J. Oral Sci.* 1, 47–58.
- [15] Hetmańczyk S., Małachowska-Jutysz A. (2014) Biobójcze właściwości nanocząsteczek srebra, *Przem. Chem.* 93/7, 1106–1109.
- [16] Huang R., Li M., Gregory R.L. (2011) Bacterial interactions in dental biofilm, *Virulan* 2, 435–444.
- [17] Hurlow J., Couch K., Laforet K., Bolton L., Metcalf D., Bowler P. (2015) Clinical Biofilms: A Challenging Frontier in Wound Care, *Adv. Wound Care* 4, 295–301.
- [18] Kołwzan B. (2011) Analiza zjawiska biofilmu – warunki jego powstawania i funkcjonowania, *Ochr. Środ.* 4, 3–14.
- [19] Kozak U., Dunin-Wilczyńska I. (2014) Biofilm w ortodoncji – cz. 1, *Forum Ortodont.* 10, 41–46.
- [20] Marsh P.D. (2004) Dental plaque as a microbial biofilm, *Caries Res.* 38, 204–211.
- [21] Marsh P.D., Moter A., Devine D.A. (2000) Dental plaque biofilms: communities, conflict and control, *Periodontol.* 55, 16–35.
- [22] Michmershuizen F. (2011) Zwalczanie biofilmu bakteryjnego ma istotne znaczenie dla zachowania zdrowia przyzębia, *Den. Trib. Pol. Ed.* 4.
- [23] Mombelli A. (2012) Antimicrobial advances in treating periodontal diseases, *Front. Oral Biol.* 15, 133–148.
- [24] Pasich E., Walczewska M., Pasich A., Marcinkiewicz J. (2013) Mechanizm i czynniki ryzyka powstawania biofilmu bakteryjnego jamy ustnej, *Post. Hig. Med. Dośw.* 67, 736–741.
- [25] Paster B.J., Olsen I., Aas J.A., Dewhirst F.E. (2008) The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites, *Periodontol.* 42, 80–87.
- [26] Podsadna B. (2008) Biofilm w stomatologii, *Dent. Trib. Pol. Ed.* 10, 17.
- [27] Pokrowiecki R., Mielczarek A. (2012) Wybrane przykłady wykorzystania nanocząsteczek w procedurach medycznych, *Now. Stom.* 3, 117–121.
- [28] Porucznik A., Łojkowski W. (2014) Zastosowanie nanotechnologii w białostockich gabinetach stomatologicznych, *Ekon. i Zarz.* 6, 71–81.

- [29] Ritz H.L. (1967) Microbial population shifts in developing human dental plaque, *Archiv. Oral Biol.* 12, 1561–1568.
- [30] Seth A.K., Geringer M.R., Gurjala A.N. (2012) Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm-infected wounds with clinical wound care strategies: a quantitative study using an *in vivo* rabbit ear model, *Plast Reconstr. Surg.* 129, 262–274.
- [31] Seth A.K., Geringer M.R., Hong S.J., Leung K.P., Mustoe T.A., Galiano R.D. (2012) *In vivo* modeling of biofilm-infected wounds: a review, *J. Surg. Res.* 178, 330–338.
- [32] Shimotoyodome A., Koudate T., Kobayashi H., Nakamura J., Tokimitsu I., Hase T., Inoue T., Matsukubo T., Takaesu Y. (2007) Reduction of *Streptococcus mutans* adherence and dental biofilm formation by treatment with phosphorylated polyethylene glycol, *Antimicrob. Agents Chemother.* 51, 3634–3641.
- [33] Slots J., Ting M. (2002) Systemic antibiotics in the treatment of periodontal disease, *Periodontol.* 28, 106–176.
- [34] Sousa C., Botelho C., Oliveira R. (2011) Nanotechnology applied to medical biofilms control, w: Méndez-Vilas A., *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*, Formatex Research Center.
- [35] Strużycka I. (2010) Biofilm – współczesne spojrzenie na etiologię próchnicy, *Dental Forum* 38, 73–79.
- [36] Strużycka I., Stępień I. (2009) Biofilm – nowy sposób rozumienia mikrobiologii, *Nowa Stomat.* 3, 85–89.
- [37] Świdwińska-Gajewska A.M. (2007) Nanocząsteczki – cz. 2, Korzyści i ryzyko dla zdrowia, *Med. Pracy* 58, 253–263.
- [38] Świdwińska-Gajewska A.M., Czerczak S. (2014) Nanocząsteczki ditlenku tytanu – dopuszczalne poziomy narażenia zawodowego, *Med. Pracy* 65, 407–418.
- [39] Trafny E.A. (2012) Jak zdobyć i wykorzystać wiedzę o wielogatunkowych biofilmach?, *Post. Mikrobiol.* 51, 3, 205–211.
- [40] Velázquez-Velázquez J.L., Santos-Flores A., Araujo-Meléndez J., et al. (2015) Antibiofilm and cytotoxicity activity of impregnated dressings with silver nanoparticles, *Mater Sci. Eng. C. Mater Biol. Appl.* 49, 604–611.
- [41] Zaremba M.L. (2008) Mikrobiologiczne właściwości triklosanu, *Czasop. Stomat.* 61, 54–170.
- [42] *NCN film promocyjny*, <<http://www.biologia.uni.wroc.pl/pl/news/dla-mediow/218>>, 20.08.2015.
- [43] Trafton A., *Fighting bacteria with mucus*, <<http://newsoffice.mit.edu/2012/fighting-bacteria-with-mucus>>, 20.08.2015.
- [44] Huang i wsp. (2011) w: Cech G.M., Kloska A., *Płytką nazębną – niezwykle złożony ekosystem*, <<http://www.szkołymedyczne.eu/wp-content/uploads/2013/10/plyka-nazebna.png>>.
- [45] <http://www.geistlich-harma.com/en/pharmaceutical/products/taurosept/taurosept-crbsi/>.

Część druga



NANO- BIOMEDYCYNA

ZASTOSOWANIE NANOCZĄSTEK METALI W TERAPII PRZECIWNOWOTWOROWEJ

EWELINA ZIELIŃSKA¹, KAROLINA NISKA¹,
DOROTA MEHRHOLZ², DAGMARA LUBOWIECKA¹,
IWONA INKIELEWICZ-STĘPNIAK¹

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

² Katedra i Klinika Dermatologii, Wenerologii i Alergologii
ul. Dębinki 7, 80-211 Gdańsk

e-mail: ezielinska@gumed.edu.pl; iinkiel@gumed.edu.pl

Hasła do zapamiętania: nanotechnologia, nanocząstki metali, nowotwór,
terapia celowana

Wykaz skrótów:

WHO – Światowa Organizacja Zdrowia
MMAE – monometyloaurystatyna E
P-gp – glikoproteina P
AgNPs – nanocząstki srebra
AuNPs – nanocząstki złota

1. Wstęp

Choroby nowotworowe są obecnie jednymi z najczęściej występujących schorzeń na świecie. Są również drugim po chorobach układu krążenia powodem zgonów w Polsce [1]. Mimo swojej powszechności nie są jednak chorobami nowożytnymi. Przypadki zachorowań na nowotwory odnotowano już w cywilizacjach starożytnych [2]. Należy jednak zauważyć, że wraz ze wzrostem długości życia człowieka, zwiększeniem tempa życia oraz silniejszym narażeniem na czynniki kancerogenne drastycznie wzrosło ryzyko wystąpienia choroby nowotworowej [3].

Obecnie z chorobą nowotworową zmagają się około 17 milionów ludzi na całym świecie. Według szacunków Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) do 2030 r. liczba ta może wzrosnąć do 27 milionów. W Polsce rokrocznie diagnozuje się 155 tysięcy zachorowań i 93 tysiące zgonów z powodu choroby nowotworowej [2, 3]. Zapadalność na nowotwory ciągle rośnie. W 1980 r. współczynnik zapadalności wynosił $151,7/10^5$, natomiast w 2010 r. wzrósł do $220,8/10^5$ [6]. Do najczęściej występujących nowotworów zalicza się raka piersi, płuca, prostaty, jelita grubego, pęcherza moczowego, macicy czy żołądka. Nowotworami o najwyższej śmiertelności są natomiast rak płuca, rak jelita grubego, rak piersi i rak trzustki [5].

Zmiany nowotworowe najczęściej diagnozuje się u osób w średnim lub podeszłym wieku. Częstość występowania konkretnych nowotworów w dużym stopniu zależy od płci [8].

Ponadto ciągle szuka się nowych, efektywniejszych metod leczenia choroby nowotworowej, ze względu na dużą toksyczność oraz niezadowalającą skuteczność obecnie stosowanych terapii.

Jedną z najszybciej rozwijających się obecnie gałęzi medycyny jest nanomedycyna. Skupia się ona na wykorzystaniu nanocząstek – struktur nie większych niż 100 nm – w diagnostyce medycznej, farmakologii czy onkologii. Domniemywa się, że nanotechnologia stanowi przyszłość współczesnej medycyny. Liczne doniesienia naukowe pokazują możliwe zastosowania nanocząstek metali w terapii przeciwnowotworowej [9]. W literaturze opisano pozytywne wyniki terapii nowotworu macicy, piersi, jelita grubego czy trzustki [5–9]. Dziedzinę nauki zajmującą się oddziaływaniem nanocząstek na komórki nowotworowe nazwano nanoonkologią [9].

2. Geneza powstawania nowotworów

Mianem nowotworu nie można określić pojedynczej jednostki chorobowej. Jest to liczna grupa schorzeń o różnej lokalizacji, tempie rozwoju, przebiegu, przyczynach i skutkach [3].

Mimo szybkiego rozwoju cywilizacji, postępów medycyny oraz szeregu badań prowadzonych nad genezą powstawania nowotworów, nadal nie została ona dokładnie wyjaśniona. Podstaw powstawania nowotworów należy dopatrywać się na poziomie molekularnym [14]. Obecnie prowadzone są liczne badania naukowe mające na celu identyfikację oraz poznanie mechanizmu procesu kancerogenezy, czyli nowotworzenia komórek.

Nowotwór jest nabytą chorobą genetyczną spowodowaną utratą kontroli organizmu nad procesem podziału komórkowego. W wyniku uszkodzeń materiału genetycznego dochodzi do niekontrolowanych podziałów

komórkowych i wytworzenia komórek nieróżnicujących się w prawidłowe tkanki [3, 15]. Podsumowując, nowotwór to choroba polegająca na pojawieniu się w organizmie jednej autonomicznej komórki, która nie reaguje na wysyłane przez organizm polecenia [15].

W procesie kancerogenezy możemy wyróżnić trzy etapy: inicjację, promocję i progresję. Podczas inicjacji na zdrową komórkę oddziałuje czynnik rakotwórczy powodujący jej mutację. Promocja jest etapem, w którym zainicjowana komórka przechodzi kolejne mutacje, stając się typową komórką nowotworową. Ostatni etap – progresja – polega na wzroście i rozprzestrzenianiu się komórek nowotworowych w organizmie [3].

Czynniki, które uszkodzają DNA, to mutageny. W każdej chwili na zdrowe komórki działają czynniki kancerogenne, takie jak: węglowodory aromatyczne, promieniowanie ultrafioletowe, nitrozaminy, azbest i wiele innych substancji. Komórki dysponują mechanizmami obronnymi i naprawczymi. Żeby doszło do powstania nowotworu, konieczna jest kumulacja uszkodzeń materiału genetycznego, która nie spowoduje apoptozy (śmierci komórki), natomiast doprowadzi do uszkodzenia genów odpowiedzialnych za naprawę DNA i hamujących śmierć komórki [16].

W komórce znajdują się geny supresorowe – antyonkogeny, które hamują podziały komórkowe i stabilizują liczebność populacji komórkowej. Najbardziej popularnym genem supresorowym jest gen TP53. Gen koduje białko p53, którego funkcja polega na indukcji apoptozy, gdy procesy naprawy DNA są nieskuteczne. Uszkodzenie genu TP53 prowadzi do braku indukcji apoptozy i promowania niekontrolowanych podziałów komórek ze zmutowanym DNA. Mutacje w genie TP53 są obserwowane w wielu nowotworach. Jest to jeden z najpopularniejszych patomechanizmów nowotworzenia [16, 18].

Protoonkogeny są odcinkami DNA, które występują w zdrowej komórce. Produkty białkowe są czynnikami pro wzrostowymi w komórce. Uszkodzenie DNA w obrębie protoonkogenu przekształca go w onkogen i inicjuje proces nowotworzenia. Wartymi zapamiętania protoonkogenami są RAS, MYC oraz MDM2 [16].

Ostatnimi prowadzącymi do rozwoju nowotworu są geny zaangażowane w regulację apoptozy. Jak już wspomniano, zadaniem tych genów jest naprawa uszkodzeń materiału genetycznego spowodowanych mutagenami i przywrócenie prawidłowego układu zasad w nici DNA [15]. Mutacje genów naprawczych prowadzą do kumulacji błędów i w przypadku kiedy proces apoptozy nie działa poprawnie, dochodzi do powstania komórki nowotworowej.

Kumulacja licznych uszkodzeń genów, a tym samym ich produktów białkowych, prowadzi do utraty kontroli nad podziałami komórkowymi

i powstania komórki nowotworowej o nieskończonym potencjale do wzrostu i podziałów. W komórce nowotworowej dochodzi przez cały czas do zmian epigenetycznych i molekularnych powodujących oporność na stosowane leki cytotoksyczne oraz nawrót choroby.

Nowotwory możemy podzielić na łagodne i złośliwe. Łagodne są zmianami wolno rosnącymi, otorbionymi, jednak podobnymi do zdrowej tkanki. Rosną one w sąsiedztwie zdrowej tkanki, nie niszczą jej. Powodują natomiast ucisk prawidłowej struktury. Nie dają przerzutów, możliwe jest ich łatwiejsze leczenie i usunięcie. Do nowotworów łagodnych należą m.in. tłuszczaki, gruczolakowłókniaki czy mięśniaki. Mianem nowotworu złośliwego określamy szybko rosnące, nieotorbione zmiany naciekające (wnikające pomiędzy komórki prawidłowej tkanki) otaczające je struktury i niszczące zdrowe komórki. Są one zdolne do rozprzestrzeniania się – przerzutowania [3]. Niezależnie od lokalizacji, nieleczone lub późno wykryte często doprowadzają do szybkiej śmierci pacjenta.

Nowotwory można również podzielić ze względu na tkankę, z której powstają. Pochodzące z tkanki nabłonkowej nazywamy rakami, z tkanki łącznej – mięsakami, z układu chłonnego – chłoniakami, z tkanki barwnikotwórczej – czerniakiem, z komórek szpiku – białaczką, z tkanki nerwowej – glejakami [3, 19].

3. Terapia nowotworów

W zależności od celów i możliwości leczenia danego nowotworu wyróżniamy terapię radykalną oraz paliatywną. Leczenie radykalne ma na celu trwałe wyleczenie pacjenta. Z uwagi na duże zaawansowanie choroby lub złośliwość nowotworu, w momencie braku możliwości wyleczenia nowotworu stosuje się leczenie paliatywne. Opiera się ono na poprawie jakości życia chorego, likwidowaniu niebezpiecznych dla życia objawów oraz leczeniu przeciwbólowym. Leczenie paliatywne nie wpływa natomiast na naturalny przebieg procesu nowotworzenia, a co za tym idzie nie przedłuża życia pacjenta [20, 21].

3.1. Tradycyjne metody leczenia

Istnieją trzy główne (tradycyjne) rodzaje leczenia przeciwnowotworowego: radioterapia, chirurgia oraz chemioterapia. Zdobyczą medycyny jest terapia celowana nowotworów. Obecnie w Europie udaje się wyleczyć 45 na 100 pacjentów nowotworowych [15].

Chirurgia jest najstarszą metodą walki z nowotworami, znaną od starożytności [2]. Stosuje się ją zarówno w przypadku nowotworów łagodnych (jako główną metodę leczenia), jak i złośliwych. Jako samodzielna metoda leczenia znajduje zastosowanie w rakach o niskim stopniu zaawansowania (T1-2N0) i wysokim lub średnim stopniu złośliwości histologicznej (G1-2) [22]. Pierwotnie dążono do wycinania jak największych bloków tkankowych, dbając o zachowanie odpowiednio dużego marginesu zdrowych tkanek, w celu ochrony przed miejscową wznową nowotworu [23]. Obecnie wskutek łączenia radioterapii, chemioterapii i chirurgii możliwe są zabiegi oszczędzające. Wyniki takiego postępowania są mniej okaleczające dla pacjenta, z zachowaniem satysfakcjonujących wyników leczenia [24]. Chirurgiczne leczenie jest skuteczne, jako jedyna metoda, w przypadku 22% pacjentów [15].

Radioterapia jest tak samo jak chirurgia metodą leczenia miejscowego, co oznacza że niszczone są tylko te komórki, które zostaną naświetlone. Stosuje się ją w zaawansowanej chorobie nowotworowej, w celu przedłużenia czasu życia chorego [25]. Niszczenie komórek nowotworowych powoduje promieniowanie jonizujące, charakteryzujące się wysoką przenikalnością przez tkanki oraz siłą działania. W teleterapii (energia dostarczana z zewnątrz) wykorzystuje się głównie promieniowanie elektromagnetyczne, przy czym coraz większe zastosowanie ma promieniowanie korpuskularne. Brachyterapia polega na umieszczeniu izotopu promieniotwórczego we wnętrzu guza nowotworowego lub w łoży po wyciętym chirurgicznie guzie. Wskutek zastosowania radioterapii udaje się wyleczyć 18% pacjentów z nowotworem [15, 25, 26].

Ostatnią tradycyjną metodą leczenia nowotworów jest chemioterapia. Stosowana jest ona zarówno w terapii radykalnej, jak i paliatywnej [26]. Jest to metoda systemowa, co oznacza, że substancja wprowadzona do organizmu działa na wszystkie komórki. Chemioterapia polega na stosowaniu leków cytotoksycznych. Niszczono są wszystkie komórki szybko dzielące się, czego konsekwencją są skutki uboczne leczenia w postaci supresji szpiku kostnego, uszkodzenia nabłonków jamy ustnej, przewodu pokarmowego, wypadnie włosów oraz bezpłodność [27]. Mechanizm działania chemioterapeutyków jest różny. Istnieją leki zatrzymujące podział komórki w konkretnej fazie cyklu, np. alkaloidy barwinka hamują powstawanie wrzeciona kariokinetycznego, lub fazowo niespecyficzne, np. cyklofosamid. Antybiotyki przeciwnowotworowe stabilizują nici DNA w taki sposób, aby nie było możliwe ich rozplecenie w trakcie mitozy. Inną grupą leków przeciwnowotworowych są antymetabolity. Są to substancje hamujące reakcje enzymatyczne poprzez hamowanie kompetencyjne produktem. Efektem stosowania antymetabolitów jest niedobór

substancji potrzebnych do podziału komórkowego i w konsekwencji apoptoza komórki [28]. Chemioterapia jest najmniej skuteczną metodą walki z nowotworami, wskutek jej zastosowania możliwe jest wyleczenie tylko 5% pacjentów [15].

3.2. Nowoczesne metody leczenia

Z uwagi na niewystarczającą skuteczność tradycyjnych metod leczenia nowotworów, wciąż poszukuje się nowych dróg terapii. Na całym świecie prowadzone są zaawansowane badania (zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*) przynoszące zdumiewające efekty. Z roku na rok wzrasta liczba nowych technik oraz substancji mających działanie przeciwnowotworowe. W publikacji skupiono się na omówieniu wybranych nowoczesnych metod leczenia nowotworów [29, 30].

Terapia skojarzona jest najprostszą odpowiedzią na nieskuteczność tradycyjnych metod leczenia [31]. Wskutek większej skuteczności w porównaniu z tradycyjną terapią stała się obecnie podstawową strategią postępowania onkologicznego. Polega ona na łączeniu (kojarzeniu) ze sobą co najmniej dwóch metod u jednego chorego. Są to zazwyczaj połączenia chirurgii, radioterapii i chemioterapii. W zależności od sposobu łączenia metod możemy mówić o leczeniu sekwencyjnym i naprzemiennym. Leczenie sekwencyjne polega na następującym po sobie zastosowaniu dwóch metod tradycyjnych, np. chirurgii i radioterapii. Drugi sposób leczenia dotyczy kojarzenia chemioterapii i radioterapii, występujących naprzemiennie. Leczenie skojarzone wymaga jednak znajomości i umiejętności łączenia różnych metod terapeutycznych, jednak w wielu przypadkach umożliwia zastosowanie leczenia chirurgicznego, gdy pierwotnie było to niemożliwe ze względu na wielkość i charakter zmiany. Pozwala również zastąpić inwazyjne zabiegi leczeniem zachowawczym. Przykładem może być równoczesna chemio- i radioterapia w leczeniu raka krtani czy kanału odbytu. Zastosowanie terapii skojarzonej zmniejsza również ryzyko nawrotu choroby, rozwoju przerzutów, a także wydłuża czas przeżycia chorych. Terapię skojarzoną stosuje się powszechnie w terapii raka piersi, jelita grubego oraz niedrobnokomórkowego raka płuca [32, 33].

Innowacyjną metodą walki z nowotworami stała się terapia celowana. Jest to stosunkowo nowy sposób leczenia, znany od ok. 25 lat. Polega on na specyficznym oddziaływaniu na białka sygnałowe komórek nowotworowych. Najczęściej blokowane są receptory komórkowe odpowiedzialne za przekazywanie sygnału aktywacji podziału komórki nowotworowej. Zaburzenie szlaku sygnałowego w komórce prowadzi do upośledzenia jej

funkcji życiowych, a co za tym idzie do jej programowanej śmierci (często na skutek apoptozy) [34]. Taka metoda leczenia pozwala na swoiste dostosowanie terapii do indywidualnych potrzeb chorego, a także zmniejszenie skutków ubocznych przy wysokiej skuteczności niszczenia komórek nowotworowych.

Leczenie celowane może wykorzystywać dotychczas znane metody – np. chemioterapię – lub całkowicie nowe – m.in. metody molekularne, tj. terapię genową czy immunoterapię [35]. W ostatnim dziesięcioleciu zaczęto stosować przeciwciała przeciwko białkom komórek nowotworowych, których brak w zdrowych komórkach organizmu. Wskutek tego uszkodzana zostaje komórka nowotworowa, natomiast niepożądane działania leku na zdrowe tkanki zostały praktycznie wyeliminowane [34]. Dużą popularnością cieszą się inhibitory kinaz, np. inhibitor kinazy tyrozynowej – imatinib. To przełomowy lek stosowany w terapii przewlekłej białaczki szpikowej. Jego zastosowanie drastycznie zwiększyło krzywe przeżycia w tym nowotworze [36].

4. Oporność

Jedną z przyczyn nieskuteczności stosowanej terapii przeciwnowotworowej jest lekooporność komórek nowotworowych. Pierwszy raz zjawisko to udokumentowano w 1968 roku. Wykazano wtedy krzyżową oporność komórek białaczkowych myszy na leki cytostatyczne [37, 38]. Dziś wiadomo, że komórki nowotworowe o dużej częstości niekontrolowanych mutacji szybko uodparniają się na określony lek [39]. Zasadne jest więc jednoczesne zastosowanie kilku leków przeciwnowotworowych dla poprawienia skuteczności terapii. Przyczyny lekooporności są różnorodne: nieprawidłowe dawkowanie, zmiany metabolizmu czy biologiczna dostępność leku.

Wśród lekooporności wyodrębnia się oporność pierwotną i wtórną. Pierwotna to taka, którą stwierdzono przed poddaniem pacjenta chemio- lub radioterapii. Oporność wtórna natomiast wywoływana jest przez wystawienie komórek nowotworowych na działanie chemio- lub radioterapii [40].

W związku z powyższym poznanie molekularnego mechanizmu oporności na leki jest jednym z najważniejszych problemów i założeń współczesnej onkologii. Do chwili obecnej opisano kilkanaście mechanizmów oporności. Najlepiej poznany jest jednak proces usuwania leków z komórki lub jądra komórkowego przez błonowe białko transportowe – glikoproteinę P (P-gp) [40, 41, 42].

5. Zastosowanie nanocząstek metali w terapii przeciwnowotworowej

W ostatnim dziesięcioleciu rozwój nanotechnologii wpłynął znacząco na dynamizację badań w dziedzinie farmakologii onkologicznej. Specyficzne właściwości nanocząstek, tj. duża powierzchnia w stosunku do rozmiarów, łatwość penetrowania przez błony biologiczne i bariery ustrojowe, pozwoliły na ich zastosowanie w terapii przeciwnowotworowej (jako nośników leków, w terapii celowanej oraz diagnostyce). Właściwości te pozwalają również znacznie zmniejszyć stosowane stężenia/dawki, a tym samym działania uboczne oraz toksyczność leku w stosunku do zdrowych komórek. Dowiedziono, że koniungaty cytotoksyków (np. monometyloaurystatyny E i doksorubicyny) z nanocząstkami działają dwukrotnie silniej niż wolne substancje w tym samym stężeniu [44]. Daje to nadzieję na zwiększenie procentowej przeżywalności pacjentów z chorobą nowotworową.

Istotnym przykładem zastosowania nanotechnologii w terapii przeciwnowotworowej jest wykorzystanie nanocząstek superparamagnetycznych, np. tlenku żelaza ($\text{Fe}_2\text{O}_3\text{NPs}$). Takie nanocząstki, po wystarczająco długiej ekspozycji na pole magnetyczne, zdolne są do emisji energii w postaci ciepła [44]. Dzięki tej właściwości stosowane są w hipertermii. Jest to metoda zabijania komórek nowotworowych za pomocą odpowiednio skierowanej energii cieplnej. Metoda ta najczęściej wykorzystywana jest w skojarzeniu z chemio- lub radioterapią. Badania wskazują na zwiększenie całkowitej remisji raka piersi z 38% do 60%, raka szyjki macicy z 57% do 83% po zastosowaniu hipertermii z udziałem $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{NPs}$ [45, 46].

Jedną z metod zwiększania skuteczności terapii przeciwnowotworowej jest zastosowanie celowanego transportu leków. W taki sposób chemioterapeutyk dostarczany jest bezpośrednio w miejsce zmiany chorobowej, z minimalnym narażeniem innych organów na niepożądane skutki uboczne. Zastosowanie nanocząstek jako nośników leków przeciwnowotworowych daje bardzo obiecujące efekty. Wskutek dużej powierzchni nanocząstki w stosunku do małych rozmiarów ułatwiony jest zarówno transport przez błony biologiczne, jak i większe stężenie leku może dotrzeć do miejsca docelowego. W ten sposób uzyskuje się odpowiednie stężenie chemioterapeutyku w komórkach nowotworowych [47]. Zazwyczaj stosuje się nanocząstki o wymiarach (3–100 nm). Istotne jest jednak dostosowanie odpowiednich, specyficznych dla komórek nowotworowych, ligandów. Ważne jest również zabezpieczenie ich przed innymi przeciwciałami monoklonalnymi, fragmentami przeciwciał lub silną reakcją im-

munoobronną [48]. Dotychczas prowadzone są badania nad zastosowaniem nanocząstek srebra, złota oraz ditlenku tytanu w terapii celowanej. Przeprowadzono badania, które wykazały że zwiększenie powierzchni nośnej nanocząstek poprzez zmianę kształtu na gwieździsty wpływa na wzrost skuteczności terapii celowanej [49].

Możliwe jest również zastosowanie nanocząstek w terapii genowej. Nanocząstki wykorzystuje się jako nanonośniki siRNA, służącego do wyciszenia ekspresji genów [49, 50].

6. Innowacyjne podejście do leczenia nowotworu trzustki

Nowotwory złośliwe trzustki stanowią około 3% wszystkich nowotworów złośliwych występujących u człowieka. Rak trzustki jest nowotworem o szczególnie złym rokowaniu, w którym współczynnik średniego 5-letniego przeżycia jest najniższy ze wszystkich nowotworów układu pokarmowego, stanowiąc czwartą przyczynę zgonów wśród chorób nowotworowych. Do tej pory nie opracowano jeszcze skutecznej terapii przeciwnowotworowej raka trzustki [6]. Najczęściej stosuje się leczenie paliatywne skojarzone chirurgii i chemioterapii. Metoda ta jednak nie daje zadowalających efektów. Postępy biologii molekularnej, które dokonały się w ostatnich latach, pozwoliły jednak znacznie lepiej zrozumieć patogenezę raka trzustki. Wielu pacjentów wykazuje mutacje onkogenu K-ras, inne geny supresorowe ulegają dezaktywacji [51]. Badania *in vitro* stanowią pierwszy etap oceny przydatności nowych substancji jako potencjalnych leków przeciwnowotworowych. Stwierdzono, że AgNPs hamują wzrost i proliferację nowotworowych komórek epitelialnych przewodu trzustkowego, a także wywołują zaprogramowaną śmierć komórek [52]. Wyniki wstępne pozwalają domniemać, że nanocząstki srebra ze względu na hamowanie proliferacji komórek raka trzustki mogą w przyszłości być stosowane w terapii przeciwnowotworowej. Wymaga to jednak przeprowadzenia dalszych badań o szerokim zasięgu zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo*.

7. Perspektywy

Rozwój nauki jest napędem rozwoju medycyny i szukania nowych możliwości zastosowania zdobyczy dzisiejszego świata. Naukowcy nieustannie szukają nowych leków, a znalezienie lekarstwa „na raka”

jest priorytetem świata nauki i nadzieją wszystkich ludzi. Nanotechnologia wydaje się przyszłością onkologii. Dzięki dynamicznie rozwijającym się badaniom dotyczącym skutecznej terapii przeciwnowotworowej możliwe jest zwiększenie przeżywalności oraz wydłużenie życia pacjentów. Prowadzi to do wyeliminowania dotychczasowych, mało skutecznych tradycyjnych metod leczenia oraz rozbudowania terapii na poziomie molekularnym [53]. Konieczne są jednak badania interdyscyplinarne, pozwalające na opracowanie bezpiecznych metod leczenia.

Z uwagi na rozwój nanotechnologii możliwe jest modyfikowanie i coraz szersze stosowanie terapii celowanej, w której jako nośniki wykorzystywane są nanocząstki metali. Zauważa się wzrost efektywności działania cytostatyków przy użyciu nanocząstek.

Mimo iż nanocząstki wykazują pozytywne działanie w terapii przeciwnowotworowej, nadal istnieje wiele ograniczeń ich stosowania. Są to m.in. słaba biodostępność, niestabilność w obiegu, docieranie do tkanek w niewystarczającym stopniu czy toksyczność. Należy więc dalej prowadzić badania mające na celu dopracowanie metod stosowania nanocząstek w terapii nowotworowej [54].

Literatura

- [1] Potrykowska A., Strzelecki Z., Szymborski J. (2014) *Zachorowalność i umieralność na nowotwory a sytuacja demograficzna Polski*, Rząd. Rada Lud., Warszawa, 18–49.
- [2] Lenartowicz J. (2000) Historia onkologii. Leczenie chirurgiczne nowotworów na przestrzeni wieków ze szczególnym uwzględnieniem nowotworów jamy ustnej, *Nowotwory* 50, 625–631.
- [3] Jankowiak A. (2015) Nowotwory i ich profilaktyka, 24.08.2015, <http://marcinek.poznan.pl/upload/node/318_nowotwory_i_ich_profilaktyka_-_praca_1_.pdf>.
- [4] Dyzmann-Sroka A. (2010) *Metody uzyskiwania i opracowywania wiarygodnych danych pozwalających na ocenę skuteczności leczenia chorych w Wielkopolskim Centrum Onkologii*, Uniw. Med., Poznań, 4–27.
- [5] Mould R. (2008) Statystyka zachorowań na nowotwory ze szczególnym uwzględnieniem raka prostaty, okrężnicy i odbytnicy, płuca oraz piersi i szyjki macicy, *Nowotwory* 58, 213–220.
- [6] Kraj T., Nowakowska D.E., Rogowska A., Didkowska J., Wojciechowska U. (2015) Nowotwory złośliwe, 28.08.2015, <<http://onkologia.org.pl/nowotwory-zlosliwe-ogolem-2/>>.
- [7] World Health Organization (2015) The top 10 causes of death, 28.08.2015, <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>>.
- [8] Didkowska J., Wojciechowska U., Zatoński W. (2009) *Prognozy zachorowalności i umieralności na nowotwory złośliwe w Polsce do 2025 roku*, Narod. Progr. Zwalczenia Chorób Nowotwor. 48, 5–99.
- [9] Rzeszutek J., Matysiak M., Czajka M., Sawicki K., Kruszewski M., Kapka-Skrzypczak L. (2014) Zastosowanie nanocząstek i nanomateriałów w medycynie, *Hyg. Public Heal.* 49, 449–457.

- [10] Kaler A., Jain S., Banerjee U.C. (2013) Green and rapid synthesis of anticancerous silver nanoparticles by *Saccharomyces boulardii* and insight into mechanism of nanoparticle synthesis, *Biomed. Res. Int.* 2013, 1–8.
- [11] Sathishkumar G., Gobinath C., Wilson A., Sivaramakrishnan S. (2014) *Dendrophthoe falcata* (L.f) Ettingsh (*Neem mistletoe*): A potent bioresource to fabricate silver nanoparticles for anticancer effect against human breast cancer cells (MCF-7), *Spectrochim. Acta, Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 128, 285–290.
- [12] Ali K., Ahmed B., Dwivedi S., Saquib Q., Al-Khedhairi A., Musarrat J. (2015) Microwave Accelerated Green Synthesis of Stable Silver Nanoparticles with *Eucalyptus globulus* Leaf Extract and their Antibacterial and Antibiofilm Activity on Clinical Isolates, *PLoS One* 10, e0131178.
- [13] Jeyaraj M., Sathishkumar G., Sivanandhan G., Mubarak D., Rajesh M., Arun R., Kapildev G., Manickavasagam G., Thajuddin N., Premkumar K., Ganapathi A. (2013) Biogenic silver nanoparticles for cancer treatment: An experimental report, *Coll. Sur. B Biointerfaces* 106, 86–92.
- [14] Sacewicz I., Wiktorska M., Wysocki T. (2009) Mechanizmy angiogenezy nowotworowej, *Post. Hig. Med. Dośw.* 63, 159–168.
- [15] Kordek R. (2007) *Onkologia, podręcznik dla studentów i lekarzy*, Wm Group, Gdańsk.
- [16] Kumar V., Ramzi C.S., Robbins L.S. (2003) *Patologia Robbinsa*, Elsevier Urban & Partner, Wrocław, 199–231.
- [17] Wan P., Garnett M., Roe M., Lee S., Niculescu-Duvaz D., Good V., Jones M., Marshall C., Springer C., Barford D., Marais R. (2004) Mechanism of Activation of the RAF-ERK Signaling Pathway by Oncogenic Mutations of B-RAF, *Cell* 116, 855–867.
- [18] Greenblatt M., Bennett W., Hollstein W., Harris C. (1994) Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis, *Cancer Res.* 54, 4855–4878.
- [19] Katedra Onkologii AM, Wrocław (2008) Strategia leczenia nowotworów, 28.08.2015, <http://www.e-okologia.am.wroc.pl/docs/STRATEGIA_LECZENIA_NOWOTWOROW.pdf>.
- [20] Jarosz J. (2005) Opieka paliatywna w onkologii, *Onkol. Prakt. Klin.* 1, 109–115.
- [21] Gliński B., Ząbek M. (2006) Principles of diagnosis and treatment of patients with head and neck squamous cancer, *Współcz. Onkol.* 6, 263–267.
- [22] Gliński B., Ząbek M., Urbański J. (2006) Podstawowe zasady postępowania z chorymi na raka płaskonabłonkowego głowy i szyi, *Współcz. Onkol.* 10, 263–267.
- [23] Chicheł A. (2005) Contemporary management of skin cancer – dermatology, surgery or radiotherapy?, *Współcz. Onkol.* 9, 429–435.
- [24] Jeziorski A., Rutkowski P. (2014) *Kompendium chirurgii onkologicznej*, VM Media Sp. z o.o., Gdańsk, 1–352.
- [25] Leppert W., Nowakowska E. (2008) Rola radioterapii w leczeniu objawów zaawansowanej choroby nowotworowej, *Med. Pa. Prakt.* 61, 33–47.
- [26] Dehkordi A., Heydarnejad M., Fatehi D. (2009) Quality of life in cancer patients undergoing chemotherapy, *Oman. Med. J.* 14, 276–280.
- [27] Madej G. (1999) *Chemioterapia onkologiczna dorosłych i dzieci*, Wyd. Lek. PZWL, Warszawa.
- [28] Mutschler E., Gesslinger G., Kroemer H., Ruth P. (2010) *Mutschler farmakologia i toksykologia*, MedPharm Polska, Wrocław.
- [29] Novik A.V., Protsenkol S.A., Semenova A.I., Latipova D.K., Zhabina A.S. (2015) Modern methods of molecular targeted therapy for disseminated melanoma, *Vopr. Onkol.* 61, 297–302.

- [30] Fritz S., Lerch M. (2015) Natural History and Management of Intraductal Papillary Mucinous Neoplasms: Current Evidence, *Viszeralmedizin* 31, 25–30.
- [31] Krzemieniecki K. (2007) Leczenie skojarzone nowotworów złośliwych – postępy 2006, *Post. Med.* 14, 1–5.
- [32] Świeboda-Sadlej A. (2011) Skojarzone leczenie nowotworów – współpraca chirurga i onkologa klinicznego w zakresie leczenia raka piersi, jelita grubego i płuca, *Chir. Pol.* 13, 59–68.
- [33] Jassem J. (2007) Leczenie skojarzone, w: *Onkologia. Podręcznik dla studentów i lekarzy*, Via Medica, Gdańsk, 112–113.
- [34] Krawczyk P., Czekajska-Chehab E., Wojas-Krawczyk K., Jankowska O., Koczkodaj D., Rolski A., Mulawka D., Korobowicz E., Milanowski J. (1897) Molekularne terapie celowane w niedrobnokomórkowym raku płuca, *Forum Am. Bar Assoc.* 1, 16–26.
- [35] Krzakowski M. (2003) Molekularne leczenie celowane w nowotworach litych, *Rep. Pract. Onc. & Radio.* 1, 221–222.
- [36] Iqbal N., Iqbal N. (2014) Imatinib: a breakthrough of targeted therapy in cancer, *Chemother. Res. Pract.* 2014, 357027.
- [37] Kaw L., Zaidi S. (2009) *In Vitro* Studies on the Cytotoxic Action of Different Varieties of Asbestos Dust on Macrophages, *Acta Pharm. Toxicol.* 36, 225–235.
- [38] Kessel D., Botterill V., Wodinsky I. (1968) Uptake and retention of daunomycin by mouse leukemic cells as factors in drug response, *Cancer Res.* 28, 938–941.
- [39] Goldie J., Coldman A. (1979) A mathematic model for relating the drug sensitivity of tumors to their spontaneous mutation rate, *Cancer Treat. Rep.* 63, 1727–1733.
- [40] Lenart K., Szyska A., Podolak-Dawidziak M. (2005) Clinical effects of multidrug resistance in neoplasms, *Onkol. Prakt. Klin.* 1, 18–26.
- [41] Panczyk M., Sałagacka A., Mirowski M. (2007) MDR1 (ABCB1) gene encoding glycoprotein P (P-gp), a member of ABC transporter superfamily: consequences for therapy and progression of neoplastic diseases, *Post. Bioch.* 53, 361–373.
- [42] Badowska-Kozakiewicz A.M. (2011) Zjawisko oporności wielolekowej w nowotworach – rola glikoproteiny P, *Życie Weterynar.* 86, 211–214.
- [43] Jambrozak K., Młynarski W. (2001) Znaczenie białek transportowych nadrodziny ABC w oporności na leczenie ostrej białaczki szpikowej, *Acta Hematol. Pol.* 32, 131–145.
- [44] Pala K. (2014) *Nanocząstki superparamagnetyczne – synteza, charakterystyka i funkcjonalizacja przy użyciu makrocząsteczek biologicznych*, Uniw. Wrocławski, Wrocław, 1–10.
- [45] Skitzki J., Repasky E., Evans S. (2009) Hyperthermia as an immunotherapy strategy for cancer, *Curr. Opin. Investig. Drugs* 10, 550–558.
- [46] Nawara K. (2013) *Magnetic iron oxide nanoparticles as potential carriers for doxorubicin targeted drug delivery. Spectroscopic investigation of doxorubicin, nanoparticles and doxorubicin-nanoparticle interactions*, Uniw. Warszawski, Warszawa, 1–25.
- [47] Hergt R., Dutz S., Müller R., Zeisberger M. (2006) Magnetic particle hyperthermia: nanoparticle magnetism and materials development for cancer therapy, *J. Phys. Condens. Matter.* 18, S2919–S2934.
- [48] Jabir N.R., Tabrez S. (2012) Nanotechnology – based approaches in anticancer research, *Int. J. Nanomed.* 7, 4391–4408.
- [49] Orłowska M. (2015) „Złota nanotechnologia” w walce z nowotworami, 24.08.2015, <http://www.innowrota.pl/sites/default/files/images/M.Orłowska_2.pdf>.
- [50] Zhou H., Hu G., Wickline S., Lanza G.M., Tn C. (2010) Synergistic effect of antiangiogenic nanotherapy combined with methotrexate in the treatment of experimental inflammatory arthritis, *Nanomedicine* 5, 1065–1074.

-
- [51] Li D.H., Xie K.P., Wolff R., Abbruzzese J.L. (2004) Pancreatic cancer, *Lancet* 363, 1049–1057.
- [52] Ristorcelli E., Beraud E., Verrando P., Villard C., Lafitte D., Sbarra V., Lombardo D., Verine A. (2008) Human tumor nanoparticles induce apoptosis of pancreatic cancer cells, *FASEB J.* 22, 3358–3369.
- [53] Shiekh F. (2013) Personalized nanomedicine: Future medicine for cancer treatment, *Int. J. Nanom.* 8, 201–202.
- [54] Cho K., Wang X., Nie S., Chen Z., Shin D.M. (2008) Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer, *Clin. Cancer Res.* 14, 1310–1316.

ZASTOSOWANIE NANOCZĄSTEK METALI I TLENKÓW METALI W DERMATOLOGII I KOSMETYCE

EWELINA ZIELIŃSKA¹, KAROLINA NISKA¹,
DOROTA MEHRHOLZ², IWONA INKIELEWICZ-STĘPNIAK¹,
DAGMARA LUBOWIECKA¹

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

² Katedra i Klinika Dermatologii, Wenerologii i Alergologii
ul. Dębinki 7, 80-211 Gdańsk
e-mail: ezielinska@gumed.edu.pl

Hasła do zapamiętania: nanotechnologia, nanocząstki, dermatologia

Wykaz skrótów:

- AgNPs – nanocząstki srebra
- AuNPs – nanocząstki złota
- TiO₂NPs – nanocząstki ditlenku tytanu
- ZnONPs – nanocząstki cynku
- Fe₂O₃NPs – nanocząstki tlenku żelaza
- NPs – nanocząstki
- MOCVD – technika osadzania warstw na powierzchni materiałów poprzez stosowanie związków metaloorganicznych w formie gazowej
- MBE – epitaksja z wiązek molekularnych
- MRI – rezonans magnetyczny

1. Wstęp

Wygląd zewnętrzny jest niezwykle ważny w kształtowaniu dobrego wizerunku w pracy i życiu prywatnym. Jednym z elementów przykuwających uwagę jest kondycja skóry. W związku z tym choroby skóry

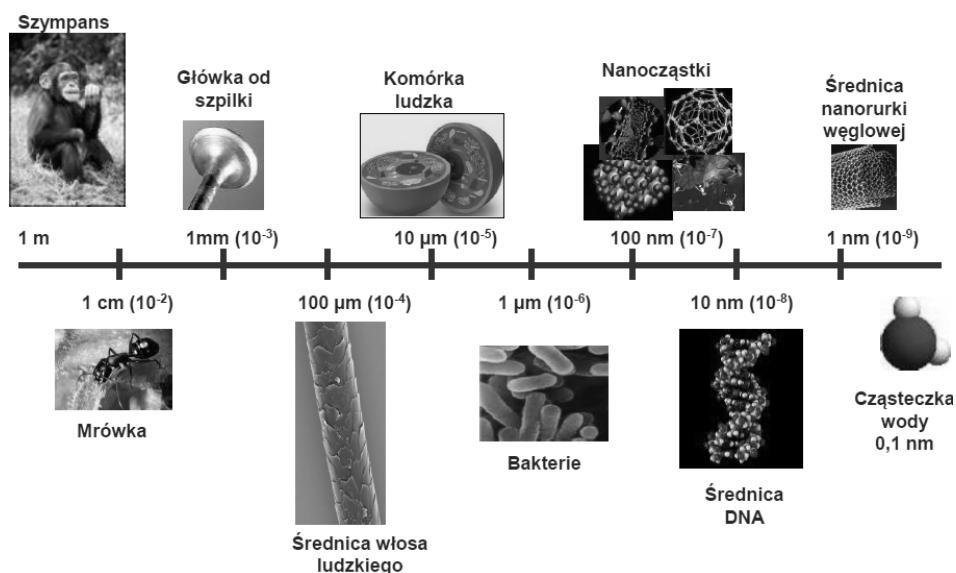
są jednymi z najszybciej narastających problemów wpływających na obniżenie jakości życia (QoL) pacjentów. Spowodowane jest to widocznymi zmianami skórными, długotrwałym leczeniem oraz częstymi bliznami pozostającymi po leczeniu. Odnotowuje się, że skala problemu jest porównywalna z chorobą wieńcową, astmą czy cukrzycą. Zanotowany w ostatnich latach wzrost zainteresowań jakością życia, w tym jakością życia osób z chorobami dermatologicznymi, spowodował znaczny rozwój badań nad substancjami dermoaktywnymi [1]. Poszukiwane są więc preparaty skuteczne, bezpieczne oraz szybko działające. Takie właściwości, w odróżnieniu do dotychczas dostępnych substancji, mają preparaty zawierające substancje w skali nano. Nanotechnologia staje się więc ciekawą alternatywą w branży kosmetycznej i farmaceutycznej. Nanocząstki, czyli struktury nie większe niż 100 nm są chętnie wykorzystywane w kompozycjach leczniczych. W ostatnich latach w preparatach dermatologicznych zaczęto stosować nanocząstki metali, ze względu na ich specyficzne właściwości.

Nanocząstki metali wykazują działanie przeciwbakteryjne, przeciwgrzybicze oraz przeciwzapalne. Stanowią doskonały filtr przeciwsłoneczny oraz mogą być stosowane w terapii celowanej i przeciwnowotworowej. Nanocząstki cynku znalazły zastosowanie w preparatach do opalania zawierających filtry UV. Swoją popularność zawdzięczają wysokiej trwałości oraz klarownej, bezbarwnej konsystencji [2]. Rox Anderson przedstawił środek zawierający nanocząstki wapnia, będący skutecznym preparatem w terapii kontaktowego zapalenia skóry wywołanego niklem [3]. Właściwości przeciwgrzybicze nanocząstek srebra są wykorzystywane m.in. w środkach biostabilizujących materiały codziennego użytku, takie jak obuwie czy tkaniny [4]. Dużym problemem współczesnej dermatologii jest leczenie infekcji bakteryjnych ze względu na narastającą antybiotykooporność bakterii [5, 6]. Preparaty przeciwbakteryjne stosowane są również w profilaktyce zakażeń skórnych u pacjentów z ranami oparzeniowymi, zespołem Stevensa Johnsona czy też toksyczną nekrolizą naskórka. Trwają badania naukowe nad preparatami przeciwdrobnoustrojowymi zawierającymi nanocząstki srebra i cynku, które mogą być stosowane w leczeniu i profilaktyce zakażeń bakteryjnych [7].

W związku z powyższym coraz intensywniej poszukuje się nowszych metod leczenia chorób skóry. Na rynku pojawiają się innowacyjne leki dermatologiczne i preparaty kosmetyczne, zawierające w swoim składzie wiele substancji aktywnych o różnej budowie chemicznej oraz wielkości cząsteczek.

2. Nanotechnologia

Nanotechnologia jest jedną z najszybciej rozwijających się dziedzin nauki, która znajduje zastosowanie w przemyśle, medycynie czy farmakologii [8]. Termin ten dotyczy wszystkich technik i metod tworzenia struktur w rozmiarach nano, czyli tych o wymiarach 10^{-9} m. Są to wielkości odpowiadające rozmiarowi pojedynczych atomów i cząsteczek [9] (Rys. 1).



Rys. 1. Skala porównawcza wielkości nanocząstek do obiektów w skali makro [10]

Osiągnięcie tak małych rozmiarów umożliwia uzyskanie nowych wyjątkowych właściwości – m.in. większą szybkość i efektywność działania. Interdyscyplinarne podejście eksperymentalne wiąże się bezpośrednio ze zrozumieniem i doskonaleniem właściwości materii w skali nano [11]. Stwarza to możliwość pozyskania nowych urządzeń czy leków o niespotykanych dotąd możliwościach [12, 13].

2.1. Początki nanotechnologii

Terminu „nanotechnologia” po raz pierwszy użyto w połowie lat osiemdziesiątych XX wieku. Zaprezentowany został przez Erica Drexlera w jego książce *Engines of Creation*, jako pojęcie obejmujące wszelkie dą-

żenia do stworzenia nowych przedmiotów, prowadzone na poziomie atomów i molekuł [14]. Wizję tę przedstawił w połowie lat pięćdziesiątych XX w. amerykański fizyk, laureat Nagrody Nobla, Richard P. Feynman podczas swojego przemówienia wygłoszonego na corocznym zjeździe Amerykańskiego Towarzystwa Fizycznego. Przemówienie zatytułowane *There's plenty of room at the bottom* (Dużo zmieści się u podstaw) przedstawiało pierworys miniaturyzacji dotychczasowych dokonań świata nauki oraz obrazowało możliwości technologii opracowanej na poziomie atomów [12, 13]. Mimo iż wizja fizyka nie spotkała się z entuzjastycznymi opiniami świata nauki, dzięki zebranych przez niego funduszom już w 1960 r. powstał pierwszy silnik o boku nie większym niż 1/64 cala, a kilkanaście lat później zmniejszono książkę do rozmiaru w skali 1/25 000. Zdarzenia te zapoczątkowały prawdziwą dynamizację w dziedzinie nanotechnologii; przypadła ona na lata 80. i 90. XX wieku. Dokonał się wtedy rozwój technik litograficznych, produkcji ultracienkich warstw kryształów z wykorzystaniem technologii MOCVD i MBE. Odkryto również fulereny i nanorurki oraz tworzyły się studnie kwantowe, druty kwantowe i kropki kwantowe [13, 15].

Obecnie nanotechnologię można określić mianem „technologii nowych możliwości”. Jest ona podstawą rozwoju innych technologii. W Japonii została objęta patronatem w ramach projektu ERATO, czyli programem badań wyprzedzających. Projekt ten finansuje nauki mogące mieć w przyszłości kluczowe znaczenie technologiczne. Rząd Wielkiej Brytanii uznał nanotechnologię jako jedną z najważniejszych dziedzin rozwoju, wpisując ją do programu LINK, wspierającego współpracę nauki z przemysłem [16].

2.2. Nanotechnologia, nanomateriały, nanocząstki

Ze względu na szeroki zakres zainteresowań i możliwości nanotechnologii, bez trudu można wymienić jej zastosowanie we współczesnej technice, m.in. w precyzyjnej mechanice, optyce czy elektronice. Również żywe organizmy wykorzystują nanotechnologię [16]. Wiele struktur komórkowych jest kontrolowanych na poziomie pojedynczych cząsteczek [17]. W medycynie, farmakologii czy biotechnologii najwięcej zastosowań znalazły nanomateriały [13, 15].

Według przyjętej w 2011 r. przez Unię Europejską definicji, nanomateriały to „naturalne, przypadkowe lub wyprodukowane materiały zawierające cząstki w stanie swobodnym lub ich agregaty bądź aglomeraty o wymiarach od 1 nm do 100 nm” [18]. Szybki rozwój nanotechnologii

wości struktur w skali nano, tj. duży stosunek powierzchni do rozmiarów, przyczynia się do zwiększenia zdolności blokowania nadfioletu [28]. Na skutek właściwości łatwego przenikania przez błony biologiczne i bariery ustrojowe, a także zdolności do selektywnego transportu nanocząstek w głąb organizmu, cząstki w skali nano znalazły zastosowanie w terapii celowanej wielu nowotworów [29, 30, 31].

Ze względu na budowę, wśród nanomateriałów stosowanych w dermatologii i kosmetologii można wyróżnić:

- nanosfery – czyli małe (ok. 100 nm) polimeryczne systemy matrycowe zbudowane z nieruchomego środka o porowatej, przerywanej strukturze, na którym adsorbowane są substancje aktywne, takie jak aminokwasy, składniki mineralne, wyciągi roślinne czy substancje organiczne. Substancje te ulegają rozproszeniu w kontakcie z polimerem, przystosowanym do substancji hydrofilowych. Jako materiałów polimeryzacyjnych używa się najczęściej polialkilocyjanookrylanu i jego pochodnych. Nanosfery przedłużają trwałość związków aktywnych, zwiększają ich biokompatybilność i poprawiają właściwości sensoryczne specyfiku [20, 23, 32];
- nanokapsuły – czyli struktury zdolne do zamknięcia substancji aktywnej wewnątrz swojej struktury, a następnie w pożądanym momencie mogące uwolnić przechowywane substancje [33]. Są to swego rodzaju nanonośniki przenikania substancji aktywnych w głąb skóry. Substancje aktywne zawarte w nanokapsułach to zazwyczaj lipidowe mieszaniny, układy dyspersyjne o lipofilowym charakterze. Osłonkę natomiast stanowi biopolimer o płynnym lub żelowym wnętrzu [34]. Zaletą zastosowania nanokapsuł jest możliwość dostarczenia związku w odpowiednie miejsce oraz kontrola jego uwalniania. Jest to ważne ze względu na malejącą efektywność leku czy kosmetyku spowodowaną zbyt dużą liczbą związków biologicznie czynnych występujących na powierzchni skóry. Kolejną zaletą użycia tego nanomateriału jest ochrona substancji czynnej przed szkodliwymi czynnikami zewnętrznymi (wilgotność, tlen) [35]. Nanokapsuły wykorzystuje się powszechnie w kosmetologii oraz farmakologii [36]. Mają one zastosowanie jako tzw. smart drugs – inteligentne lekarstwa – wyposażone w specyficzne receptory chemiczne [37];
- nanoemulsje – jednorodne, klarowne układy wodno-olejowe otrzymywane na bazie związków powierzchniowo czynnych, często naturalnych. Stopień rozdrobnienia fazy wewnętrznej jest większy, średnica cząsteczek nie przekracza 100 nm. Dodatkowo rozdrobnienie układu zdyspergowanego jest większe, zbliżone do występujące-

go w koloidach. Daje to efekt przezroczystości – brak dyfrakcji światła przenikającego przez układ. Nanoemulsje cechuje stabilność termiczna, brak sedymentacji i śmietanowania, homogeniczność, duża zdolność solubilizacji, duża płynność i mała lepkość [36]. Stosunkowo łatwo wprowadzić do nich substancje biologicznie czynne. Zabieg taki jest korzystny ze względu na większą skuteczność składników znajdujących się w nanoemulsjach. Wskutek swoich właściwości znalazły one zastosowanie w produktach przeciwdziałających starzeniu się skóry. Niestety nanoemulsje łatwo przenikają do głębszych warstw skóry (skóry właściwej lub tkanki podskórnej), gdzie następuje gromadzenie się substancji czynnych, doprowadzając do osiągnięcia szkodliwych stężeń [38, 39, 40].

Kolejnym nanomateriałem wykorzystywanym w farmakologii i farmakoterapii są nanonośniki (niosomy). Na rynku pojawiły się już w latach 80. XX wieku. Posiadają strukturę zbliżoną do liposomów, jednak zbudowane są z syntetycznych, niejonowych substancji powierzchniowo czynnych. Wyposażone są również w chemiczne, specyficzne receptory, wskutek czego mogą docierać do dowolnie wybranych miejsc organizmu [41]. Podnosi to skuteczność stosowanej substancji [42]. Powszechnie używa się ich w kremach nawilżających, preparatach odżywczych czy kremach do opalania, w których rolę substancji aktywnej przenoszonych na nanonośniku pełnią m.in. kwas hialuronowy, antyoksydanty czy różnego rodzaju peptydy [43].

Nowym zastosowaniem nanometali służyła się opracowana przez Macieja Pike-Bugińskiego metoda otrzymywania nanokoloidów, polegająca na rozproszeniu nanocząstek metalu w wodzie demineralizowanej. Wielkość nanocząstek wchodzących w skład mieszaniny waha się od 1,5 do 5 nm, a stężenie roztworu wynosi ok. 10 ppm [44]. Tak powstałe nanokoloidy są mieszaniną fazy amorficznej i krystalicznej. Definiuje się je jako substancje niejonowe, ze względu na silnie zdyspergowaną fazę metaliczną bez grup anionowych oraz brak ładunku dodatniego metalu. Cechują się one dobrym przewodnictwem elektrycznym (ze względu na tunelowy efekt przewodzenia), małymi odległościami między cząsteczkami i dużą powierzchnią czynną [20, 23]. Na skutek ruchów Browna, w czasie których nanocząstki uzyskują niewielkie ładunki dodatnie i zaczynają odpychać się od siebie, z łatwością mogą one wnikać do wnętrza komórek zarówno eukariotycznych, jak i prokariotycznych [45, 46]. Nie są to jednak ładunki jonowe, w związku z czym takie nanocząstki nie wchodzi w reakcje z obecnymi w ich otoczeniu jonami. Zaletą takich koloidów jest również brak zanieczyszczeń powierzchniowych [47].

Najpopularniejszym nanomateriałem wciąż jednak pozostają nanocząstki metali. Przyjmuje się, że im mniejsza nanocząstka, tym silniejsze właściwości posiada. Przykładowo im mniejsze nanocząstki srebra, tym większa jest ich aktywność biobójcza [48].

3.1. Nanocząstki jako filtry UV

Jednym z najpopularniejszych i najczęściej spotykanych czynników wpływających na wygląd i stan skóry jest promieniowanie UV. Skutki ekspozycji na promienie słoneczne mogą być bardzo różne, poczynając od zaczerwienienia i pojawienia się opalenizny (naturalnych mechanizmów obronnych organizmu), przechodząc do bardziej niebezpiecznych, takich jak fotostarzenie się skóry czy wystąpienie nowotworów skóry [49]. Ponadto spotykane są reakcje nadwrażliwości na światło słoneczne w postaci ostrej reakcji fototoksycznej z wykwitami pęcherzowo-rumieniowymi [50]. Dlatego też kosmetyki ochronne odgrywają ważną rolę w profilaktyce chorób skóry. Kluczowym składnikiem takich preparatów są filtry UV [51, 52]. Jedną z substancji wykazującą cechy kluczowe dla filtrów UV są nanocząstki ditlenku tytanu (TiO_2NPs). Charakteryzują się one dużą stabilnością w obecności promieniowania UV, a także właściwościami absorpcyjnymi promieniowania o długości 365 nm (długość odpowiadająca promieniowaniu UVA). Z przeprowadzonych dotychczas badań wynika, że TiO_2NPs absorbują również promieniowanie w zakresie od 200 do 400 nm [53]. Można więc wnioskować, że dodanie tych nanocząstek do kremu spowoduje nadanie mu właściwości ochronnych zarówno przed promieniowaniem UVA (320–400 nm), jak i UVB (280–320 nm). Ponadto TiO_2NPs nie działa drażniąco na skórę oraz ma właściwości antyalergiczne. Nie zaobserwowano również niebezpiecznego przenikania TiO_2NPs przez skórę. Badane nanocząstki gromadziły się zazwyczaj w warstwie rogowej naskórka [54, 55, 56].

Również nanocząstki tlenku cynku (ZnONPs) mogą być z powodzeniem stosowane jako filtry w kremach przeciwsłonecznych. Podobnie jak TiO_2NPs , nanocząstki tlenku cynku pochłaniają promieniowanie słoneczne o długości fali do 380 nm, czyli promieniowanie UVA. Swoją popularność zawdzięczają jednak wysokiej trwałości oraz temu, że nie pozostawiają białych śladów na skórze [2, 57]. Oba związki chronią skórę również wskutek swoich właściwości fizycznych. Tworzą one na skórze aglomeraty działające jak mikrolustra odbijające szkodliwe promieniowanie [58].

3.2. Nanocząstki w terapii kontaktowego zapalenia skóry

Kontaktowe zapalenie skóry jest chorobą wywołaną nadwrażliwością na określoną substancję. Reakcja alergiczna powstaje na skutek bezpośredniego miejscowego kontaktu skóry z alergenem. Do czynników najczęściej wywołujących to schorzenie zaliczamy przede wszystkim chrom, nikiel, kobalt, formaldehyd czy terpentynę [59]. Niedawno odkryto, że niektóre nanocząstki metali mogą skutecznie hamować negatywne skutki kontaktu alergenu ze skórą lub nawet blokować go całkowicie. Amerykański zespół badawczy przedstawił wyniki potwierdzające, iż preparat zawierający nanocząstki wapnia jest skutecznym lekiem w terapii kontaktowego zapalenia skóry wywołanego niklem. Nanocząstki oplaszczają jony niklu, chroniąc skórę przed kontaktem z alergenem. Jest to istotne odkrycie, ponieważ ok. 10% populacji amerykańskiej wykazuje nadwrażliwość na nikiel [3].

3.3. Przeciwrzybicze właściwości nanocząstek

Grzybice, inaczej mikozyzy, diagnozowane są obecnie u 15–30% populacji [60, 61]. Najczęściej występuje grzybica stóp i paznokci. W niektórych grupach społecznych (np. sportowcy, górnicy) zachorowalność sięga nawet 70% [62]. Są to choroby silnie zakaźne, wywoływane przez ok. 2000 gatunków grzybów [60]. W związku z dużą powszechnością schorzeń grzybiczych zalicza się je do grupy chorób cywilizacyjnych. Jedną z przyczyn zwiększonego ich występowania są powszechnie stosowane antybiotykoterapie oraz leki immunosupresyjne, obniżające odporność organizmu [61]. Zwiększona zapadalność na grzybicę stymuluje rozwój badań nad środkami o działaniu grzybobójczym, które mogłyby być stosowane w profilaktyce choroby. Nanocząstki metali są jednymi z substancji spełniających takie oczekiwania. Właściwości przeciwrzybicze wykazują nanocząstki miedzi (CuNPs) i srebra (AgNPs).

Już w średniowieczu używano miedzi w celu utrzymania higieny osobistej. W związku z tym podjęto badania nad przeciwrzybiczym zastosowaniem miedzi w rozmiarach nano. Wykazano, że wskutek wprowadzenia nanocząstek miedzi do materiałów syntetycznych używanych w medycynie zahamowany został rozwój mikroorganizmów na tych tworzywach [63, 64, 65].

Usman i wsp. wykazali aktywność przeciwrzybiczą nanocząstek miedzi. W swoich badaniach określili wpływ CuNPs na wzrost mikroorganizmów, również opornych na metycylinę *Staphylococcus aureus*,

Bacillus subtilis, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella choleraesuis* i *Candida albicans* [66]. Na skutek przeprowadzonych badań CuNPs są obecnie wykorzystywane jako dodatki do tkanin.

W swoich badaniach Monteiro i wsp. wykazali aktywność przeciwgrzybiczną AgNPs w odniesieniu do grzybów *Candida albicans* i *Candida glabrata* [67]. Udowodniono również że dodanie nanosrebra do żywic akrylowych zmniejsza zdolność adherencji grzybów do stosowanego materiału. Nie wykazano tutaj działania cytotoksycznego i genotoksycznego AgNPs [68, 69]. Ponadto relatywnie niska cena oraz duża efektywność biobójcza AgNPs spowodowały, że nanosrebro stosowane jest obecnie na szeroką skalę w przedmiotach codziennego użytku [20]. Właściwości przeciwgrzybicze nanocząstek srebra są również wykorzystywane w środkach biostabilizujących materiały obuwnicze, chroniąc stopy przed zakażeniem grzybiczym [70].

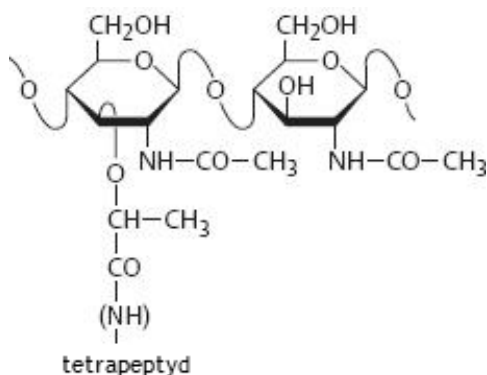
3.4. Właściwości przeciwbakteryjne nanocząstek

Nanocząstki srebra również znalazły zastosowanie w wielu dziedzinach medycyny. Od dawna bowiem znane są przeciwdrobnoustrojowe właściwości srebra. Jednym z problemów współczesnej dermatologii są zakażenia bakteryjne, które najczęściej wywoływane są przez paciorkowce i gronkowce. Gronkowiec złocisty jest czynnikiem etiologicznym m.in. zapalenia mieszków włosowych, czyrączności czy liszajca zakaźnego [7]. Poza gronkowcowymi chorobami skóry obecność *S. aureus* stwierdza się na skórze chorych z atopowym zapaleniem skóry (AZS). Bakteryjne choroby skóry są coraz trudniejsze do wyleczenia z powodu narastającej antybiotykooporności bakterii. Selekcjonowane są szczepy odporne na konwencjonalne antybiotyki, co skutkuje koniecznością szukania alternatywnych metod leczenia. W związku z tym poszukuje się coraz nowszych metod leczenia chorób skóry. Obecnie prowadzone są zaawansowane badania nad zastosowaniem nanocząstek, m.in. srebra i cynku, jako substancji bakteriobójczej w środkach dermatologicznych [6, 71]. Przeprowadzone badania wykazały bakteriobójcze działanie nanocząstek srebra w postaci roztworu koloidalnego w stosunku do szczepów: *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sanguis* i *Streptococcus mitis* [45]. Stwierdzono również silniejsze właściwości hamujące rozwój bakterii *S. mutans* i *S. sanguis* po zastosowaniu nanocząstek ditlenku tytanu. Również nanocząstki tlenku cynku wykazywały właściwości hamujące wzrost powyższych szczepów [72].

3.4.1. Mechanizm aktywności przeciwbakteryjnej nanocząstek

Mechanizm aktywności przeciwbakteryjnej nanocząstek nie został jeszcze do końca wyjaśniony [73]. Wiadomo, że nanosrebro oddziałuje na pojedyncze komórki [23]. Przeprowadzone w ostatnich latach badania pozwoliły stwierdzić, że nanometal w reakcji z grupą tiolową ($-SH$) łączy się z białkiem – mureiną, która buduje ścianę komórkową mikroorganizmu. Proces ten prowadzi do dezaktywacji komórki bakteryjnej [65].

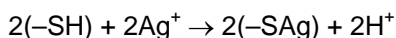
Mureina jest peptydoglikanem (Rys. 2), biopolimerem kwasu muraminowego i N-acetyloglukozaminy oraz tripeptydem zbudowanym z D-alaniny, kwasu D-glutaminowego i kwasu mezodwuaminopimelinowego. Częsteczka mureiny zbudowana jest z łańcuchów polisacharydowych połączonych mostkami peptydowymi. Łańcuchy te zbudowane są z disacharydów utworzonych z N-acetyloglukozaminy i kwasu N-acetylmuraminowego połączonych wiązaniem β -1,4-glikozydowym. Częsteczki kwasu N-acetylmuraminowego łączy się mostkiem peptydowym z tetrapeptydem. Od liczby mostków peptydowych zależy usieciwienie polimeru, a co za tym idzie sztywność ściany komórkowej. Lepsze usieciwienie wykazują bakterie Gram(+) w stosunku do bakterii Gram(-) [74].



Rys. 2. Struktura mureiny (peptydoglikanu) [75]

W skład ściany komórkowej wchodzi również aminokwasy, m.in. cysteina i metionina, które posiadają grupy $-SH$ w łańcuchu bocznym. Cechą charakterystyczną atomowego srebra jest zdolność pochłaniania tlenu oraz katalizy procesu utleniania. Zaabsorbowany na powierzchni nanosrebra tlen reaguje z grupami tiolowymi ściany komórkowej bakterii, powodując utworzenie wiązań między dwoma siarkami. Degradowane

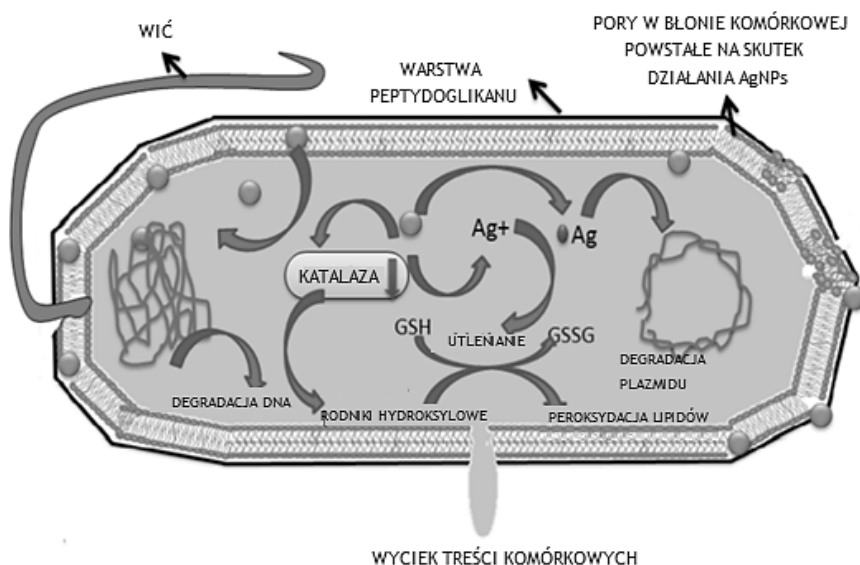
są w ten sposób, ułożone w poprzek błony komórkowej, drogi przenoszenia elektronów, tzw. łańcuch oddechowcy bakterii, co powoduje jej obumieranie [23] (Rys. 3).



Rys. 3. Reakcja nanosrebra z grupami tiolowymi aminokwasu [76]

W reakcji nanosrebra z grupami tiolowymi produktem ubocznym są dwa rodniki. Ponieważ posiadają one właściwości redukujące, w ich obecności dochodzi do zniszczenia struktur trzeciorzędowych, zaniku aktywności białek i ich denaturacji [23, 77].

Bakterie posiadające zdegradowaną ścianę komórkową lub nie posiadającą jej wcale (np. w wyniku działania AgNPs) pochłaniają AgNPs ze swojego otoczenia. Dowiedzono, że bakteria *Pseudomonas aeruginosa* pochłania 12% AgNPs. Katalityczne właściwości AgNPs powodują utlenienie materiału genetycznego komórki. Wykazano również, że AgNPs wiążą się z DNA komórki bakteryjnej, nie uszkadzając przy tym wiązań wodorowych, zapobiegając tym samym rozwijaniu DNA, a co za tym idzie rozmnażaniu bakterii. Nadal nie poznano jednak mechanizmu tego procesu [23] (Rys. 4).



Rys. 4. Mechanizm działania antybakteryjnego AgNPs wobec *E. coli* [78]

Co ważne, ściana komórkowa komórek eukariotycznych nie jest zbudowana z peptydoglikanów, przez co jest odporna na przedstawiony powyżej mechanizm niszczenia tej struktury [20].

3.5. Wykorzystanie nanocząstek w terapii celowanej

Terapia celowana jest nową strategią leczenia chorób nowotworowych. Opiera się ona na stosowaniu „inteligentnych” leków, specyficznie modulujących białka szlaku rozwoju nowotworu. Rozwój tej metody leczenia jest możliwy na skutek prowadzenia badań nad molekularnymi mechanizmami proliferacji komórek nowotworowych. Leki celowane cechują się większą specyficznością i zmniejszeniem efektów ubocznych terapii [79].

Substancjami spełniającymi podstawowe wymogi terapii celowanej, tj. rozpoznawanie i specyficzne atakowanie komórek nowotworowych, nieznaczny wpływ na zdrowe, nietransformowane komórki oraz dotarcie w odpowiednie miejsce organizmu, są nanocząstki metali. W związku z powyższym skupiają one na sobie uwagę naukowców z całego świata i stały się szczególnie ważne w badaniach nad diagnostyką i leczeniem nowotworów. Zaletami nanocząstek metali są również stosunkowo łatwa synteza, możliwość modyfikacji powierzchni, możliwość dostosowania kształtu i wielkości do potrzeb, biokompatybilność oraz duża powierzchnia w stosunku do rozmiaru [80, 81]. Ponadto NPs mogą poprawiać rozpuszczalność słabo rozpuszczalnych w wodzie leków, wydłużać okres półtrwania leku poprzez zmniejszenie immunogenności oraz zmniejszać metabolizm leków. Zastosowanie nanocząstek w terapii celowanej wiąże się ze skróceniem czasu leczenia i hospitalizacji. Lek, którym powleczona jest zazwyczaj nanocząstka, ma szansę dotrzeć w odpowiednie miejsce w niezmiennym stężeniu.

W związku z powyższym jako nośniki substancji przeciwnowotworowych stosuje się stałe nanocząstki lipidowe, nanosfery polimerowe, nanorurki węglowe oraz nanocząstki tlenku żelaza i złota. Obecnie prowadzone są badania nad zmniejszeniem cytotoksyczności terapii nowotworów skóry, poprzez podanie leków cytostatycznych za pomocą nanocząstek oraz dostarczenie ich w odpowiednie miejsce. Dowiedziono, że AuNPs o kształcie gwiazdzistym mogą dostarczać chemioterapeutyki prosto do jądra komórki nowotworowej, dążąc do jej zniszczenia. Jest to możliwe ze względu na bardzo dużą powierzchnię czynną nanocząstek, umożliwiającą jednorazowe podanie dużej dawki leku. Prowadzi się również badania nad zastosowaniem terapii celowanej wykorzystującej nanocząstki metali

jako nośniki powszechnie stosowanych chemioterapeutyków w leczeniu czerniaka złośliwego [82].

Od pewnego czasu w diagnostyce nowotworów skóry stosuje się nanocząstki tlenku żelaza. Nanomateriały, w tym nanocząstki, zaczyna się wykorzystywać jako dodatki do kontrastów lub substancje stosowane do znakowania molekularnego [83]. Mimo małych rozmiarów wytwarzają one duży jednostkowy kontrast, przez co można zmniejszyć ilość podawanej substancji, a tym samym jej toksyczność [84].

4. Perspektywy

Wraz z rozwojem medycyny i nauk farmaceutycznych na rynku pojawia się coraz więcej preparatów dermoaktywnych. Spowodowane jest to koniecznością pozyskiwania nowych substancji, które w przyszłości mogą zastąpić stare niedoskonałe lub nieskuteczne odpowiedniki. Ponadto niektóre mikroorganizmy, będące przyczyną powstawania zmian skórnych, uodporniają się na powszechnie stosowane substancje, np. antybiotyki, w związku z czym konieczne jest opracowywanie nowych metod ich zwalczania. Ocenia się, że nanomateriały w niedługim czasie zajmą kluczową pozycję w dezynfekcji, farmacji, medycynie oraz przemyśle spożywczym.

Do największych dotychczasowych osiągnięć nanotechnologii można zaliczyć zmianę farmakodynamiki i farmakokinetyki leków, rozwój analityki instrumentalnej, obrazowania molekularnego, identyfikację specyficznych biomarkerów chorób czy miniaturyzację sprzętu [85].

Prawdziwy rozkwit zastosowania nanotechnologii w medycynie odnotowuje się w celowanej terapii przeciwnowotworowej z zastosowaniem nanocząstek jako nośników substancji aktywnych. Liczne badania o szerokiej tematyce przyczyniają się do rozpowszechnienia i wzmocnienia celowanej dystrybucji narządowej i wyeliminowania pobierania leku przez komórki, które nie są docelowe. Terapię celowaną z wykorzystaniem NPs stosuje się już w terapii czerniaka skóry, trwają natomiast badania nad zastosowaniem tej metody w leczeniu innych nowotworów skóry [86]. Nanotechnologia rozwija się również w kierunku opracowania spersonalizowanej terapii antynowotworowej. Chodzi tu o terapię celowaną, w której do dostarczania leków używane będą „inteligentne” urządzenia o właściwościach teranostycznych. Teranostyka jest połączeniem terapii i diagnostyki na poziomie molekularnym. Jest to o tyle istotne, że wskutek pracy nad zwiększeniem skuteczności diagnostyki nowotworów, możemy przyczynić się do łatwiejszego ich wyleczenia.

Mimo iż nanomateriały mogą poprawić biodostępność leku i rozszerzyć zastosowanie terapeutyczne znanych już leków, istnieje niebezpieczeństwo, że będą one stwarzać zagrożenie dla ludzi [85]. Ostatnio ukazuje się coraz więcej doniesień na temat szkodliwego wpływu nanocząstek na organizm człowieka. Mówi się o przenikaniu nanostruktur poprzez drogi oddechowe wprost do komórek, z których nie mogą być w pełni usunięte. W literaturze pojawiły się dotychczas doniesienia na temat szkodliwego wpływu nanocząstek tytanu, kobaltu, żelaza, wolframu czy nawet srebra. Istotne jest więc kontynuowanie badań z zakresu toksyczności nanocząstek oraz zidentyfikowanie ich niepożądanych właściwości. Dalsze działania prewencyjne mogą prowadzić do opracowania metod diagnostyki szkodliwego wpływu nanomateriałów oraz uregulowań prawnych odnoszących się do narażania na kontakt z substancjami potencjalnie niebezpiecznymi [87, 88]. Największe wyzwania dla rozwoju nanotechnologii stanowią obecnie: niewystarczająca wiedza w zakresie nanotechnologii, problemy związane z regulacjami prawnymi oraz nadzór nad bezpieczeństwem farmakoterapii. W związku z tym konieczne jest prowadzenie badań, które w przyszłości udzielą odpowiedzi na pytania dotyczące molekularnych mechanizmów działania nanostruktur [89].

Podsumowując, rozwój nanotechnologii stwarza nowe możliwości jej wykorzystania w wielu dziedzinach medycyny. Możliwe stało się wprowadzenie nowych metod leczenia zakażeń i chorób skóry, m.in. technik genowych. W celu poprawy biokompatybilności i biodystrybucji niektórych preparatów modyfikuje się istniejące substancje do skali nano. Stwarza to ogromne możliwości poszukiwania i powstawania nowych skutecznych preparatów kosmetycznych i leków dermatologicznych [90].

Literatura

- [1] Baranowska A., Krajewska-Kula E., Szyszko-Perłowska A., Bielemuk A., Jankowiak B., Rozwadowska E. (2011) Problem jakości życia w dermatologii, *Probl. Pielęgniarstwa* 19(1), 109–115.
- [2] Leite-Silva V.R., Le Lamer M., Sanchez W.Y., Liu D.C., Sanchez W.H., Morrow I., Martin D., Silva H.D.T., Prow T.W., Grice J.E., M.S. Roberts (2013) The effect of formulation on the penetration of coated and uncoated zinc oxide nanoparticles into the viable epidermis of human skin *in vivo*, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 84(2), 297–308.
- [3] Vemula P.K., Anderson R.R., Karp J.M. (2011) Nanoparticles reduce nickel allergy by capturing metal ions, *Nat. Nanotechnol.* 6(5), 291–295.
- [4] Falkiewicz-Dulik M., Macura A. (2008). Nanosrebro jako substancja biostabilizująca materiały obuwnicze w profilaktyce grzybiczy stóp, *Mikologia* 15, 145–150.

- [5] Velázquez-Velázquez J.L., Santos-Flores A., Araujo-Meléndez J., Sánchez-Sánchez R., Velasquillo C., González C., Martínez-Castañón G., Martínez-Gutierrez F. (2014) Anti-biofilm and cytotoxicity activity of impregnated dressings with silver nanoparticles, *Mater Sci. Engine.* 49, 604–611.
- [6] Guerreiro-Tanomaru J.M., Trindade-Junior A., Cesar Costa B., da Silva G.F., Drullis Cifali L., Basso Bernardi M.I., Tanomaru-Filho M. (2014) Effect of zirconium oxide and zinc oxide nanoparticles on physicochemical properties and antibiofilm activity of a calcium silicate-based material, *Sci. World J.* 2014, 1–6.
- [7] Dzierżanowska D. (2009) *Antybiotykoterapia praktyczna*, Alfa Medica Press, Bielsko-Biała.
- [8] Kelsall R., Hamley I., Geoghergan M. (2008) *Nanotechnologie*, Wyd. Nauk. PWN, Warszawa.
- [9] Kohler M., Fritzsche W. (2007) Nanotechnology, an introduction to nanostructuring techniques, *Gen. Introd. Chem. Engine.* 42, 125–158, <<http://onlinelibrary.wiley.com/book/10.1002/9783527612369>>.
- [10] Bujak-Piartek S. (2013) Nanocząstki i nanomateriały – charakterystyka, możliwości zastosowania oraz potencjalne zagrożenia dla zdrowia, 20.08.2015, <http://lodz.pip.gov.pl/pl/ff/v/93622/07_Nanocząsteczki_i_nanomateriały_charakterystyka.pdf>.
- [11] Schulenburg M. (2007) *Nanotechnologia – innowacje dla świata przyszłości*, EUR 21152PL.
- [12] Regis E. (red.) (2001) *Nanotechnologia, narodziny nowej nauki, czyli świat cząsteczka po cząsteczce*, Prószyński, Warszawa.
- [13] Jung A. (2014) Nanocząstki w zastosowaniach medycznych – kierunek przyszłości?, *Pediatr. Med. Rodz.* 10(2), 104–110
- [14] Drexler K.E. (1986) *Engines of Creation. The Coming Era of Nanotechnology*, Anchor Book, Nowy Jork.
- [15] Mazurkiewicz A. (2007) *Nanonauki i nanotechnologie – stan i perspektywy rozwoju*, Instytut Techn., Radom.
- [16] Dręzewski B., Herman A., Wroczyński P. (1997) *Nanotechnologia. Stan obecny i perspektywy*, Gdańsk, 3–60.
- [17] Boisseau P., Houdy P. (2007) *Nanoscience, Nanobiotechnology and Nanobiology*, Springer-V., Heidelberg.
- [18] European Commission (2015) 20.08.2015, <http://ec.europa.eu/environment/chemicals/nanotech/faq/definition_en.htm>.
- [19] European Commission (2015) Definition of a nanomaterial, 13.08.2015, <http://ec.europa.eu/environment/chemicals/nanotech/faq/definition_en.htm>.
- [20] Schroeder G. (2010). *Nanotechnologia, kosmetyki, chemia supramolekularna*, 20.08.2015, <http://www.supra.amu.edu.pl/files/monographs/nanotechnologia_kosmetyki_chemia_supramolekularna.pdf>.
- [21] Roduner E. (2006) *Nanosopic Materials, Size-dependent Phenomena*, Royal Soc. Chem., Th. Graham House, Cambridge.
- [22] Kaszukur Z. (2006) Nanocząstki metali pod lupą, *Academia* 1(5), 32–33.
- [23] Szlecht A., Schroeder G. (2010). Zastosowanie nanotechnologii w kosmetologii, w: *Nanotechnologia, kosmetyki, chemia supramolekularna, Cursiva* 1, 7–33.
- [24] López-Serrano A., Riansares A., Muñoz O., Sanz Landaluza J., Cámara C. (2014) Nanoparticles: a global vision. Characterization, separation, and quantification methods. Potential environmental and health impact, *Anal. Methods* 6, 38–56.

- [25] Tripathi R.M., Gupta R.K., Bhadwal A.S., Singh P., Shrivastav A. (2015) Fungal biomolecules assisted biosynthesis of Au-Ag alloy nanoparticles and evaluation of their catalytic property, *IET Nanobiotechnol.* 9(4), 178–183.
- [26] Xu Z., Mahalingam S., Rohn J.L., Ren G., Edirisinghe M. (2015) Physio-chemical and antibacterial characteristics of pressure spun nylon nanofibres embedded with functional silver nanoparticles, *Mater. Sci. Eng. C* 56, 195–204.
- [27] Sheng Z., Liu Y. (2011) Effects of silver nanoparticles on wastewater biofilms, *Water Res.* 45(18), 6039–6050.
- [28] Morabito K., Shapley N.C., Steeley K.G., Tripathi A. (2011) Review of sunscreen and the emergence of non-conventional absorbers and their applications in ultraviolet protection, *Int. J. Cosmet. Sci.* 33(5), 385–390.
- [29] Brannon-Peppas L., Blanchette J.O. (2012) Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64, 206–212.
- [30] Cho K., Wang X., Nie S., Chen Z., Shin D.M. (2008) Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer, *Clin. Cancer Res.* 14(5), 1310–1316.
- [31] Kukowska-Latallo J.F. (2005) Nanoparticle Targeting of Anticancer Drug Improves Therapeutic Response in Animal Model of Human Epithelial Cancer, *Cancer Res.* 65(12), 5317–5324.
- [32] Martini M.-C. (2007) *Kosmetologia i farmakologia skóry*, Wyd. PZWL, Warszawa.
- [33] Saito Y. (1995) Nanoparticles and filled nanocapsules, *Carbon NY* 33, 979–988.
- [34] Damgé J.D., Michel C., Aprahamian M., Couvreur P. (1990) Nanocapsules as carriers for oral peptide delivery, *J. Control. Release* 13(2–3), 233–239.
- [35] Wosicka H. (2009) Stałe nanocząstki lipidowe i nanostrukturalne nośniki lipidowe w nowoczesnych kosmetykach, *Pol. J. Cosmetol.* 12(1), 23–37.
- [36] Sikora M. (2007) Nanokosmetyki w natarciu, *Chem. Rev.* 7, 42–46.
- [37] Bartosiewicz D., Kozubek A. (2008) Liposomy w dermatologii i kosmetyce, *Lek w Polsce* 18(7), 85–92.
- [38] Thakkar H.P., Khunt A., Dhande R.D. (2015) Formulation and evaluation of Itracozazole nanoemulsion for enhanced oral bioavailability, *J. Microencapsul.* 4, 1–11.
- [39] Rodrigues K.L., Caputo L.R.G., Carvalho J.C.T., Evangelista J., Schneedorf J.M. (2005) Antimicrobial and healing activity of kefir and kefir extract, *Int. J. Antimicrob. Agents* 25(5), 404–408.
- [40] Singh J., Garg T., Rath G. (2015) Advances in nanotechnology-based carrier systems for targeted delivery of bioactive drug molecules with special emphasis on immunotherapy in drug resistant tuberculosis – a critical review, *Drug Deliv.* 12, 1–23.
- [41] Bakhtiari H. (2015) Niosomal carriers enhance oral bioavailability of carvedilol effects of bile salt-enriched vesicles and carrier surface charge, *Int. J. Nanomed.* 10, 4797–4813.
- [42] Vincent N., Devi D.R., Vedha H. (2014) Progress in psoriasis therapy via novel drug delivery systems, *Dermatol. Reports* 6, 14–18.
- [43] Desai P., Ram R., Patlolla M. (2010) Interaction of nanoparticles and cell-penetrating peptides with skin for transdermal drug delivery, *Mol. Membr. Biol.* 27(7), 247–259.
- [44] Wegner K., Walker B., Tsantilis S., Pratsinis S.E. (2002) Design of metal nanoparticle synthesis by vapor flow condensation, *Chem. Engine. Sci.* 57(10), 1753–1762.
- [45] Mielczarek A., Wojnarowicz J., Majkowski M., Tyski S. (2013) Ocena bakteriobójczej aktywności koloidalnego roztworu nanocząstek srebra w stosunku do bakterii próchnicotwórczych, *Med. Dośw. Mikrobiol.* 65, 197–206.

- [46] Singh R., Lillard J.W. (2009) Nanoparticle-based targeted drug delivery, *Exp. Mol. Pathol.* 86(3), 215–223.
- [47] Hafner A., Lovrić J., Lakoš G.P., Pepić I. (2014) Nanotherapeutics in the EU: an overview on current state and future directions, *Int. J. Nanomedicine* 9, 1005–1023.
- [48] Wolny-Koladka K., Malina D., Sobczak-Kupiec A., Wzorek Z. (2013) Synteza i charakterystyka fizykochemiczna nanocząstek srebra oraz ocena ich toksyczności w stosunku do grzybów z gatunku *Fusarium culmorum* izolowanych z pszenicy ozimej, *Polish J. Agron.* 69–74.
- [49] Bojarowicz H., Bartnikowska N. (2014) Kosmetyki ochrony przeciwsłonecznej. Część I. Filtry UV, *Probl. Hig. Epidemiol.* 95(3), 596–601.
- [50] Jabłońska S., Majewski S. (2005) *Choroby skóry i choroby przenoszone drogą płciową*, PZWL, Warszawa, 126–167.
- [51] Latha M.S., Martis J., Shobha V., Shinde R.S., Bangera S., Krishnankutty B., Kumar B. (2013) Sunscreening agents: A review, *J. Clin. Aesthet. Dermatol.* 6(1), 16–26.
- [52] Moyal D. (2012) Need for a well-balanced sunscreen to protect human skin from both ultraviolet A and ultraviolet B damage, *Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol.* 78(1), 24–30.
- [53] Lewartowska J., Gajdzicki B., Machnikowska-Kiereś E. (2006) Wpływ nanocząsteczkowego ditlenku tytanu otrzymanego metodą zol-żel na właściwości barierowe wyrobów włókienniczych, *Prace Inst. Elektrotech.* 228.
- [54] Świdwińska-Gajewska A.M., Czerczak S. (2014) Nanocząstki ditlenku tytanu – dopuszczalne poziomy narażenia zawodowego, *Med. Pracy* 65, 407–418.
- [55] Jacobs J.F., van de Poel I., Osseweijer P. (2010) Sunscreens with Titanium Dioxide (TiO₂) Nano-Particles: A Societal Experiment, *NanoEthics*, 4(2), 103–113.
- [56] Popov A., Zhao X., Zvyagin A., Lademann J., Roberts M., Sanchez W., Priezzhev A.V., Myllylä R. (2010) ZnO and TiO₂ particles: a study on nanosafety and photoprotection, *Biophot. Phot. Solut. Better Heal. Care II*, 77153G.
- [57] Lomonosov M.V., Vorobiovy G. (2005) Effect of size of TiO₂ nanoparticles embedded into stratum corneum on ultraviolet-A and ultraviolet-B sun-blocking properties of the skin, *J. Biom. Optics* 10(6), 064037.
- [58] Lu P.J., Cheng W.L., Huang S.C., Chen Y.P., Chou H.K. (2015) Characterizing titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles in sunscreen spray, *Int. J. Cosmet. Sci.* 6, 122–139.
- [59] Cohen P.R. (2014) Follicular contact dermatitis revisited: A review emphasizing neomycin-associated follicular contact dermatitis, *World J. Clin. Cases* 2(12), 815.
- [60] Zalewska-Janowska H.B.A. (2009) Grzybice skóry, w: *Choroby skóry*, Warszawa, 42.
- [61] Błaszczyk-Kostanecka H.W.M. (2009) Grzybice, w: *Dermatologia w praktyce*, Wyd. Lekarskie PZWL, Warszawa, 258–324.
- [62] Hryniewicz-Gwóźdź A., Plomer-Niezgoda E. (2005) Grzybica stóp, rąk i paznokci – epidemiologia, objawy, leczenie, *Mikol. Lek.* 1(12), 57–62.
- [63] Gabbay J., Borkow G., Mishal J., Magen E., Zatcoff R. (2006) Copper Oxide Impregnated Textiles with Potent Biocidal Activities, *J. Indust. Textil.* 35(4), 323–335.
- [64] Mary G., Bajpai S.K. (2009) Copper(II) Ions and Copper Nanoparticles-Loaded Chemically Modified Cotton Cellulose Fibres with Fair Antibacterial Properties, *J. Appl. Polym. Sci.* 113, 757–766.
- [65] Pulit J., Banach M., Kowalski Z. (2011) Właściwości nanocząsteczek miedzi, platyny, srebra, złota i palladu, *Czas. Tech.* 2(10), 202–203.

- [66] Usman M.S., El Zowalaty M.E., Shameli K., Zainuddin N., Salama M., Ibrahim N.A. (2013) Synthesis, characterization, and antimicrobial properties of copper nanoparticles, *Int. J. Nanomed.* 8, 4467–4479.
- [67] Monteiro D.R., Silva S., Negri M., Goru L.F., De Camargo E.R., Oliveira R., Henriques M. (2012) Silver nanoparticles: Influence of stabilizing agent and diameter on antifungal activity against *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms, *Lett. Appl. Microbiol.* 54(5), 383–391.
- [68] Wiatr E., Nowakowska D. (2013) Zastosowanie nanocząsteczek w materiałach stomatologicznych – przegląd piśmiennictwa, *Protet. Stomatol.* LXIII, 6, 466–475.
- [69] Acosta-Torres L.S., Mendieta I., Nuñez-Anita R.E., Cajero-Juárez M., Castaño V.M. (2012) Cytocompatible antifungal acrylic resin containing silver nanoparticles for dentures, *Int. J. Nanomed.* 7, 4777–4786.
- [70] Falkiewicz-Dulik M., Macura A.B. (2008) Nanosrebro jako substancja biostabilizująca materiały obuwnicze w profilaktyce grzybicy stóp, *Mikol. Lek.* 15(3), 145–150.
- [71] Guerreiro-Tanomaru J.M., Trindade-Junior A., Cesar Costa B., da Silva G.F., Drullis Cifali L., Basso Bernardi M.I., Tanomaru-Filho M. (2014) Effect of Zirconium Oxide and Zinc Oxide Nanoparticles on Physicochemical Properties and Antibiofilm Activity of a Calcium Silicate-Based Material, *Sci. World J.* 2014, 1–6.
- [72] Ahrari F., Eslami N., Rajabi O., Ghazvini K., Barati S. (2015) The antimicrobial sensitivity of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sangius* to colloidal solutions of different nanoparticles applied as mouthwashes, *Dent. Res. J.* 12(1), 44–49.
- [73] Jung A. (2014) Nanoparticles in medical applications – a direction of the future?, *Pediatr. Med. Rodz.* 10(2), 104–110.
- [74] Kara M., Dro W., Russa R. (2006) Peptydoglikan Gram-ujemnych pałeczkowatych bakterii, *Post. Mikrob.* 45(1), 27–38.
- [75] Du D., van Veen H.W., Murakami S., Pos K.M., Luisi B.F. (2015) Structure, mechanism and cooperation of bacterial multidrug transporters, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 14(33), 76–91.
- [76] Wzorek Z. (2007) Nanosrebro – nowy środek bakteriobójczy, *Przeg. Tech.* 1, 175–181.
- [77] Chwalibog A., Sawosz E., Hotowy A., Szeliga J., Mitura S., Mitura K., Sokolowska A. (2010) Visualization of interaction between inorganic nanoparticles and bacteria or fungi, *Int. J. Nanomed.* 5(1), 1085–1094.
- [78] Mukherjee S., Chowdhury D., Kotcherlakota R., Patra S., Vinothkumar B., Bhadra M.P., Patra C.R. (2014) Potential theranostics application of bio-synthesized silver nanoparticles (4-in-1 system), *Theranostics* 4(3), 316–335.
- [79] Lubelski C., Dukli Z. (2011) *Chemioterapia, immunoterapia i terapia celowana. Informacje dla pacjenta*, 20.08.2015, <http://cozl.eu/cozl_media/Poradniki/chemioterapia_immunoterapia_i_terapia_celowana.pdf>.
- [80] Huang X., El-Sayed M.A. (2010) Gold nanoparticles: Optical properties and implementations in cancer diagnosis and photothermal therapy, *J. Adv. Res.* 1(1), 13–28.
- [81] Orłowska M. (2015) *Złota nanotechnologia w walce z nowotworami*, 24.08.2015, <http://www.innowrota.pl/sites/default/files/images/M.Orłowska_2.pdf>.
- [82] Monge-Fuentes V., Muehlmann L.A., De Azevedo R.B. (2014) Perspectives on the application of nanotechnology in photodynamic therapy for the treatment of melanoma, *Nano Rev.* 1(5), 243–281.
- [83] Biomedizin S., Der E. (2013) Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles in Biomedicine: Applications and Developments in Diagnostics and Therapy, *Rofo* 185(12), 1149–1166.

- [84] Dianzani C., Zara G.P., Maina G., Pettazzoni P., Pizzimenti S., Rossi F., Barrera G. (2014) Drug delivery nanoparticles in skin cancers, *BioMed. Res. Int.* 10, 895–986.
- [85] Oliver J.C., Yen Y., Synold T.W., Schlupe T., Davis M. (2008) A dose-finding pharmacokinetic study of IT-101, the first *de novo* designed nanoparticle therapeutic, in refractory solid tumors, *J. Clin. Oncol.* 26(15S), 14538.
- [86] Niezgoda A., Niezgoda P., Czajkowski R. (2015) Novel Approaches to Treatment of Advanced Melanoma: A Review on Targeted Therapy and Immunotherapy, *BioMed. Res. Int.* 1, 1–16.
- [87] Chau C.F., Wu S.H. (2007) The development of regulations for food nanotechnology, *Trends Food Sci. Technol.* 18(5), 269–280.
- [88] Waszkiewicz-Robak B., Świdorski F. (2008) Nanotechnologia – korzyści i zagrożenia zdrowotne, *Bromat. Chem. Toksykol.* XLI(3), 202–208.
- [89] Mańkowska D. (2009) Terapia fotodynamiczna nowotworów nadzieją współczesnej medycyny onkologicznej, *Farm. Przegl. Nauk.* 11, 11–14.
- [90] Singh J., Garg T., Rath G., (2015) Advances in nanotechnology-based carrier systems for targeted delivery of bioactive drug molecules with special emphasis on immunotherapy in drug resistant tuberculosis – a critical review, *Drug Deliv.* 12, 1–23.

WPŁYW NANOCZĄSTEK METALI I TLENKÓW METALI NA KOMÓRKI SKÓRY

KAROLINA NISKA, EWELINA ZIELIŃSKA, DAGMARA
LUBOWIECKA, IWONA INKIELEWICZ-STĘPNIAK

Katedra i Zakład Chemii Medycznej, Gdański Uniwersytet Medyczny
ul. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk
e-mail: niska.karolina@gumed.edu.pl

Hasła do zapamiętania: nanotechnologia, nanocząstki metali, komórki skóry, promieniowanie UV, fototoksyczność

Wykaz skrótów:

- AgNPs – nanocząstki srebra
- AuNPs – nanocząstki złota
- RFA – reaktywne formy azotu
- RFT – reaktywne formy tlenu
- TiO₂NPs – nanocząstki ditlenku tytanu
- ZnONPs – nanocząstki cynku

1. Wstęp

Nanotechnologia jest coraz prężniej rozwijającą się interdyscyplinarną dziedziną nauki. Obejmuje ona projektowanie, wytwarzanie oraz modyfikowanie struktur na poziomie atomów i cząsteczek. Podstawę nanotechnologii stanowią nanocząstki – struktury mierzone w skali nanometrycznej, których rozmiary nie przekraczają 100 nm. Przedrostek *nano* (grec. *nanos* – karzeł) określa jedną miliardową część całości 1 nm = 10⁻⁹ m. Tak więc, stu nanometrowe nanocząstki są 1000 razy mniejsze od średnicy ludzkiego włosa (100 μm), a większe jedynie od średnicy DNA (10 nm)

czy też cząsteczki wody (0,1 nm) [1]. Struktury w skali *nano*, ze względu na swoje unikatowe właściwości, tzn. duży stosunek powierzchni do rozmiarów oraz łatwość penetrowania przez błony biologiczne znajdują coraz szersze zastosowanie w diagnostyce medycznej, inżynierii tkankowej, a także dermatologii i kosmetologii [2–4]. Duże nadzieje wiąże się z wykorzystaniem nanocząstek w systemach do przenoszenia leków, kremach zmniejszających widoczność blizn poprzez przyspieszenie procesów naprawczych komórek skóry, środkach zwiększających ochronę przed szkodliwym działaniem promieni słonecznych, a także diagnostyce obrazowania chorób skóry [4, 5].

Jednak te same właściwości wpływające na aktywność farmakologiczną i coraz szersze stosowanie nanocząstek w kosmetologii mogą nieść ze sobą niebezpieczeństwo wynikające z ich cytotoksycznego działania na ludzkie komórki. Ze względu na nanometrowe rozmiary, nanocząstki mogą przemieszczać się do układu krążenia i limfatycznego, a następnie tkanek i narządów. Z łatwością penetrują błony biologiczne, wnikając do wnętrza komórek, gdzie gromadzą się i zaburzają prawidłowe funkcjonowanie organelli komórkowych, m.in. pracę mitochondriów, generując zwiększone ilości reaktywnych form tlenu (RFT) i azotu (RFA) [6]. Duża powierzchnia nanocząstek sprzyja większej zdolności wiązania innych cząsteczek, m.in. białek, wpływając na ich reaktywność [7]. Ponadto zdolność nanocząstek do tworzenia aglomeratów powoduje przypadkowe i gwałtowne zmiany ich pierwotnego rozmiaru i kształtu, a w efekcie właściwości fizykochemicznych, jak i aktywności biologicznej [8]. Zatem toksyczne działanie nanometrycznych struktur jest silnie zależne od chemicznych i fizycznych czynników: rozmiaru, kształtu, stopnia aglomeracji i modyfikacji powierzchni, ale także od rodzaju komórek. Znaczenie mają także różnice w fizjologii komórki wynikające z ich pochodzenia (np. epithelialne, limfatyczne), stopień proliferacji (komórki w stanie spoczynku, nowotworowe), budowa błony komórkowej czy też przebieg procesu fagocytozy [9].

W przypadku biomedycznych zastosowań, nanocząstki są często wprowadzane do organizmu ludzkiego poprzez iniekcję dożylną, podskórną, domięśniową oraz śródgałkową. Ponadto człowiek ekspozycja jest na działanie nanocząstek w wyniku coraz powszechniejszego ich stosowania w produktach codziennego użytku. Nanocząstki stanowią również zanieczyszczenie powietrza w wyniku emisji, a także spalin przemysłowych, samochodowych czy samolotowych. Wszechobecność nanocząstek w otaczającym środowisku skłoniła badaczy do oceny ich wpływu i zdolności przenikania przez skórę [4, 10, 11].

2. Budowa i funkcje skóry

Skóra stanowi barierę ochronną przed czynnikami mechanicznymi, fizycznymi, wnikaniem drobnoustrojów i pasożytów, a także działaniem szkodliwych substancji chemicznych, w tym ksenobiotyków. Chroni przed utratą płynów wewnątrzustrojowych, bierze udział w metabolizmie białek, lipidów, węglowodanów i witamin. Skóra odgrywa również bardzo ważną rolę w regulacji cieplnej organizmu i odpowiedzi immunologicznej, dzięki komórkom Langerhansa, które są zdolne do wychwytywania i przetwarzania antygenów, zapoczątkowując odpowiedź zapalną [12, 13]. Uczestniczy także w biosyntezie istotnych związków, w tym keratyny, kolagenu, melaniny, lipidów oraz węglowodanów. Ponadto skóra, wskutek obecności stosownych receptorów, odpowiada za funkcje neurosensoryczne obejmujące ciepło, dotyk czy ból.

Trójwarstwowa struktura skóry składa się z epidermy – naskórka, dermy – skóry właściwej oraz tkanki podskórnej. Naskórek stanowi najbardziej zewnętrzną i najcieńszą warstwę skóry. Składa się z nabłonka wielowarstwowego rogowaciejącego płaskiego zawierającego dwa rodzaje pierwotnych komórek. Keratynocyty, które stanowią 90–95% wszystkich komórek, rozmieszczone są w różnych miejscach naskórka: warstwie podstawnej (*Stratum basale*), kolczystej (*Stratum spinosum*), ziarnistej (*Stratum granulosum*), jasnej (*Stratum lucidum*) i najbardziej zewnętrznej warstwie rogowej (*Stratum corneum*). W warstwie podstawnej występują także melanocyty – komórki barwnikowe, wytwarzające melaninę, komórki Merkla – receptor dotyku oraz komórki Langerhansa [13, 14]. Skóra właściwa składa się z tkanki łącznej właściwej, a z naskórkiem ściśle łączy ją błona podstawna. Zawiera gruczoły łojowe i potowe, naczynia krwionośne i limfatyczne, zakończenia nerwowe, a także przydatki skóry – mieszki włosowe oraz paznokcie. Zbudowana jest z 3 typów włókien: kolagenowych, elastylowych i retikulowych, pomiędzy którymi występują fibroblasty, histiocyty, mastocyty, limfocyty, granulocyty oraz komórki plazmatyczne. Wewnętrzna warstwa skóry – tkanka podskórna – zbudowana jest z tkanki łącznej właściwej luźnej i tkanki tłuszczowej, która stanowi rezerwuuar energetyczny [14].

3. Nanocząstki a nowotwory skóry

Nowotwory skóry, mimo że nie należą do najbardziej śmiertelnej formy raka, stanowią najczęściej występującą postać nowotworu złośliwego u rasy białej w Stanach Zjednoczonych i innych krajach [15].

W Polsce stanowią one 8–10% wszystkich przypadków i zgodnie z prognozami zachorowalności ich liczba będzie ciągle wzrastać [16]. Najczęściej występującym nowotworem złośliwym jest rak podstawnocomórkowy, który stanowi $\frac{3}{4}$ wszystkich nowotworów skóry. Jednak głównie rak płaskonabłonkowy oraz czerniak złośliwy przyczyniają się do wysokiej liczby umieralności. Najczęściej występują w krajach silnie nasłonecznionych, ze względu na silną ekspozycję na promieniowanie ultrafioletowe oraz oparzenia słoneczne skóry, które są najistotniejszym czynnikiem ryzyka. W mniejszym stopniu transformacja zdrowych komórek do nowotworowych jest spowodowana promieniowaniem jonizującym oraz działaniem na skórę środków chemicznych, takich jak arsen, pestycydy, herbicydy czy też węglowodory aromatyczne [17].

Mechanizmy powstawania nowotworów skóry na poziomie molekularnym nadal pozostają nieznanne. W przypadku czerniaka, zakłada się stopniowe przekształcenie melanocytów w komórki dysplastyczne, a następnie komórki nowotworowe. Inne doniesienia stwierdzają, że promieniowanie słoneczne przyczynia się do oksydacyjnego uszkodzenia DNA, które odgrywają znaczącą rolę w patogenezie czerniaka, jak i innych nieczerniakowych (*non-melanoma*) typów nowotworów [18]. Stąd też, aby zapewnić skuteczną ochronę przed promieniowaniem zarówno UVA (400–320 nm) i UVB (320–290 nm) stosuje się w preparatach kosmetycznych związki chemiczne lub filtry fizyczne działające jak mikrolustra.

Ciągle jednak poszukuje się substytutów w stosunku do obecnie wykorzystywanych. W celu polepszenia ochrony przed szkodliwym działaniem promieniowania słonecznego coraz częściej aplikuje się nanocząstki metali i tlenków metali do kremów i balsamów. Uważa się bowiem, że m.in. duży stosunek powierzchni nanocząstek do ich rozmiarów przyczynia się do zwiększenia zdolności blokowania nadfioletu [19]. Powszechnie w kosmetologii używane są już nanocząstki tlenku cynku (ZnONPs) i ditlenku tytanu (TiO₂NPs), rzadziej nanocząstki złota (AuNPs) i srebra (AgNPs) wykazujące silne właściwości bakteriobójcze i grzybobójcze. Jednak te same parametry wpływające na korzystne działanie nanocząstek mogą nieść ze sobą niebezpieczeństwo ich stosowania. Jak wiadomo, nadmierna ekspozycja na promieniowanie UV jest główną przyczyną nowotworów skóry. Jednak interakcja promieniowania ultrafioletowego z nanocząstkami metali i tlenków metali może wzmacniać ten efekt. Stwierdzono, że nanocząstki mogą przyczynić się do generowania wzmożonej ilości RFT, które odgrywają integralną rolę w procesie fotokancerogenezy i starzenia się skóry [20].

Z drugiej strony, różne rodzaje nanocząstek badano również pod kątem ich zastosowania w leczeniu nowotworów skóry, zwłaszcza czerniaka,

w systemach dostarczania leków. Jako nanoosiężniki wykazują wiele zalet: polepszają rozpuszczalnoř leków, modyfikuj ich wlařciwořci farmakokinetyczne, zwiększają biologiczny okres póltrwania poprzez redukcję immunogennořci, a takżę poprawiają biodostępnosć. W tym celu wykorzystano bezpieczne dla organizmu nanostruktury, m.in stałe nanocząstki lipidowe, nanosfery polimerowe, nanorurki węglowe, superparamagnetyczne nanocząstki tlenku żelaza, a takżę nanocząstki złota [21]. Terapie przeciwnowotworowe obejmują tzw. leczenie systemowe, gdzie chemoterapeutyki działają na cały organizm – zabijają nie tylko komórki rakowe, ale też znacząco wpływają na komórki zdrowe, przyczyniają się do wielu skutków ubocznych. Dlatego też ciekawą alternatyw wydadę się miejscowe podawanie leków cytostatycznych za pomocą nanocząstek, zwiększające skutecznoř terapii [21].

4. Powszechnie stosowane nanocząstki metali i tlenków metali – wpływ na komórki skóry

4.1. Nanocząstki ditlenku tytanu (TiO₂NPs)

TiO₂NPs są szeroko stosowane w kosmetykach, farbach, środkach spożywczych, sportowych ubraniach, środkach do czyszczenia powierzchni czy urządzeniach komputerowych [22]. Ze względu na wysoką fotostabilnoř, a takżę niski potencjał wywołania fotoalergii, TiO₂NPs stanową coraz częściej składnik środków przeciwsłonecznych, pełniących rolę filtrów promieniowania UV. TiO₂NPs absorbują promieniowanie o długości fali mniejszej niź 365 nm (fale krótkie UVA) i posiadają tendencję do tworzenia aglomeratów, co obniża ich skutecznoř działania. Aglomeraty o rozmiarach 100–200 nm charakteryzują się obniżoną efektywnoř ochrony w zakresie UVB, a takżę powodują wyraźne przesunięcie pasma absorbującego w kierunku fal dłuższych UVA [23]. Fotokatalityczna aktywnoř TiO₂NPs skutkuje niekorzystnym generowaniem reaktywnych form tlenu w skórze [24, 25]. Z tego powodu nanocząstki zazwyczaj są powlekanie krzemionk lub tlenkiem glinu Al₂O₃ [26].

W badaniach *in vitro* zaobserwowano akumulację TiO₂NPs na powierzchni ludzkich keratynocytów linii HaCaT oraz ich pobieranie na drodze endocytozy. Wskazano, iż nanocząstki ditlenku tytanu działają cytotoksycznie i genotoksycznie na keratynocyty, poprzez uszkodzenie mitochondrialnego DNA i uwalnianie RFT [27]. Przedstawiono równieź wyniki wskazujące na indukcyję autofagii w ludzkich, pierwotnych keratynocytach, spowodowaną działaniem TiO₂NPs. Uważa się, że tak indu-

kowana autofagia jest systemem obronnym komórki, dzięki któremu keratynocyty utrzymują wewnątrzkomórkową homeostazę, a także degradowują nierozpuszczalne substancje toksyczne, w tym częściowo TiO₂NPs. Jednakże, przy wyższych stężeniach TiO₂NPs, autofagia nie jest zdolna do powstrzymywania dodatkowych cytotoksycznych efektów spowodowanych przez nanocząstki, takich jak stan zapalny czy stres oksydacyjny [28]. Dotychczasowa wiedza nie jest jednak wystarczająca do wyjaśnienia mechanizmów określających interakcję komórek skóry – keratynocytów – z nanocząstkami. Stąd nadal prowadzone są badania pod tym kątem, które stanowią ważny kierunek nanotoksykologii.

Ze względu na zastosowanie nanocząstek w kremach przyspieszających proces gojenia, przeprowadzono badania określające wpływ TiO₂NPs na komórki fibroblastów skóry, które odgrywają kluczową rolę w tym procesie. Skupiono się na dwóch krystalicznych formach: rutytowych i anazytowych nanocząstkach ditlenku tytanu. Stwierdzono, iż obydwie formy nanostruktur uszkadzają funkcje komórkowe – zmniejszają ich powierzchnię, proliferację, ruchliwość oraz ograniczają zdolność do kurczenia się włókien kolagenowych. Z tego powodu nanocząstki zostały zmodyfikowane za pomocą polimeru, co spowodowało zmniejszenie możliwości wnikańia przez błony biologiczne fibroblastów, a w efekcie obniżenie poziomu generowanych RFT. Tak więc funkcjonalizacja struktury w skali *nano* za pomocą polimeru może potencjalnie odgrywać ważną rolę w ochronie komórek i tkanek przed uszkodzeniami [29].

Istotnym elementem jest toksyczność TiO₂NPs spowodowana działaniem ultrafioletu. Mimo że nanocząstki absorbują niekorzystne promieniowanie UV, pod jego wpływem niekorzystnie oddziałują na ludzkie keratynocyty. Poziom fototoksyczności i uszkodzenie błony komórkowej zależą głównie od ilości produkowanych RFT. Nanostruktury o mniejszych rozmiarach powodują większe uszkodzenia w komórce, a forma rutyłowa TiO₂NPs charakteryzuje się mniejszą fototoksycznością w porównaniu z anatazową [30–32]. Dodatkowo w obecności azotynu TiO₂NPs posiadają zdolność nitrowania reszt tyrozynowych białek w komórkach keratynocytów pod wpływem UVA, zwiększając tym samym ich fototoksyczność [33].

4.2. Nanocząstki tlenku cynku (ZnONPs)

Z uwagi na wysoką fotostabilność, drugim rodzajem nanocząstek powszechnie stosowanych w kremach przeciwsłonecznych są nanocząstki tlenku cynku. ZnONPs absorbują promieniowanie o długości fali mniej-

szej niż 380 nm [23]. Stąd też stanowią lepszy składnik środków ochronnych w porównaniu z TiO_2NPs , ze względu na lepszą transparentność, a także prawie całkowite pochłanianie promieniowania UVA, które jest głównie odpowiedzialne za fotostarzenie się skóry, odczynu fototoksyczne i fotoalergiczne oraz powstawanie zmian nowotworowych skóry [19]. ZnONPs o rozmiarze 20–30 nm wykazują silne właściwości przeciwbakteryjne, co wykorzystuje się m.in. w przemyśle tekstylnym, przy wytwarzaniu tkanin stosowanych następnie do produkcji odzieży [34]. Nanocząstki tlenku cynku posiadają również wyraźne właściwości przeciwzapalne, a także przyspieszają procesy naprawcze ran septycznych, redukując infekcje bakteryjne skóry, co przyczynia się do ich zastosowania w maściach [34, 35].

Wraz z rozwojem nanotechnologii i coraz szerszym wykorzystaniem nanocząstek pojawiają się doniesienia literaturowe na temat ich toksyczności. ZnONPs w ludzkich epidermalnych keratynocytach linii HaCaT zaburzają pracę mitochondriów i powodują uwolnienie dehydrogenazy mleczanowej na skutek uszkodzenia błony komórkowej. Co więcej, ZnONPs generują RFT, które indukują oksydacyjne uszkodzenia organeli keratynocytów, przyczyniając się przez to do wywołania procesu apoptozy [36]. Dodatkowo ZnONPs wpływają znacząco na ekspresję genów kodujących dysmutazę ponadtlenkową (SOD) oraz peroksydazę glutationową (GPx). Zaobserwowano zwiększony poziom SOD, odpowiadającej za reakcję dysmutacji rodnika ponadtlenkowego do nadtlenu wodoru, oraz obniżoną aktywność GPx, chroniącej komórki przed uszkodzeniem spowodowanym działaniem H_2O_2 [37]. Udowodniono także, że ZnONPs działają genotoksycznie na pierwotne ludzkie komórki keratynocytów skóry, co może wiązać się z ich potencjalnymi właściwościami pronowotworowymi [38].

Badania *in vitro* przeprowadzone na ludzkich fibroblastach skóry wykazały, że ZnONPs zaburzają prawidłowe funkcjonowanie mitochondriów, a także indukują apoptozę poprzez kinazę proteinową p38 aktywowaną mitogenami oraz aktywację białka p53 [39].

ZnONPs jest powszechnie stosowanym fotokatalizatorem. Z tego względu ważne są badania nad toksycznym efektem działania ZnONPs na komórki skóry, pod wpływem promieniowania UV. Fototoksyczność, a także fotogenotoksyczność ZnONPs w stosunku do ludzkich keratynocytów skóry przejawia się generacją rodników hydroksylowych, uwalnianiem dehydrogenazy mleczanowej oraz powstawaniem 8-hydroksy-2'-deoksyguanozyny (8-OH-dG) – produktu oksydacyjnego uszkodzenia DNA [40, 41].

4.3. Nanocząstki złota (AuNPs)

AuNPs, ze względu na ich łatwość syntezy, stabilność chemiczną oraz unikatowe właściwości optyczne cieszą się dużym zainteresowaniem naukowców i technologów. Jednak w literaturze istnieje niewiele donieśń na temat oddziaływania nanocząstek złota na komórki skóry.

Dotychczas przeprowadzono badania m.in. na ludzkich fibroblastach skóry. Stwierdzono, iż 14 nm AuNPs mogą łatwo penetrować ich błonę komórkową i akumulować się w wakuolach. Obecność nanozłota odpowiadała za nieprawidłowe filamenty aktynowe oraz nietypowy skład macierzy zewnątrzkomórkowej fibroblastów. Wskutek tego aktywność komórek została uszkodzona. Znaczej zmianie uległa proliferacja fibroblastów, ich wzrost i adhezja, a także synteza odpowiednich białek tworzących matrix [42]. Inne badania wskazują, że duża powierzchnia nanocząstek złota może przyczynić się do polepszenia adherencji keratynocytów, co umożliwiłoby ich zastosowanie w biomedycznych materiałach wykorzystywanych w inżynierii tkankowej skóry. Dlatego też zostały poddane analizie właściwości 34 nm AuNPs w badaniach *in vitro* na pierwotnych mysich keratynocytach. Wykazano, że niskie stężenia AuNPs < 5 ppm promowały proliferację komórek, zaś wyższe działały cytotoksycznie [43].

4.4. Nanocząstki srebra (AgNPs)

Z powodu częstego występowania chorób związanych z infekcjami wywołanymi przez patogenne bakterie, a także wzrostem ich oporności na stosowane dotychczas antybiotyki, poszukuje się nowych przeciwbakteryjnych związków.

Azotan srebra był stosowany jak środek odkażający rany już od czasów I wojny światowej. Ze względu na szeroki dostęp do antybiotyków obecne użycie związków srebra ogranicza się jedynie do miejscowego wykorzystania ich w kremach przeznaczonych do ran oparzeniowych. Ponowne zainteresowanie srebrem znacznie wzrosło w czasach intensywnego rozwoju nanotechnologii, która umożliwiła jego zastosowanie w skali *nano*. W porównaniu ze związkami srebra, nanocząstki charakteryzują się zwiększoną powierzchnią aktywną, co wpływa na ich niezwykle właściwości fizykochemiczne i działanie biologiczne [44].

Badania przeprowadzone na myszach wykazały, że AgNPs przyspieszają gojenie się ran poprzez hamowanie aktywności bakterii, a także redukowały wywołany stan zapalny [45]. Proces zablizniania obejmuje

reepitalizację, która jest skomplikowanym i wieloetapowym procesem, polegającym na migracji i proliferacji keratynocytów w warstwie naskórka [44]. Stąd ważne jest poznanie mechanizmów działania AgNPs na komórki skóry. Zaobserwowano, iż ekspozycja pierwotnych komórek epidermalnych keratynocytów na działanie 15 nm AgNPs zmniejszyła ich metabolizm, żywotność, a także proliferację i migrację. Dłuższa ekspozycja na AgNPs prowadziła do aktywacji kaspaz 3/7 i uszkodzenia DNA, świadcząc o toksycznych i genotoksycznych właściwościach [46]. Z drugiej jednak strony wykazano, że AgNPs o rozmiarach w zakresie 10–50 nm mogą być potencjalnym chemoprotektorem komórek skóry przed promieniowaniem UVB, które indukuje uszkodzenia DNA i apoptozę, w konsekwencji prowadząc do mutacji komórek [47].

4.5. Przenikanie nanocząstek przez skórę

Kontrowersyjnym tematem jest przenikanie struktur nanometrycznych przez skórę. Jak wiadomo, zgodnie z teorią przezskórnego przenikania substancji, tylko lipofilne cząstki o masie mniejszej niż 600 Da posiadają zdolność biernego przenikania. Część danych literaturowych na temat przezskórnego wchłaniania sugeruje, że nanocząstki nie przenikają poza warstwę rogową (SC) naskórka. Inne prace wskazują, że nanostruktury metali (np. żelaza) są zdolne do przenikania przez warstwę lipidową SC i otwory mieszka włosowego, docierając do warstwy ziarnistej. W niektórych przypadkach stwierdzono nawet ich obecność w warstwie kolczystej i podstawnej [48, 49]. Na absorpcję nanocząstek wpływa wiele czynników, które nie są dokładnie poznane, m.in. właściwości fizykochemiczne NPs, takie jak: rozmiar, kształt, ładunek oraz powierzchnia. Istotną rolę odgrywa również stan skóry. Uważa się, że nanocząstki o rozmiarach ≤ 4 nm z łatwością przenikają przez nienaruszoną skórę, 4–20 nm NPs potencjalnie mogą penetrować zarówno zdrową, jak i uszkodzoną tkankę, nanocząstki 21–45 nm potrafią przenikać jedynie przez uszkodzoną skórę, a większe NPs > 45 nm nie posiadają zdolności penetracji [50].

5. Perspektywy

Nanotechnologia jest relatywnie nową dziedziną, stąd dotychczasowy stan wiedzy nie jest wystarczający do wyjaśnienia szkodliwego wpływu nanocząstek na zdrowie człowieka. W dostępnej literaturze ist-

nieją publikacje dotyczące oddziaływania nanocząstek ditlenku tytanu i tlenku cynku na komórki skóry. Natomiast nanocząstki srebra i złota są mało poznane pod względem cytotoksyczności w stosunku do komórek keratynocytów i fibroblastów. Zwraca również uwagę brak danych na temat wrażliwości melanocytów, których transformacja głównie odpowiada za powstawanie czerniaka złośliwego, na działanie nanocząstek.

Zarówno aktywność farmakologiczna, jak i toksyczność nanocząstek zależy od ich właściwości fizycznych i chemicznych: rozmiaru, kształtu, funkcjonalizacji oraz stężenia i czasu ekspozycji. Stąd ważne są badania wyjaśniające molekularne mechanizmy działania nanometrycznych struktur na komórki skóry, ale z uwzględnieniem ich pełnej charakterystyki w układzie biologicznym. Istotne są również badania pozwalające określić, w jaki sposób koespicycja nanocząstek z innymi czynnikami, np. UV, wpływa na ich aktywność biologiczną wobec komórek skóry. Zbadanie powyższych aspektów umożliwi ich bezpieczne zastosowanie w preparatach kosmetycznych zarówno chroniących przed promieniowaniem ultrafioletowym, przyspieszających gojenie ran, jak i łagodzących stany zapalne czy też wykazujących właściwości antybakteryjne.

Literatura

- [1] Pulit J., Banach M., Kowalski Z. (2011) Właściwości nanocząstek miedzi, platyny, srebra, złota i palladu, *Czas. Techn. Chemia* 10, 197–209.
- [2] Biener J., Wittstock A., Baumann T.F., Weissmüller J., Bäumer M., Hamza A.V. (2009) Surface Chemistry in Nanoscale Materials, *Materials* 2, 2404–2438.
- [3] De Ghosh P.S., Rotello V.M. (2008) Applications of Nanoparticles in Biology, *Adv. Mater.* 20, 4225–4241.
- [4] Draelos Z.D. (2011) What are nanoparticles and where do they go?, *Cosmetic Dermatol.* 24, 306–308.
- [5] Morabito K., Shapley N.C., Steeley K.G., Tripathi A. (2011) Review of sunscreen and the emergence of non-conventional absorbers and their applications in ultraviolet protection, *Int. J. Cosmet. Sci.* 33, 385–390.
- [6] Pujalté I., Passagne I., Brouillaud B., Tréguer M., Durand E., Ohayon-Courtès C., L'Azou B. (2011) Cytotoxicity and oxidative stress induced by different metallic nanoparticles on human kidney cells, *Part. Fibre. Toxicol.* 8, 10.
- [7] Buzea C., Pacheco I.I., Robbie K. (2007) Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity, *Biointerphases* 2, MR17–MR172.
- [8] Auffan M., Bottero J.Y., Chaneac C., Rose J. (2010) Inorganic manufactured nanoparticles: how their physicochemical properties influence their biological effects in aqueous environments, *Nanomedicine* 5, 999–1007.
- [9] Díaz B., Sánchez-Espinel C., Arruebo M., Faro J., de Miguel E., Magadán S., Yagüe C., Fernández-Pacheco R., Ibarra M.R., Santamaría J., González-Fernández A. (2008)

- Assessing methods for blood cell cytotoxic responses to inorganic nanoparticles and nanoparticle aggregates, *Small* 4, 2025–2034.
- [10] Kong B., Seog J.H., Graham L.M., Lee S.B. (2011) Experimental considerations on the cytotoxicity of nanoparticles, *Nanomedicine* 6, 929–941.
- [11] Auffan M., Rose J., Bottero J.Y., Lowry G.V., Jolivet J.P., Wiesner M.R. (2009) Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective, *Nat. Nanotechnol.* 4, 634–641.
- [12] Bensouilah J., Buck P. (2006) Aromadermatology – aromatherapy in the treatment and care of common skin conditions, Radcliffe Publ., Abingdon, Oxford 1–11.
- [13] Hus I. (2000) Komórki dendrytyczne – rozwój i funkcja (Część 1), *Acta Haematol. Pol.* 31, 361–369.
- [14] Monteiro-Riviere N.A. (2010) Structure and function of skin, w: Monteiro-Riviere N.A. (red.), *Toxicology of the Skin*, Target Organ Series, Informa Healthcare, 29, New York, 1–18.
- [15] Misaka H., Zacharias N., Songc, et al. (2013) Skin cancer treatment by albumin/5-Fu loaded magnetic nanocomposite spheres in a mouse model, *J. Biotechnol.* 164, 1, 130–136.
- [16] Didkowska J., Wojciechowska U., Zatoński W. (2009) *Prognozy zachorowalności i umieralności na nowotwory złośliwe w Polsce do 2025 roku*, Krajowy Rejestr Nowotworów, Warszawa.
- [17] Bień S., Żyłka S., Klimas A., Kamiński B., Okła S., Postuła S., Ziółkowska M. (2006) Nowotwory złośliwe skóry głowy i szyi. Charakterystyka epidemiologiczna i kliniczna, *Stud. Med. Akad. Świętokrz.* 3, 11–20.
- [18] Kvam E., Tyrrell R.M. (1997) Induction of oxidative DNA base damage in human skin cells by UV and near visible radiation, *Carcinogenesis* 18, 2379–2384.
- [19] Morabito K., Shapley N.C., Steeley K.G., Tripathi A. (2011) Review of sunscreen and the emergence of non-conventional absorbers and their applications in ultraviolet protection, *Int. J. Cosmet. Sci.* 33, 385–390.
- [20] Tran D.T., Salmon R. (2011) Potential photocarcinogenic effects of nanoparticle sunscreens, *Australas. J. Dermatol.* 52, 1–6.
- [21] Dianzani C., Zara G.P., Maina G., Pettazzoni P., Pizzimenti S., Rossi F., Gigliotti C.L., Ciamporero E.S., Daga M., Barrera G. (2014) Drug Delivery Nanoparticles in Skin Cancers, *Biomed. Res. Int.* 2014.
- [22] Weir A., Westerhoff P., Fabricius L., Hristovski K., Goetz N. (2012) Titanium Dioxide Nanoparticles in Food and Personal Care Products, *Environ. Sci. Technol.* 46, 2242–2250.
- [23] Popov A.P., Lademann J., Priezzhev A.V., Myllylä R. (2005) Effect of size of TiO₂ nanoparticles embedded into stratum corneum on ultraviolet-A and ultraviolet-B sun-blocking properties of the skin, *J. Biomed. Opt.* 10, 064037.
- [24] Warner W.G., Yin J.J., Wei R.R. (1997) Oxidative damage to nucleic acids photosensitized by titanium dioxide, *Free Radic. Biol. Med.* 23, 851–858.
- [25] Popov A., Zhaoc X., Zvyaginc A., Lademann J., Robertse M., Sancheze W., Priezzhev A., Myllylä R. (2010) ZnO and TiO₂ particles: A study on nanosafety and photoprotection, *Proc. SPIE* 7715, 77153G-1.
- [26] Lademann J., Weigmann H.J., Schaefer H., Mueller G., Sterry W. (2000) Investigation of the stability of coated titanium microparticles used in sunscreens, *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* 13, 258–264.

- [27] Jaeger A., Weiss D.G., Jonas L., Kriehuber R. (2012) Oxidative stress-induced cytotoxic and genotoxic effects of nano-sized titanium dioxide particles in human HaCaT keratinocytes, *Toxicology* 296, 27–36.
- [28] Zhao Y., Howe J.L.C., Yu Z., Leong D.T., Chu J.J.H., Ioo J.S.C., Ng K.W. (2012) Exposure to titanium dioxide nanoparticles induces autophagy in primary human keratinocytes, *Small* 9, 387–392.
- [29] Pan Z., Lee W., Slutsky L., Clark R.A., Pernodet N., Rafailovich M.H. (2009) Adverse effects of titanium dioxide nanoparticles on human dermal fibroblasts and how to protect cells, *Small* 5, 11–20.
- [30] Yin J.J., Liu J., Ehrenshaft M., Roberts J.E., Fu P.P., Mason R.P., Zhao B. (2012) Phototoxicity of nano titanium dioxides in HaCaT keratinocytes-generation of reactive oxygen species and cell damage, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 263, 81–88.
- [31] Popov A., Lademann J., Priezzhev A., Myllylä R. (2009) Interaction of sunscreen TiO₂ nanoparticles with skin and UV light: penetration, protection, phototoxicity, *Proc. SPIE-OSA* 7368, 736822–736823.
- [32] Jovanović B. (2015) Review of titanium dioxide nanoparticle phototoxicity: developing a phototoxicity ratio to correct the endpoint values of toxicity tests, *Environ. Toxicol. Chem.* 34, 1070–1077.
- [33] Tu M., Huang Y., Li H.L., Gao Z.H. (2012) The stress caused by nitrate with titanium dioxide nanoparticles under UVA irradiation in human keratinocyte cell, *Toxicology* 299, 60–68.
- [34] Bogutska K.I., Sklyarov Y.P., Prylutsky Y.I. (2013) Zinc and zinc nanoparticles: biological role and application in biomedicine, *Ukr. Bioor. Acta* 1, 9–16.
- [35] Pati R., Mehta R.K., Mohanty S., Padhi A., Sengupta M., Vaseeharan B., Goswami C., Sonawane A. (2014) Topical application of zinc oxide nanoparticles reduces bacterial skin infection in mice and exhibits antibacterial activity by inducing oxidative stress response and cell membrane disintegration in macrophages, *Nanomedicine* 10, 1195–1208.
- [36] Lee S.H., Lee H.R., Kim Y.R., Kim M.K. (2012) Toxic Response of Zinc Oxide Nanoparticles in Human Epidermal Keratinocyte HaCaT Cells, *J. Toxicol. Environ. Health Sci.* 4, 14–18.
- [37] Lee S.H., Pie J.E., Kim K.Y., Lee H.R., Son S.W., Kim M.K. (2012) Effects of zinc oxide nanoparticles on gene expression profile in human keratinocytes, *Mol. Cell Toxicol.* 8, 113–118.
- [38] Sharma V., Singh S.K., Anderson D., Tobin D.J., Dhawan A. (2011) Zinc oxide nanoparticle induced genotoxicity in primary human epidermal keratinocytes, *J. Nanosci. Nanotechnol.* 11, 3782–3788.
- [39] Meyer K., Rajanahalli P., Ahamed M., Rowe J.J., Hong Y. (2011) ZnO nanoparticles induce apoptosis in human dermal fibroblasts via p53 and p38 pathways, *Toxicol. In Vitro* 25, 1721–1726.
- [40] Wang C.C., Wang S., Xia Q., He W., Yin J.J., Fu P.P., Li J.H. (2013) Phototoxicity of zinc oxide nanoparticles in HaCaT keratinocytes-generation of oxidative DNA damage during UVA and visible light irradiation, *J. Nanosci. Nanotechnol.* 13, 3880–3888.
- [41] Tran D.T., Salmon R. (2011) Potential photocarcinogenic effects of nanoparticle sunscreens, *Australas. J. Dermatol.* 52, 1–6.
- [42] Pernodet N., Fang X., Sun Y., Bakhtina A., Ramakrishnan A., Sokolov J., Ulman A., Rafailovich M. (2006) Adverse effects of citrate/gold nanoparticles on human dermal fibroblasts, *Small* 2, 766–773.

- [43] Lu S., Xia D., Huang G., Jing H., Wang Y., Gu H. (2010) Concentration effect of gold nanoparticles on proliferation of keratinocytes, *Colloids Surf. B. Biointerfaces* 81, 406–411.
- [44] Liu X., Lee P.Y., Ho C.M., Lui V.C., Chen Y., Che C.M., Tam P.K., Wong K.K. (2010) Silver nanoparticles mediate differential responses in keratinocytes and fibroblasts during skin wound healing, *Chem. Med. Chem.* 5, 468–475.
- [45] Tian J., Wong K.K., Ho C.M., Lok C.N., Yu W.Y., Che C.M., Chiu J.F., Tam P.K. (2007) Topical delivery of silver nanoparticles promotes wound healing, *Chem. Med. Chem.* 2, 129–138.
- [46] Szmyd R., Goralczyk A.G., Skalniak L., Cierniak A., Lipert B., Filon F.L., Crosera M., Borowczyk J., Laczna E., Drukala J., Klein A., Jura J. (2013) Effect of silver nanoparticles on human primary keratinocytes, *Biol. Chem.* 394, 113–123.
- [47] Arora S., Tyagi N., Bhardwaj A., Rusu L., Palanki R., Vig K., Singh S.R., Singh A.P., Palanki S., Miller M.E., Carter J.E., Singh S. (2015) Silver nanoparticles protect human keratinocytes against UVB radiation-induced DNA damage and apoptosis: potential for prevention of skin carcinogenesis, *Nanomedicine* 11, 1265–1275.
- [48] Watkinson A.C., Bunge A.L., Hadgraft J., Lane M.E. (2013) Nanoparticles Do Not Penetrate Human Skin-A Theoretical Perspective, *Pharm. Res.* 30, 1943–1946.
- [49] Baroli B., Ennas M.G., Loffredo F., Isol M., Pinna R., López-Quintela M.A. (2007) Penetration of Metallic Nanoparticles in Human Full-Thickness, *J. Invest. Dermatol.* 127, 1701–1712.
- [50] Filon F.L., Mauro M., Adami G., Bovenzi M., Crosera M. (2015) Nanoparticles skin absorption: New aspects for a safety profile evaluation, *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 72, 310–322.

NANOTECHNOLOGIA I NANOCZĄSTKI JAKO POTENCJALNA BROŃ W WALCE Z NOWOTWOREM KOŚCI



KATARZYNA PYSZKA, IWONA INKIELEWICZ-STĘPNIAK

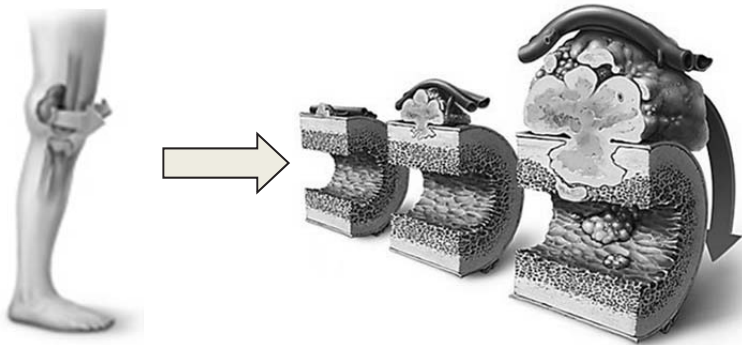
Katedra i Zakład Chemii Medycznej, Gdański Uniwersytet Medyczny
ul. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk
e-mail k.drozd@gumed.edu.pl

Hasła do zapamiętania: nanotechnologia, nanocząstki, mięsak kościopochodny

1. Wstęp

Mięsak kościopochodny (łac. *osteosarcoma*) jest rzadko występującym pierwotnym nowotworem złośliwym kości, który dotyka około 1135 pacjentów rocznie na terenie Unii Europejskiej [1]. W Polsce każdego roku odnotowuje się około 70 nowych zachorowań na mięsaka kościopochodnego. Najczęściej chorują osoby w drugiej dekadzie życia (10–20 lat) w czasie intensywnego wzrostu organizmu. Powodem występowania owego schorzenia są prawdopodobnie okres dojrzewania, intensywnego wzrostu, zmiany hormonalne, które stanowią przyczynę zaburzeń odpowiedzi immunologicznej, co sprzyja transformacji nowotworowej. Nowotwór rozwija się przez długi czas, a faza utajona, w której dochodzi do nagromadzenia mutacji prowadzących do transformacji nowotworowej, może trwać od kilku do kilkudziesięciu lat [2]. Pięć lat to przeciętny okres rozwoju guza o średnicy 1 cm [3] (Rys. 1). Mięsaki kości pochodzą od prymitywnych mezynechmalnych komórek tworzących kości, charakteryzują-

cych się wysoką zdolnością do przerzutowania [4, 5]. Kostniakomięsak należy do najczęściej występujących nowotworów kości i zajmuje trzecie miejsce w częstości pojawiania się wśród dzieci i młodzieży [6]. Obecnie stosowane metody leczenia nie zmieniły się od 30 lat. W związku z tym 5-letni współczynnik przeżywalności wynosi 0–29% w przypadkach przerzutu formy nowotworu [7].



Rys. 1. Rozwój mięsaka kościopochodnego

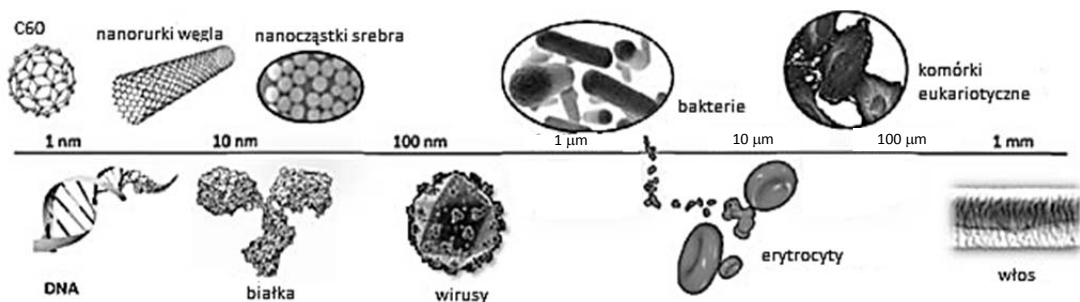
2. Metody leczenia

Leczenie głównie polega na resekcji. Również radioterapia jest zalecana w przypadku guzów pierwotnych [8]. Niestety rozprzestrzenianie się komórek nowotworowych z nieamputowanej kończyny stanowi stałe zagrożenie, powodując silny ból i przewlekły stan chorobowy u większości pacjentów. Wstępne badania nad interferonem wydają się obiecujące [9]. Kolejną próbą znalezienia lekarstwa były niespecyficzne kombinacje chemioterapeutyków. „Compadri” jest skrótem od kombinacji cyklofosfamidu, Oncovinu, winkrystyny (Oncovin), doksorubicyny (adriamycyna), melfalanu i metotreksatu [10]. Compadri stanowił pierwsze racjonalne próby zastosowania chemioterapii u chorych jako uzupełniająca chemioterapię pooperacyjną [11]. Ponadto wysokie dawki metotreksatu stanowiły główną broń w leczeniu mięsaka kości. Cisplatyna natomiast wywiera działanie cytotoksyczne poprzez platynowanie DNA. Podawana jest dożylnie bądź dotętniczo [12]. Cyklofosfamid lub ifosfamid stanowią dwa główne czynniki alkilujące stosowane w leczeniu mięsaka kości, ale wymagają aktywacji przez mikrosomy wątrobowe [13]. W celu zidentyfikowania nowych środków, badano zamknięty w liposomach

związek biologiczny mifamurtyd [14]. Kostniakomięsak jest nowotworem chemiowrażliwym, ale nie chemioulczalnym, w związku z tym bez leczenia chirurgicznego chemioterapia nie może być w pełni skuteczna. Obecnie duże nadzieje wiąże się z zastosowanie osiągnięć nanotechnologii w terapii nowotworowej.

3. Nanomedycyna

Jednym z głównych zastosowań nanotechnologii jest nanomedycyna [15]. Ogólnie nanotechnologia jest rozumiana jako dziedzina nauki poświęcona projektowaniu, budowie i wykorzystaniu struktur funkcjonujących w nanoskali (100 nm lub mniejszej) (Rys. 2). W nanoskali właściwości materiałów często różnią się od odpowiednich materiałów w skali makro. W rzeczywistości podstawowe cechy danego materiału, takie jak temperatura topnienia, własności magnetyczne, a nawet taka właściwość jak kolor, mogą być dokładnie kontrolowane w procesie nanotechnologicznym bez zmiany składu chemicznego [16]. Nanocząstki mogą być zaprojektowane jako nanoplatformy do skutecznego i ukierunkowanego dostarczania leków oraz jako znaczniki pokonujące liczne bariery biologiczne, biofizyczne i biomedyczne. W porównaniu z tradycyjnymi metodami z zastosowania nanourządzeń *in vitro* i *ex vivo* wynikają oczywiste korzyści. Niestety istnieją bariery utrudniające wykorzystanie metod nanotechnologicznych w leczeniu klinicznym. Należą do nich biokompatybilność, kinetyka *in vivo*, skuteczność celowania w komórki nowotworowe, ostra i przewlekła toksyczność, możliwość uwalniania do systemu retikuloendotelialnego i efektywność kosztowa [15].



Rys. 2 . Porównanie rozmiarów nanocząstek i systemów biologicznych

4. Wpływ wybranych nanocząstek na komórki nowotworowe w badaniach *in vitro*

4.1. Nanocząstki srebra

Nanocząstki srebra mają różne zastosowania w medycynie, które wynikają z ich szerokiego spektrum aktywności biologicznej: działania przeciwzapalnego, przeciwnowotworowego i antyangiogenetycznego [17]. Istnieje niewiele publikacji wykazujących przeciwnowotworowe działanie nanocząstek srebra. Potencjalnym miejscem ekspozycji na nanocząstki jest układ oddechowy, dlatego badano działanie nanocząstek srebra powlekanych poli(winylopirolidonem) i jonów srebra na linii komórkowej ludzkiego raka płuc A549. Wykazano, że zarówno nanocząstki srebra, jak i jony srebra mogą wywoływać stres oksydacyjny skorelowany z cytotoksycznością [18]. Oceniano również toksyczne działanie niepowlekanych i powlekanych nanocząstek srebra na żywotność kostniakomięsaka (MG-63) i nowotworu płuc (A549). Nanocząstki srebra wykazały wysoką toksyczność, powodowały apoptozę i zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G2 w obu liniach komórkowych [19]. Działanie cytotoksyczne zsyntetyzowanych nanocząstek srebra z zastosowaniem *Solanum nigrum* i *Cardiospermum halicacabum* określano na ludzkiej linii komórkowej mięsaka kości (MG-63) [20]. Stwierdzono, że nanocząstki srebra funkcjonalizowane skrobią wydają się działać w sposób zależny od p53 jako substancja przeciwnowotworowa [21]. Nanocząstki srebra syntetyzowane przy użyciu ekstraktów z makroglonów *Gracilaria edulis* badano wobec ludzkich linii komórek raka prostaty (PC3). Aktywność przeciwnowotworową *in vitro* nanocząstek srebra bio redukowanych za pomocą niedojrzałych owoców *Solanum trilobatum* wykazano wobec linii komórek ludzkiego raka sutka (MCF 7) [22]. Z kolei przeciwnowotworowe działanie koloidalnego srebra modyfikowanego przy użyciu wyciągu z kory *Moringa olifera* wykazano w komórkach ludzkiego raka szyjki macicy (HeLa) [23]. Ponadto w badaniach na ludzkich komórkach raka szyjki macicy HeLa wykazano, że toksyczność nanocząstek srebra zależy od ich rozmiaru [24].

Nanocząstki mogą powodować działanie toksyczne poprzez stres oksydacyjny oraz reakcję zapalną poprzez tworzenie reaktywnych form tlenu (RFT) i indukowanie stresu oksydacyjnego w komórce. Wewnątrzkomórkowy zredukowany glutation (GSH) usuwa tworzące się w komórce RFT i utlenia się do GSSG. Wykazano, iż nanocząstki srebra zmniejszają poziom wewnątrzkomórkowego GSH i zwiększają generowanie tlenu azotu (NO) [25]. TNF- α pobudza szereg dróg przekazywania sygnałów, co

proceeds to a state of inflammation, apoptosis and tissue damage. It is confirmed that the level of TNF- α is increased by the action of silver nanoparticles [26]. It was also observed that silver nanoparticles influence the cell cycle and lead to its arrest in the G1 and S phases, leading to apoptosis [25]. Metalloproteinases of the extracellular matrix are proteases, which take part in the degradation of the extracellular matrix and can be activated by GSSG and RFT. In addition, extracellular matrix metalloproteinase inhibitors are specific inhibitors, which take part in the regulation of the local action of collagenases in tissue. It is suggested that silver nanoparticles act in a toxic manner through the induction of MMP and TIMP [25]. It is assumed that silver nanoparticles phagocytosed by RAW cells induce cytotoxicity in relation to the cells through the ionization of particles. Phagocytosis of silver nanoparticles stimulates signaling of inflammation through the production of RFT in macrophage cells, and then activated macrophages induce the release of TNF- α . Observed effects indicate that silver shows a toxic effect through the mechanism of the Trojan horse [25, 27, 28].

Numerous studies have shown that the toxicity of silver nanoparticles depends on their size and surface type [24, 29–31]. Similarly to other nanoparticles, the size of silver nanoparticles is related to cellular processes of uptake [24]. It has been shown that functionalization has an influence on the adsorption of silver nanoparticles to the cell surface and the release of Ag^+ ions, which is also a probable mechanism of action of silver nanoparticles [31, 32]. The study of these properties and their influence on the biological activity of silver nanoparticles is important during their design and application in various areas of our life [33]. Functionalized silver nanoparticles are coated with such compounds as citric acid, polysaccharides, surface-active agents, proteins, polymers and NOM (natural organic matter) [34–36]. In addition to organic compounds, inorganic ligands, such as thiocyanate, chloride, boron and cyanide [37, 38]. It is assumed that non-coated silver nanoparticles are more toxic than surface-functionalized ones and that size and surface type are also important factors contributing to the toxicity of nanoparticles [33]. Comparing coated silver nanoparticles of the same size, it was confirmed that functionalized poly(vinylpyrrolidone) nanoparticles caused a decrease in the viability of macrophage J774A.1 and epithelial HT29 cells in comparison with non-functionalized nanoparticles, showing toxicity dependent on the type of functionalization [33]. The influence of coating with citric acid, dextran, 5 and 20 kDa, poly(ethylene glycol) (PEG)

i poli(winylopirolidonem) na aglomerację, rozpuszczanie i toksyczność nanocząstek srebra. Dowiedziono, że zarówno toksyczność hemolityczna i szybkość rozpuszczania były najwyższe, gdy zastosowano powlekanie 5 kDa PEG. Natomiast toksyczność i szybkość rozpuszczania spadały wraz ze wzrostem wielkości aglomeratów, niezależnie od rodzaju funkcjonalizacji powierzchniowej [39]. Wykazano również możliwość zastosowania kompleksu nanocząstek srebra z kwasem α -liponowym jako adiuwantu w radioterapii raka, w celu ochrony normalnych tkanek przed uszkodzeniem w wyniku promieniowania, a także w celu zwiększenia aktywności przeciwnowotworowej promieniowania gamma [40].

4.2. Nanocząstki złota

Istnieje wiele podtypów nanocząstek złota sklasyfikowanych na podstawie rozmiaru i kształtu oraz właściwości fizycznych. Nanosfery złota (złoto koloidalne) o średnicy od 2 nm do ponad 100 nm mogą być syntetyzowane metodą kontrolowanej redukcji wodnego roztworu HAuCl_4 za pomocą różnych środków redukujących bądź ligandów, w różnych warunkach. Między innymi stosowane są: cytynian [41], tiole [42], aminy [43], fosfowodór [44] czy środki powierzchniowo czynne [45]. Nanopaleczki złota są zwykle syntetyzowane za pomocą metody elektrochemicznego osadzania złota w nanoporach matrycy poliwęglanowej lub wykonanej z tlenku glinu [46]. Obrazowanie optyczne, obejmujące wykorzystanie nanocząstek złota jako środków kontrastowych, ma bardzo ograniczone zastosowanie w badaniach na ludziach. Nanoskorupki złota, o pikach powierzchniowego rezonansu plazmonowego w zakresie niskiej podczerwieni, można wytwarzać przez powlekanie kulek krzemionkowych lub polimerowych powłokami złota o zmiennej grubości [47]. Złote nanoklatki, charakteryzujące się kontrolowaną wielkością porów na powierzchni, zsyntetyzowane są metodą galwanicznej reakcji wymiany między nanokostkami srebra i wodnym roztworem HAuCl_4 [48]. Powierzchniowo wzmocniona spektroskopia ramanowska (SERS – ang. *surface enhanced Raman spectroscopy*) jest techniką optyczną znacznie bardziej czułą niż technika fluorescencji i chemiluminescencji, o wysokim poziomie multipleksowania oraz najwyższej wydajności we krwi i innych matrycach biologicznych. W związku z tym nanocząstki SERS odgrywają coraz większą rolę w dziedzinie onkologii [49]. Nanosfery złota SERS (~ 13 nm średnicy) oznakowane Cy3, nici oligonukleotydowe powleczone alkanotiolem były używane jako sondy do monitorowania obecności specyficznych nici DNA [50].

Nanotechnologia znajduje coraz szersze możliwości zastosowania w walce z nowotworami, obejmując obrazowanie molekularne, diagnostykę molekularnej terapii celowanej i bioinformatykę [15]. Nanocząstki złota powlekane oligonukleotydami wykorzystywane są do wykrywania polinukleotydów lub białek (np. p53, gen supresorowy nowotworu), z zastosowaniem różnych metod, takich jak mikroskopia sił atomowych [51], elektroforeza żelowa [52], chronokulometria [53], techniki woltometryczne [54], powierzchniowy rezonans plazmonowy [55] czy spektroskopia Ramana [50]. Nanocząstki złota znajdują również wiele innych zastosowań, jak testy immunologiczne [56], testy do oznaczania białek [57], spektrometria mas jonów wtórnych [58], elektroforeza kapilarna [59] czy wykrywanie komórek nowotworowych [60, 61]. Wszechstronne właściwości optyczne nanocząstek złota pozwalają na obrazowanie optyczne komórek i fantomów za pomocą różnych mechanizmów kontrastowych: techniki fototermiczne [62], ciemnego pola [63], diagnostyka obrazowa [64] oraz mikroskopia fluorescencyjna i skaningowa [65]. Wiele nanocząstek o właściwościach paramagnetycznych znajduje zastosowanie w technice rezonansu magnetycznego, zarówno przedklinicznie, jak i klinicznie [66, 67]. Dowiedziono, że nanoskorupki Au_3Cu_1 zdolne są do zwiększania kontrastu w naczyniach krwionośnych *in vivo*, w związku z tym zaproponowano ich potencjalne zastosowanie w angiografii rezonansu magnetycznego jako kontrast [68].

Badania nad terapiami stosującymi nanocząstki złota oparte są w większości na fototermicznych metodach niszczenia komórek nowotworowych, które mogą być potencjalnie użyteczne w praktyce klinicznej. Po naświetleniu za pomocą impulsów lasera o odpowiedniej długości fali, określone nanosfery, nanopaleczki, nanoskorupki i nanoklatki złota mogą zabijać bakterie [69] oraz komórki rakowe [70–72]. W jednej z prac określono, iż potrzebne jest 5000 nanoskorupek złota na każdą komórkę raka gruczołu krokowego w celu osiągnięcia śmierci komórkowej [73]. Nanosfery złota (o 2–4 nm średnicy) stabilizowane ftalocyjaninami opisano w fotodynamicznej terapii hodowli komórek nowotworowych [74]. Wykazano, że nanocząstki złota zwiększają aktywność antyproliferacyjną i poziom apoptozy komórek ludzkiego wątrobiaka indukowanych przez chemioterapeutyk Paclitaxel [75]. Istnieją doniesienia dotyczące zastosowania nanocząstek złota jako nośników leków. Układ składający się z nanocząstek złota pokrytych poli(tlenkiem etylenu), „załadowanych” TNF-a, został skonstruowany w celu maksymalizacji destrukcji guza i zminimalizowania toksyczności ogólnoustrojowej TNF-a [76]. Połączenie metotreksat – nanocząstki złota zbadano w warunkach *in vitro* i *in vivo* pod kątem cyto-

toksyczności. Stwierdzono, iż koniugaty cytostatyk – nanocząstki działają bardziej efektywnie niż sam metotreksat [77]. Kompozyty hydrożelu i nanoskorupek złota zostały opracowane w celu fototermalnie modulowanego dostarczania leków [78].

4.3. Nanocząstki tlenku cynku

Wśród materiałów nieorganicznych, nanocząstki tlenków metali są szczególnie interesujące. Tlenek cynku (ZnO) należy do grupy tlenków metali, która charakteryzuje się właściwościami fotokatalitycznymi, fotoutleniającymi wobec chemicznych i biologicznych cząsteczek [79]. Ponadto ZnO wykorzystuje wielofunkcyjne nanoplatfomy, które bombardują komórki nowotworowe z zewnątrz, poprzez uwalnianie RFT [80]. Nanocząstki ZnO wywierają działanie cytotoksyczne na linie komórkowe ludzkiego glejaka A172, U87, LN308, LN18 i LN229, podczas gdy nie zaobserwowano efektu cytotoksycznego wobec zdrowych ludzkich astrocytów [81]. Stwierdzono także, że nanocząstki ZnO indukują śmierć komórkową w liniach komórkowych raka piersi i prostaty, podczas gdy nie zaobserwowano istotnego statystycznie wpływu na przeżywalność odpowiednich prawidłowych (nietransformowanych nowotworowo) komórek piersi i prostaty [81]. Ponadto wykazano, że toksyczność wobec ludzkich komórek raka kości MG 63 była znacznie wyższa niż dotychczas obserwowane przez innych badaczy na odpowiednich pierwotnych komórkach, co sugeruje selektywną toksyczność ZnO wobec komórek nowotworowych. Stwierdzono również wpływ powlekania na toksyczność nanocząstek ZnO wobec linii komórek nowotworowych – najniższą toksyczność wykazywały nanocząstki ZnO powlekane skrobią organiczną [82].

Wykazano, że nanocząstki ZnO selektywnie wywołują apoptozę w komórkach ludzkiego raka wątroby HepG2, ludzkiego gruczolakoraka płuc A549 oraz ludzkiego raka nabłonka oskrzeli BEAS-2B. Apoptoza wywoływana jest przez RFT za pośrednictwem szlaku p53, poprzez który działa większość leków przeciwnowotworowych [83]. Obserwacje przeprowadzone na ludzkich komórkach raka wątroby (SMMC-7721) wykazały, że nanopaleczki ZnO mogą wywołać wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia przeciwnowotworowego leku – daunorubicyny – i zwiększyć jego potencjalną skuteczność przeciwnowotworową. Wyniki te wskazują, że nanopaleczki ZnO mogą skutecznie działać jako nośnik daunorubicyny w terapii celowanej [84]. Zaobserwowano również, że ekspozycja ludzkich komórek raka jelita grubego (LoVo) na działanie nanocząstek ZnO spowo-

dowało znaczące statystycznie obniżenie żywotności komórek, zwiększenie poziomu $\text{H}_2\text{O}_2/\text{OH}^\bullet$, obniżenie poziomu O_2^\bullet i GSH^\bullet , depolaryzację błony wewnętrznej mitochondrium, apoptozę i uwolnienie interleukiny-8. Zatem stres oksydacyjny jest głównym czynnikiem powodującym cytotoxiczność nanocząstek ZnO w komórkach raka jelita grubego [85].

4.4. Nanocząstki ditlenku tytanu

Cząstki TiO_2 w skali mikro są zazwyczaj biologicznie i chemicznie obojętne [86]. Pod wpływem promieniowania ultrafioletowego, cząstki TiO_2 mogą generować aktywne wolne rodniki ($\bullet\text{OH}$ i O_2^\bullet), które są odpowiedzialne za rozkład substancji organicznych na powierzchni cząstek. W związku z tym ditlenek tytanu znalazł szerokie zastosowanie do rozkładu zanieczyszczeń organicznych [87]. Na skutek fotokatalitycznych właściwości ditlenku tytanu (TiO_2) doszło do szeroko zakrojonych badań nad jego potencjalnym zastosowaniem jako środka dezynfekującego, przeciwbakteryjnego, czujnika biologicznego, substancji niszczącej komórki nowotworowe bądź w celowaniu genowym [88]. Aktywność bakteriobójczą nanocząstek TiO_2 tłumaczy się peroksydacją wielonienasyconych składników fosfolipidowych błony lipidowej, co powoduje poważne zaburzenia w strukturze błony komórkowej *Escherichia coli*, która w następstwie prowadzi do śmierci komórki [89]. Ponieważ nanocząstki TiO_2 wychwytywane są przez komórki fagocytyjące, docelowe komórki uszkodzane są również od wewnątrz cytoplazmy [90].

Zdolność do selektywnego wiązania się z komórkami nowotworowymi badana była za pomocą kwasu foliowego przyłączonego do powierzchni nanocząstek TiO_2 na ludzkich komórkach raka szyjki macicy HeLa oraz komórkach linii CHO (ang. *Chinese Hamster Ovary*). Fotokatalitycznie indukowane nanocząstki TiO_2 nie tylko uszkodzają elementy komórek, w tym błony plazmatyczne, prowadząc do nekrozy, ale także mogą wywoływać programowaną śmierć komórek [91]. Analiza kinetyki i endocytotycznych szlaków biorących udział w wychwytywaniu nanocząstek ditlenku tytanu, prowadzona na komórkach raka prostaty PC-3M, dowiodła, że internalizacja nanocząstek TiO_2 , zależna od temperatury, stężenia i czasu, następuje poprzez endocytozę zależną od klatryny, endocytozę zależną od kaweoliny oraz poprzez makropinocytozę [92]. Postawiono również zbadać wpływ nanocząstek TiO_2 na wzbudzaną światłem linię ludzkich komórek raka jelita grubego (Ls-174-t). Gdy stężenie TiO_2 było wyższe niż 200 $\mu\text{g}/\text{mll}$, współczynnik przeżycia zmniejszał się

gwałtownie wraz ze wzrostem stężenia TiO_2 . Sugeruje to, że następuje rozpad błon komórkowych i uszkodzenie składników wewnątrzkomórkowych, co przyspiesza śmierć komórkową [88]. Ponadto zaobserwowano, że promieniowanie ultrafioletowe w obecności nanocząstek TiO_2 indukuje śmierć komórek czerniaka A-375 [93]. Inżynieria tkankowa kości oraz projektowanie protez kości z nanocząstek ceramicznych (TiO_2 , Al_2O_3 , hydroksyapatyt) może powodować ich uwalnianie. W tej sytuacji komórki kostne mogą bezpośrednio oddziaływać z nanocząstkami. Z tego powodu badano wpływ cytotoksyczny nanocząstek TiO_2 na komórki kostniakomięsaka MG-63, lecz nanocząstki spowodowały obniżenie przeżywalności komórek dopiero powyżej zakresu stężeń $100 \mu\text{g/ml}$ [94].

4.5. Nanocząstki selenu

Selen, znany ze swojego antyoksydacyjnego działania, jest niezbędnym pierwiastkiem śladowym, który korzystnie wpływa na zdrowie człowieka [95]. Reguluje on co najmniej 25 selenoprotein, które zawierają selenocysteinę [96], posiada właściwości przeciwnowotworowe [97] i przeciwbakteryjne [98]. Chemoprewencyjne działanie selenu obejmuje zapobieganie uszkodzeniom DNA i stresowi oksydacyjnemu [99]. Ostatnie badania sugerują, że dootrzewnowe podawanie nanocząstek selenu jest bezpiecznym i skutecznym sposobem zapobiegania wzrostowi komórek nowotworowych w jamie otrzewnej [100]. Nanocząstki selenu działają jako silne przeciwutleniacze zmniejszające ryzyko wywołania efektu toksycznego [101]. Zaobserwowano zwiększoną proliferację komórek i aktywność fosfatazy alkalicznej wobec ludzkich komórek kostniakomięsaka SaOS-2 po traktowaniu nanocząstkami selenu powlekanymi hydroksyapatytem [102]. Nanocząstki selenu „załadowane” doksorubicyną oraz połączone z transferyną wykazują wysoką cytotoksyczność wobec ludzkich komórek gruczolakoraka piersi MCF-7. Indukują one apoptozę w wyniku nadprodukcji RFT, co aktywuje szlaki p53 i kinaz aktywowanych mitogenami (MAPK) [103]. Wykazano, że nanocząstki selenu mogą stać się użyteczne jako potencjalne leki przeciwnowotworowe, ponieważ efektywnie hamują wzrost ludzkich komórek gruczolakoraka piersi MDA-MB-231 oraz raka szyjki macicy HeLa w sposób zależny od dawki [104]. Nanocząstki selenu powierzchniowo funkcjonalizowane za pomocą 5-fluorouracylu wykazują ogromną selektywność działania w stosunku do komórek nowotworowych i zdrowych, indukując apoptozę w ludzkich komórkach czerniaka A375 [105].

5. Perspektywy

Mimo postępów medycyny, mięsak kościopochodny stanowi nadal ogromne zagrożenie życia szczególnie dzieci i młodzieży. Zatem wydaje się oczywiste, że medycyna nieustannie poszukuje nowych środków umożliwiających pokonanie bądź zahamowanie rozwoju choroby. Coraz częściej czerpie się z najnowszych osiągnięć nanotechnologii. Nanocząstki same w sobie, powlekane bądź połączone z chemoterapeutykami coraz częściej znajdują zastosowanie w potencjalnych terapiach przeciwnowotworowych. Okazuje się, że działają znacznie bardziej selektywnie w porównaniu z dotychczas stosowanymi cytostatykami, łagodząc w ten sposób skutki chemioterapii.

Literatura

- [1] Gatta G., Van Der Zwan J.M., Casal P.G., Siesling S., Dei Tos A.P., Kunkler I., Otter R., Licitra L., Mallone S., Tavilla A., Trama A., Capocaccia R. (2011) Rare cancers are not so rare: the rare cancer burden in Europe, *Eur. J. Cancer* 47, 2493–2511.
- [2] Bal J. (2006) *Biologia molekularna w medycynie: elementy genetyki klinicznej*, Wyd. Nauk. PWN, Warszawa, 248–295.
- [3] Kordek R., Jassem J., Medica V. (2003) *Onkologia: podręcznik dla studentów i lekarzy*, Medical Press, Gdańsk, 1–103.
- [4] Moriarity B.S., Otto G.M., Rahrman E.P., Rathe S.K., Wolf N.K., Weg M.T., Manlove L.A., Larue R.S., Temiz N.A., Molyneux S.D. (2015) A sleeping beauty forward genetic screen identifies new genes and pathways driving osteosarcoma development and metastasis, *Nat. Genet.* 47, 615–624.
- [5] Ottaviani G., Jaffe N. (2010) The epidemiology of osteosarcoma, w: *Pediatric and Adolescent Osteosarcoma*, Springer, 152, 3–13.
- [6] Kansara M., Thomas D.M. (2007) Molecular pathogenesis of osteosarcoma, *Dna Cell Biol.* 26, 1–18.
- [7] Allison D.C., Carney S.C., Ahlmann E.R., Hendifar A., Chawla S., Fedenko A., Angeles C., Menendez L.R. (2012) A meta-analysis of osteosarcoma outcomes in the modern medical era, *Sarcoma* 10.
- [8] Cade S. (1955) Osteogenic sarcoma; a study based on 133 patients, *J.R. Coll. Surg. Edinb.* 1, 79–111.
- [9] Strander H., Cantell K., Jakobsson P., Nilsson U., Soderbergh G. (1974) Exogenous interferon therapy of osteogenic sarcoma, *Acta Orthop. Scand.* 958–959.
- [10] Sutow W. (1975) Combination chemotherapy with adriamycin (Nsc-123127) in primary treatment of osteogenic sarcoma, *Cancer Chemother. Rep.* 6, 315–317.
- [11] Herson J., Sutow W.W., Elder K., Vietti T.J., Falletta J.M., Crist W.M., Vats T.S., Miale T. (1980) Adjuvant chemotherapy in nonmetastatic osteosarcoma: a southwest oncology group study, *Med. Pediatr. Oncol.* 8, 343–352.
- [12] Jaffe N., Knapp J., Chuang V.P., Wallace S., Ayala A., Murray J., Cangir A., Wang A., Benjamin R.S. (1983) Osteosarcoma: intra-arterial treatment of the primary tumor

- with cis-diammine-dichloroplatinum II (CDP): angiographic, pathologic, and pharmacologic studies, *Cancer* 51, 402–407.
- [13] Harris M.B., Cantor A.B., Goorin A.M., Shochat S.J., Ayala A.G., Ferguson W.S., Holbrook T., Link M.P. (1995) Treatment of osteosarcoma with ifosfamide: comparison of response in pediatric patients with recurrent disease versus patients previously untreated: a Pediatric Oncology Group study, *Med. Pediatr. Oncol.* 24, 87–92.
- [14] Meyers P.A., Schwartz C.L., Krailo M.D., Healey J.H., Bernstein M.L., Betcher D., Ferguson W.S., Gebhardt M.C., Goorin A.M., Harris M. (2008) Osteosarcoma: the addition of muramyl tripeptide to chemotherapy improves overall survival – a report from the Children's Oncology Group, *J. Clin. Oncol.* 26, 633–638.
- [15] Cai W., Gao T., Hong H., Sun J. (2008) Applications of gold nanoparticles in cancer nanotechnology, *Nanotechnol. Sci. Appl.* 1, 17.
- [16] Kelsall R.W., Hamley I.W., Geoghegan M. (2005) *Nanoscale science and technology*, Wiley Online Library, 1–54.
- [17] Parnsamut C., Brimson S. (2015) Effects of silver nanoparticles and gold nanoparticles on Il-2, Il-6, and tnf-alpha production via MAPK pathway in leukemic cell lines, *Genet. Mol. Res.* 14, 3650–3668.
- [18] Foldbjerg R., Dang D.A., Autrup H. (2011) Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in the human lung cancer cell line, A549, *Arch. Toxicol.* 85, 743–750.
- [19] Rosário F.D. (2013) Effects of silver nanoparticles on osteosarcoma and lung cell lines; <<http://hdl.handle.net/10773/10872>>.
- [20] Ritika Chauhan M.I., Shankar Narayanan, Jayanthi Abraham (2015) Cytotoxic effect on human osteosarcoma cell line mg-63 and antimicrobial activity on clinical pathogens by plant mediated silver nanoparticles, *WJPR* 4.
- [21] Satapathy S.R., Mohapatra P., Preet R., Das D., Sarkar B., Choudhuri T., Wyatt M.D., Kundu C.N. (2013) Silver-based nanoparticles induce apoptosis in human colon cancer cells mediated through p53, *Nanomedicine* 8, 1307–1322.
- [22] Ramar M., Manikandan B., Marimuthu P.N., Raman T., Mahalingam A., Subramanian P., Karthick S., Munusamy A. (2015) Synthesis of silver nanoparticles using *Solanum trilobatum* fruits extract and its antibacterial, cytotoxic activity against human breast cancer cell line MCF 7, *Spectrochim. Acta Mol. Biomol. Spectrosc.* 140, 223–228.
- [23] Vasanth K., Ilango K., Mohankumar R., Agrawal A., Dubey G.P. (2014) Anticancer activity of moringa oleifera mediated silver nanoparticles on human cervical carcinoma cells by apoptosis induction, *Colloids Surf. B* 117, 354–359.
- [24] Kim T.H., Kim M., Park H.S., Shin U.S., Gong M.S., Kim H.W. (2012) Size-dependent cellular toxicity of silver nanoparticles, *J. Biomed. Mater. Res. A* 100, 1033–1043.
- [25] Park E.J., Yi J., Kim Y., Choi K., Park K. (2010) Silver nanoparticles induce cytotoxicity by a Trojan-horse type mechanism, *Toxicol. In Vitro* 24, 872–878.
- [26] Jayaraman T., Paget A., Shin Y.S., Li X., Mayer J., Chaudhry H.W., Niimi Y., Silane M., Berenstein A. (2008) Tnf- α -mediated inflammation in cerebral aneurysms: a potential link to growth and rupture, *Vasc. Health Risk. Manag.* 4, 805.
- [27] Luoma S.N. (2008) *Silver nanotechnologies and the environment: Old problems or new challenges?* Washington, DC, W. Wilson Internat. Center For Scholars.
- [28] Lubick N. (2008) Nanosilver toxicity: ions, nanoparticles or both?, *Environ. Sci. Technol.* 42, 8617.

- [29] Carlson C., Hussain S.M., Schrand A.M., Braydich-Stolle L.K., Hess K.L., Jones R.L., Schlager J.J. (2008) Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size-dependent generation of reactive oxygen species, *J. Phys. Chem. B* 112, 13608–13619.
- [30] Liu W., Wu Y., Wang C., Li H.C., Wang T., Liao C.Y., Cui L., Zhou Q.F., Yan B., Jiang G.B. (2010) Impact of silver nanoparticles on human cells: effect of particle size, *Nanotoxicology* 4, 319–330.
- [31] Suresh A.K., Pelletier D.A., Wang W., Morrell-Falvey J.L., Gu B., Doktycz M.J. (2012) Cytotoxicity induced by engineered silver nanocrystallites is dependent on surface coatings and cell types, *Langmuir* 28, 2727–2735.
- [32] Yang X., Gondikas A.P., Marinakos S.M., Auffan M., Liu J., Hsu-Kim H., Meyer J.N. (2011) Mechanism of silver nanoparticle toxicity is dependent on dissolved silver and surface coating in *Caenorhabditis elegans*, *Environ. Sci. Technol.* 46, 1119–1127.
- [33] Nguyen K.C., Seligy V.L., Massarsky A., Moon T.W., Rippstein P., Tan J., Tayabali A.F. (2013) Comparison of toxicity of uncoated and coated silver nanoparticles, *J. Phys. Conf. Ser.* 012025.
- [34] Levard C., Hotze E.M., Lowry G.V., Brown Jr G.E. (2012) Environmental transformations of silver nanoparticles: impact on stability and toxicity, *Environ. Sci. Technol.* 46, 6900–6914.
- [35] Sanghi R., Verma P. (2009) Biomimetic synthesis and characterisation of protein capped silver nanoparticles, *Bioresour. Technol.* 100, 501–504.
- [36] Gigault J., Hackley V.A. (2013) Differentiation and characterization of isotopically modified silver nanoparticles in aqueous media using asymmetric-flow field flow fractionation coupled to optical detection and mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 763, 57–66.
- [37] Delay M., Dolt T., Woellhaf A., Sembritzki R., Frimmel F.H. (2011) Interactions and stability of silver nanoparticles in the aqueous phase: influence of natural organic matter (NOM) and ionic strength, *J. Chromatogr. A* 1218, 4206–4212.
- [38] Piccapietra F., Sigg L., Behra R. (2011) Colloidal stability of carbonate-coated silver nanoparticles in synthetic and natural freshwater, *Environ. Sci. Technol.* 46, 818–825.
- [39] Zook J.M., Halter M.D., Cleveland D., Long S.E. (2012) Disentangling the effects of polymer coatings on silver nanoparticle agglomeration, dissolution, and toxicity to determine mechanisms of nanotoxicity, *J. Nanopart. Res.* 14, 1–9.
- [40] Ramachandran L., Krishnan Nai C. (2011) Therapeutic potentials of silver nanoparticle complex of α -lipoic acid, *Nanomater. Nanotechnol.* 1, 17–24.
- [41] Turkevich J., Stevenson P.C., Hillier J. (1951) A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold, *Discuss. Faraday Soc.* 11, 55–75.
- [42] Giersig M., Mulvaney P. (1993) Preparation of ordered colloid monolayers by electrophoretic deposition, *Langmuir* 9, 3408–3413.
- [43] Leff D.V., Brandt L., Heath J.R. (1996) Synthesis and characterization of hydrophobic, organically-soluble gold nanocrystals functionalized with primary amines, *Langmuir* 12, 4723–4730.
- [44] Weare W.W., Reed S.M., Warner M.G., Hutchison J.E. (2000) Improved synthesis of small (d core \approx 1.5 nm) phosphine-stabilized gold nanoparticles, *J. Am. Chem. Soc.* 122, 12890–12891.
- [45] Hiramatsu H., Osterloh F.E. (2004) A simple large-scale synthesis of nearly monodisperse gold and silver nanoparticles with adjustable sizes and with exchangeable surfactants, *Chem. Mater.* 16, 2509–2511.

- [46] Martin C.R. (1994) Nanomaterials – a membrane-based synthetic approach, DTIC Document.
- [47] Caruso F., Spasova M., Salgueiriño-Maceira V., Liz-Marzán L. (2001) Multilayer assemblies of silica-encapsulated gold nanoparticles on decomposable colloid templates, *Adv. Mater.* 13, 1090–1094.
- [48] Chen J., McLellan J.M., Siekkinen A., Xiong Y., Li Z.Y., Xia Y. (2006) Facile synthesis of gold-silver nanocages with controllable pores on the surface, *J. Am. Chem. Soc.* 128, 14776–14777.
- [49] Sha M.Y., Xu H., Penn S.G., Cromer R. (2007) Sers nanoparticles: a new optical detection modality for cancer diagnosis, *Nanomedicine* 2(5), 725–734.
- [50] Cao Y.C., Jin R., Mirkin C.A. (2002) Nanoparticles with Raman spectroscopic fingerprints for DNA and RNA detection, *Science* 297, 1536–1540.
- [51] Han S., Lin J., Zhou F., Vellanoweth R.L. (2000) Oligonucleotide-capped gold nanoparticles for improved atomic force microscopic imaging and enhanced selectivity in polynucleotide detection, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 279, 265–269.
- [52] Qin W.J., Yung L.Y.L. (2007) Nanoparticle-based detection and quantification of DNA with single nucleotide polymorphism (SNP) discrimination selectivity, *Nuc. Acids Res.* 35, e111.
- [53] Zhang J., Song S., Wang L., Pan D., Fan C. (2007) A gold nanoparticle-based chronocoulometric DNA sensor for amplified detection of DNA, *Nat. Protoc.* 2, 2888–2895.
- [54] Wang J., Zhu X., Tu Q., Guo Q., Zarui C.S., Momand J., Sun X.Z., Zhou F. (2008) Capture of p53 by electrodes modified with consensus DNA duplexes and amplified voltammetric detection using ferrocene-capped gold nanoparticle/streptavidin conjugates, *Anal. Chem.* 80, 769–774.
- [55] Li Y., Wark A.W., Lee H.J., Corn R.M. (2006) Single-nucleotide polymorphism genotyping by nanoparticle-enhanced surface plasmon resonance imaging measurements of surface ligation reactions, *Anal. Chem.* 78, 3158–3164.
- [56] Liu X., Dai Q., Austin L., Coutts J., Knowles G., Zou J., Chen H., Huo Q. (2008) A one-step homogeneous immunoassay for cancer biomarker detection using gold nanoparticle probes coupled with dynamic light scattering, *J. Am. Chem. Soc.* 130, 2780–2782.
- [57] Tang D., Yuan R., Chai Y. (2007) Biochemical and immunochemical characterization of the antigen–antibody reaction on a non-toxic biomimetic interface immobilized red blood cells of crucian carp and gold nanoparticles, *Biosens. Bioelectron.* 22, 1116–1120.
- [58] Kim Y.P., Oh E., Hong M.Y., Lee D., Han M.K., Shon H.K., Moon D.W., Kim H.S., Lee T.G. (2006) Gold nanoparticle-enhanced secondary ion mass spectrometry imaging of peptides on self-assembled monolayers, *Anal. Chem.* 78, 1913–1920.
- [59] Tseng W.L., Huang M.F., Huang Y.F., Chang H.T. (2005) Nanoparticle-filled capillary electrophoresis for the separation of long DNA molecules in the presence of hydrodynamic and electrokinetic forces, *Electrophoresis* 26, 3069–3075.
- [60] Kah J.C.Y., Kho K.W., Lee C.G.L., Richard C.J. (2007) Early diagnosis of oral cancer based on the surface plasmon resonance of gold nanoparticles, *Int. J. Nanomedicine* 2, 785.
- [61] Medley C.D., Smith J.E., Tang Z., Wu Y., Bamrungsap S., Tan W. (2008) Gold nanoparticle-based colorimetric assay for the direct detection of cancerous cells, *Anal. Chem.* 80, 1067–1072.

- [62] Cognet L., Tardin C., Boyer D., Choquet D., Tamarat P., Lounis B. (2003) Single metallic nanoparticle imaging for protein detection in cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 11350–11355.
- [63] Dunn A.R., Spudich J.A. (2007) Dynamics of the unbound head during myosin V processive translocation, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14, 246–248.
- [64] Sokolov K., Follen M., Aaron J., Pavlova I., Malpica A., Lotan R., Richards-Kortum R. (2003) Real-time vital optical imaging of precancer using anti-epidermal growth factor receptor antibodies conjugated to gold nanoparticles, *Cancer Res.* 63, 1999–2004.
- [65] De la Fuente J.M., Berry C.C., Riehle M.O., Curtis A.S. (2006) Nanoparticle targeting at cells, *Langmuir* 22, 3286–3293.
- [66] Deroos A., Doornbos J., Bloem H., Falke T., Baleriaux D. (1988) Clinical applications of gadolinium-DTPA in MRI, *Magn. Reson. Annu.* 21, 113–146.
- [67] Thorek D.L., Chen A.K., Czupryna J., Tsourkas A. (2006) Superparamagnetic iron oxide nanoparticle probes for molecular imaging, *Ann. Biomed. Eng.* 34, 23–38.
- [68] Su C.H., Sheu H.S., Lin C.Y., Huang C.C., Lo Y.W., Pu Y.C., Weng J.C., Shieh D.B., Chen J.H., Yeh C.S. (2007) Nanoshell magnetic resonance imaging contrast agents, *J. Am. Chem. Soc.* 129, 2139–2146.
- [69] Zharov V.P., Mercer K.E., Galitovskaya E.N., Smeltzer M.S. (2006) Photothermal nanotherapeutics and nanodiagnostics for selective killing of bacteria targeted with gold nanoparticles, *Biophys. J.* 90, 619–627.
- [70] Loo C., Lowery A., Halas N., West J., Drezek R. (2005) Immunotargeted nanoshells for integrated cancer imaging and therapy, *Nano Lett.* 5, 709–711.
- [71] Huang X., El-Sayed I.H., Qian W., El-Sayed M.A. (2006) Cancer cell imaging and photothermal therapy in the near-infrared region by using gold nanorods, *J. Am. Chem. Soc.* 128, 2115–2120.
- [72] Tong L., Zhao Y., Huff T.B., Hansen M.N., Wei A., Cheng J.X. (2007) Gold nanorods mediate tumor cell death by compromising membrane integrity, *Adv. Mater.* 19, 3136–3141.
- [73] Stern J.M., Stanfield J., Lotan Y., Park S., Hsieh J.T., Cadeddu J.A. (2007) Efficacy of laser-activated gold nanoshells in ablating prostate cancer cells *in vitro*, *J. Endourol.* 21, 939–943.
- [74] Wieder M.E., Hone D.C., Cook M.J., Handsley M.M., Gavrilovic J., Russell D.A. (2006) Intracellular photodynamic therapy with photosensitizer-nanoparticle conjugates: cancer therapy using a ‘Trojan horse’, *Photochem. Photobiol. Sci.* 5, 727–734.
- [75] Wei X.L., Mo Z.H., Li B., Wei J.M. (2007) Disruption of HepG2 cell adhesion by gold nanoparticle and paclitaxel disclosed by *in situ* QCM measurement, *Colloids Surf. B* 59, 100–104.
- [76] Visaria R.K., Griffin R.J., Williams B.W., Ebbini E.S., Paciotti G.F., Song C.W., Bischof J.C. (2006) Enhancement of tumor thermal therapy using gold nanoparticle-assisted tumor necrosis factor- α delivery, *Mol. Cancer Ther.* 5, 1014–1020.
- [77] Chen Y.H., Tsai C.Y., Huang P.Y., Chang M.Y., Cheng P.C., Chou C.H., Chen D.H., Wang C.R., Shiau A.L., Wu C.L. (2007) Methotrexate conjugated to gold nanoparticles inhibits tumor growth in a syngeneic lung tumor model, *Mol. Pharm.* 4, 713–722.
- [78] Sershen S., Westcott S., Halas N., West J. (2000) Temperature-sensitive polymer-nanoshell composites for photothermally modulated drug delivery, *J. Biomed. Mater. Res.* 51, 293–298.

- [79] Szabó T., Németh J., Dékány I. (2003) Zinc oxide nanoparticles incorporated in ultrathin layer silicate films and their photocatalytic properties, *Colloids Surf. A* 230, 23–35.
- [80] Yamamoto O., Hotta M., Sawai J., Sasamoto T., Kojima H. (1998) Influence of powder characteristic of ZnO on antibacterial activity – effect of specific surface area, *J. Ceram. Soc. Jpn.* 106, 1007–1011.
- [81] Ostrovsky S., Kazimirsky G., Gedanken A., Brodie C. (2009) Selective cytotoxic effect of ZnO nanoparticles on glioma cells, *Nano Res.* 2, 882–890.
- [82] Nair S., Sasidharan A., Rani V.D., Menon D., Nair S., Manzoor K., Raina S. (2009) Role of size scale of ZnO nanoparticles and microparticles on toxicity toward bacteria and osteoblast cancer cells, *J. Mater. Sci. – Mater. Med.* 20, 235–241.
- [83] Akhtar M.J., Ahamed M., Kumar S., Khan M.M., Ahmad J., Alrokayan S.A. (2012) Zinc oxide nanoparticles selectively induce apoptosis in human cancer cells through reactive oxygen species, *Int. J. Nanomedicine* 7, 845.
- [84] Zhang H., Chen B., Jiang H., Wang C., Wang H., Wang X. (2011) A strategy for ZnO nanorod mediated multi-mode cancer treatment, *Biomaterials* 32, 1906–1914.
- [85] De Berardis B., Civitelli G., Condello M., Lista P., Pozzi R., Arancia G., Meschini S. (2010) Exposure to zno nanoparticles induces oxidative stress and cytotoxicity in human colon carcinoma cells, *YTAAP* 246, 116–127.
- [86] Blake D.M., Maness P.C., Huang Z., Wolfrum E.J., Huang J., Jacoby W.A. (1999) Application of the photocatalytic chemistry of titanium dioxide to disinfection and the killing of cancer cells, *Sep. Purif. Methods* 28, 1–50.
- [87] Byrne J., Eggins B., Brown N., Mckinney B., Rouse M. (1998) Immobilisation of TiO₂ powder for the treatment of polluted water, *Appl. Catal. B* 17, 25–36.
- [88] Zhang A.P., Sun Y.P. (2004) Photocatalytic killing effect of TiO₂ nanoparticles on Ls-174-t human colon carcinoma cells, *World J. Gastroenterol.* 10, 3191–3193.
- [89] Maness P.C., Smolinski S., Blake D.M., Huang Z., Wolfrum E.J., Jacoby W.A. (1999) Bactericidal activity of photocatalytic TiO₂ reaction: toward an understanding of its killing mechanism, *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 4094–4098.
- [90] Cai R., Hashimoto K., Itoh K., Kubota Y., Fujishima A. (1991) Photokilling of malignant cells with ultrafine TiO₂ powder, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 64, 1268–1273.
- [91] Lai T.Y., Lee W.C. (2009) Killing of cancer cell line by photoexcitation of folic acid-modified titanium dioxide nanoparticles, *J. Photochem. Photobiol. A* 204, 148–153.
- [92] Thurn K.T., Arora H., Paunesku T., Wu A., Brown E.M., Doty C., Kremer J., Woloschak G. (2011) Endocytosis of titanium dioxide nanoparticles in prostate cancer PC-3M cells, *Nanomed. Nanotech. Biol. Med.* 7, 123–130.
- [93] Seo J.W., Chung H., Kim M.Y., Lee J., Choi I.H., Cheon J. (2007) Development of water-soluble single-crystalline TiO₂ nanoparticles for photocatalytic cancer-cell treatment, *Small* 3, 850–853.
- [94] Gerhardt L.C., Jell G., Boccaccini A. (2007) Titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles filled poly (D, L lactid acid)(PDLLA) matrix composites for bone tissue engineering, *J. Mater. Sci. – Mater. Med.* 18, 1287–1298.
- [95] Navarro-Alarcon M., Lopez-Martinez M. (2000) Essentiality of selenium in the human body: relationship with different diseases, *Sci. Total Environ.* 249, 347–371.
- [96] Steinbrenner H., Sies H. (2009) Protection against reactive oxygen species by selenoproteins, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* 1790, 1478–1485.
- [97] Jackson M.I., Combs Jr G. (2008) Selenium and anticarcinogenesis: underlying mechanisms, *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 11, 718–726.

- [98] Tran P.A., Webster T.J. (2011) Selenium nanoparticles inhibit *Staphylococcus aureus* growth, *Int. J. Nanomedicine* 6, 1553.
- [99] Rayman M.P. (2012) Selenium and human health, *The Lancet* 379, 1256–1268.
- [100] Wang X., Sun K., Tan Y., Wu S., Zhang J. (2014) Efficacy and safety of selenium nanoparticles administered intraperitoneally for the prevention of growth of cancer cells in the peritoneal cavity, *Free Radic. Biol. Med.* 72, 1–10.
- [101] Wang H., Zhang J., Yu H. (2007) Elemental selenium at nano size possesses lower toxicity without compromising the fundamental effect on selenoenzymes: comparison with selenomethionine in mice, *Free Radic. Biol. Med.* 42, 1524–1533.
- [102] Hemalatha T., Krithiga G., Kumar B.S., Sastry T.P. (2014) Preparation and characterization of hydroxyapatite-coated selenium nanoparticles and their interaction with osteosarcoma (SaOS-2) cells, *Acta Metall. Sin.* 27, 1152–1158.
- [103] Huang Y., He L., Liu W., Fan C., Zheng W., Wong Y.S., Chen T. (2013) Selective cellular uptake and induction of apoptosis of cancer-targeted selenium nanoparticles, *Biomaterials* 34, 7106–7116.
- [104] Luo H., Wang F., Bai Y., Chen T., Zheng W. (2012) Selenium nanoparticles inhibit the growth of HeLa and MDA-MB-231 cells through induction of S phase arrest, *Colloids Surf. B* 94, 304–308.
- [105] Liu W., Li X., Wong Y.S., Zheng W., Zhang Y., Cao W., Chen T. (2012) Selenium nanoparticles as a carrier of 5-fluorouracil to achieve anticancer synergism, *ACS Nano* 6, 6578–6591.

UWALNIANIE LEKU Z NANOCZĄSTEK MAGNETYCZNYCH OTACZANYCH CHITOZANEM, POLI(TLENKIEM ETYLENU) I DEKSTRANEM

EWELINA GRONCZEWSKA¹, JACEK J. KOZIÓŁ¹,
ALICJA DEFORT²

¹ Wydział Nauk Biologicznych, Uniwersytet Zielonogórski
ul. Profesora Szafrana 1, 65-516 Zielona Góra
e-mail: vang@vp.pl

² Centrum Innowacji „Technologie dla Zdrowia Człowieka”
Park Naukowo-Technologiczny Uniwersytetu Zielonogórskiego
ul. Wsockiego 4, 66-002 Zielona Góra

Hasła do zapamiętania: nanocząstki Fe_3O_4 , funkcjonalizacja NPs, dostarczenie leku

Wykaz skrótów:

PEG – poli(tlenek etylenu) (ang. *polyethylene glycol*)

NPs – nanocząstki (ang. *nanoparticles*)

FT IR – spektroskopia fourierowska

(ang. *Fourier transform infrared spectroscopy*)

1. Wprowadzenie

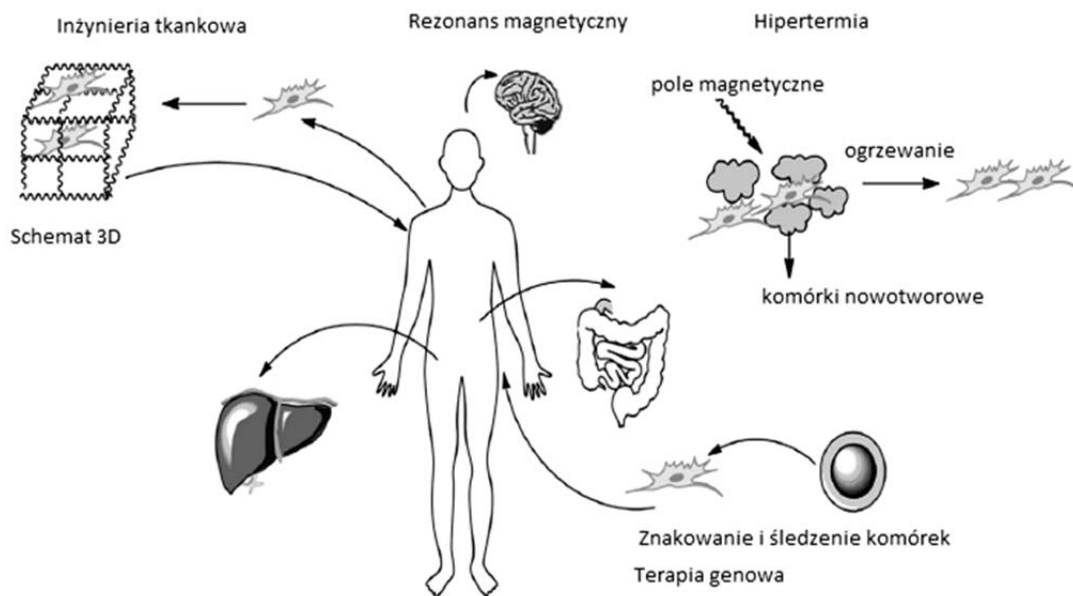
Nowe właściwości materiałów o dyspersji nanometrycznej od blisko trzydziestu lat stanowią podstawę dla wielu – dotychczas niedostępnych – zastosowań w różnych obszarach technologii, w tym również w obszarze nanoteranostyki. Niewątpliwie głównym powodem takiego stanu rzeczy był i jest rozwój zaawansowanej aparatury badawczej po-

zwalającej na prowadzenie badań i pomiarów w obszarze nanometrycznym. Literatura tematycznie związana z zastosowaniami nanomateriałów w terapii i diagnostyce medycznej jest bardzo obszerna i dotyczy tak metod ich otrzymywania, jak i zastosowań [1–4].

1.1. Zastosowanie

Nanocząstki Fe_3O_4 ze względu na właściwości magnetyczne i niską toksyczność znajdują szerokie zastosowanie w wybranych zagadnieniach diagnostyki i terapii medycznej, m.in. w: transporcie leków [5, 6], hipertermii [7] (miejscowym ogrzewaniu w celu uwolnienia przyłączonego leku lub niszczenia komórek nowotworowych), obrazowaniu metodą magnetycznego rezonansu jądrowego jako materiał kontrastowy [8], jak również w diagnostyce *in vitro*.

Obecne badania są skoncentrowane wokół zastosowań biomedycznych m.in. na terapii celowanej, czyli na dostarczaniu różnego rodzaju komponentów do określonego miejsca (celu) w organizmie. Nanocząstki tlenku żelaza wskutek swoich właściwości magnetycznych są wykorzystywane jako nośniki leków do określonego miejsca w ustroju. Użycie nanocząstek z magnetycznym rdzeniem pozwala, po przyłożeniu zewnętrznego pola



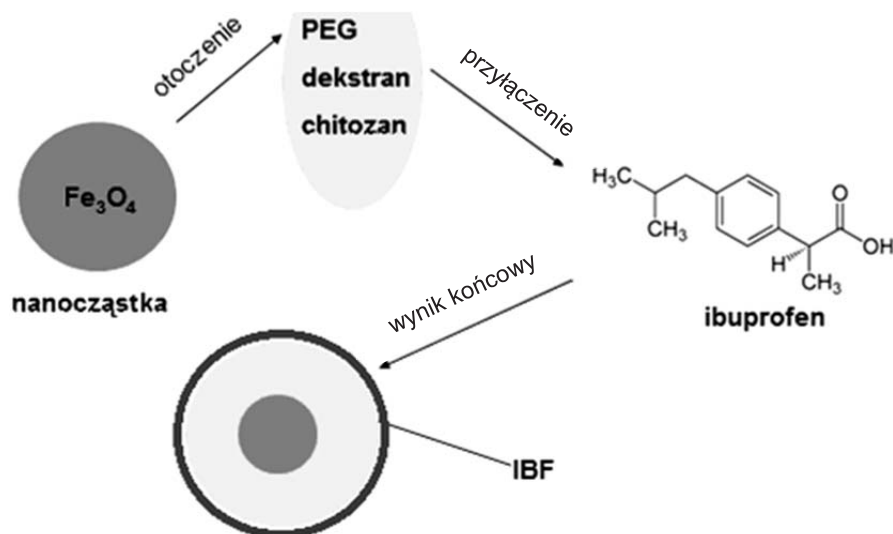
Rys. 1. Zastosowania biomedyczne nanocząstek Fe_3O_4 [4]

magnetycznego, na dostarczenie leku w określone miejsce i kontrolowany wpływ na jego uwalnianie dyfuzyjne w określonym czasie, bądź zwiększone miejscowo pod wpływem lokalnego podniesienia temperatury przez wykorzystanie efektu hipertermii (Rys. 1) [4].

1.2. Cel funkcjonalizacji nanocząstek

W celu umożliwienia lub poprawy warunków immobilizacji nanocząstek ich powierzchnia poddawana jest uprzedniej funkcjonalizacji. W tym procesie często stosowane są polimery naturalne, np. chitozan [9, 10] czy dekstran [11–13], ale również i syntetyczne, np. PEG [14, 15].

Funkcjonalizacja ma na celu poprawę skuteczności przyłączania wybranego leku lub innej substancji do powierzchni nanocząstki, ale także zwiększenie ich biokompatybilności, niezbędnej biodegradowalności, biodostępności, rozpuszczalności i stabilności w ustroju, czyli zapobieganie procesom agregacji nanomateriału. Rodzaj użytej otoczki zazwyczaj dostarcza także odpowiednich grup funkcyjnych: hydroksylowych, aminowych, a w niektórych przypadkach i karboksylowych, które umożliwiają wiązanie kowalencyjne lub jonowe molekuł leku czy innych substancji wprowadzonych do organizmu (Rys. 2).

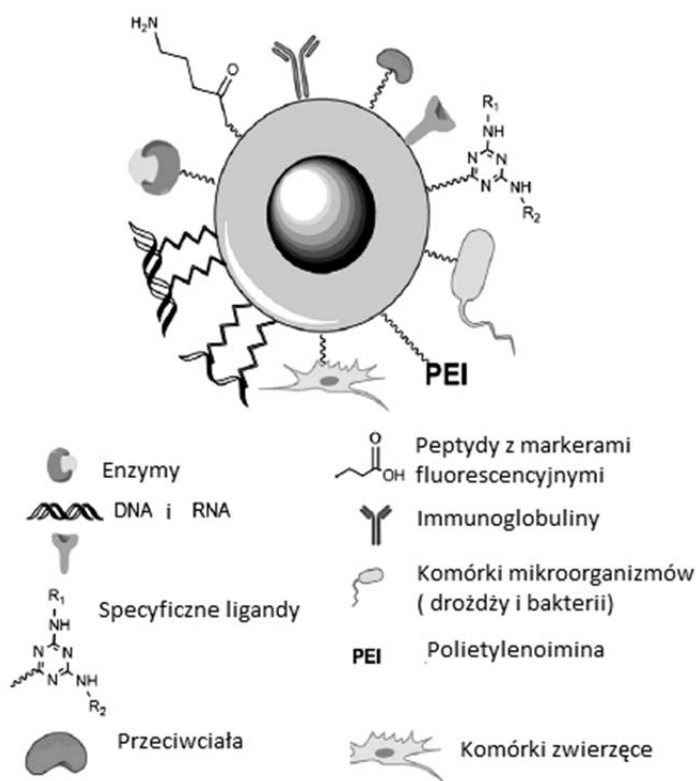


Rys. 2. Etapy funkcjonalizacji i immobilizacji nanocząstek Fe_3O_4

1.3. Możliwości dostarczania leków

Nanocząstki otoczone polimerami dość powszechnie z powodzeniem stosuje się do kierowania farmaceutyków w określone miejsce w organizmie [16]. W literaturze można znaleźć doniesienia dotyczące wprowadzania leków przeciwbólowych, przeciwnowotworowych [17], hormonów, enzymów, witamin itp. (Rys. 3). Badano dostarczanie m.in.: insuliny [18], doksurbicyny, kwasu foliowego, diklofenaku, deksametazonu [19] i innych. Coraz częściej dokonuje się prób z udziałem kwasów nukleinowych w terapii genowej [20]. Prowadzone są badania przy użyciu ibuprofenu, leku z grupy NLPZ (niesteroidowych leków przeciwzapalnych), ale bez użycia nanocząstek o rdzeniu magnetycznym, tylko w postaci nanokapsułek chitozanu lub PEG [21].

Celem badań była synteza nanocząstek Fe_3O_4 , ich funkcjonalizacja odpowiednimi polimerami i immobilizacja ibuprofenem w celu zbadania kinetyki jego uwalniania z syntetyzowanego materiału w różnych warunkach.



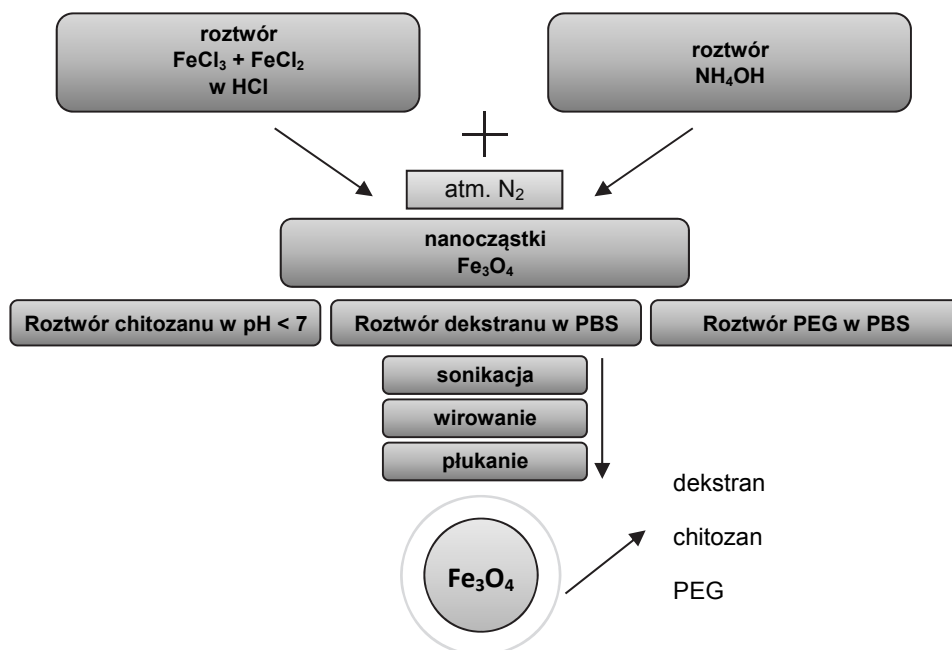
Rys. 3. Zastosowania nanocząstek Fe_3O_4 w diagnostyce biomedycznej [4]

2. Część eksperymentalna

2.1. Synteza nanocząstek Fe_3O_4

Specyfika możliwych zastosowań narzuca wybór struktury dla syntezowanego materiału. Możliwość wykorzystania nanocząstek w terapii (hipertermia, terapia celowana) i diagnostyce (materiał kontrastowy w MRI) wymaga by materiał posiadał właściwości magnetyczne. Wśród najczęściej stosowanych nanocząstek spełniających to kryterium są nanocząstki o rdzeniu z tlenku żelaza. Wynika to m.in. z ich właściwości magnetycznych oraz ze stosunkowo łatwej, taniej i powtarzalnej możliwości syntezy i to według różnych procedur zapewniających wymagane standardy.

Do najczęściej stosowanych należy metoda współstrącania (koprecypitacji) [22]. Polega ona na reakcji odpowiednich ilości soli żelaza II i III (chlorki, azotany, siarczany) w środowisku zasadowym (NH_4OH , NaOH) (Rys. 4). Na rozmiar otrzymywanych nanocząstek ma wpływ szereg parametrów, takich jak np.: wartość pH środowiska reakcji, temperatura czy siła jonowa. Metoda ta pozwala na uzyskanie nanocząstek o rozmia-



Rys. 4. Schemat syntezy i funkcjonalizacji nanocząstek Fe_3O_4

rach ok. 20 nm. Pozostałe stosowane metody to: metoda zol-żel, synteza hydrotermalna, rozkład termiczny i synteza w mikroemulsji [2, 3]. Są one rzadziej stosowane ze względu na mniejszą powtarzalność, większą trudność w prowadzeniu syntezy i niejednokrotnie wyższe koszty.

2.2. Funkcjonalizacja – materiały

Do funkcjonalizacji powierzchni nanocząstek stosuje się często polimery naturalne i sztuczne w zależności od charakteru ich potencjalnych zastosowań. Wybór materiału stosowanego do funkcjonalizacji uwzględnia jego rozpuszczalność w zależności od wartości pH środowiska, toksyczność, degradowalność oraz możliwość immobilizacji przez inne substancje na powierzchni sfunkcjonalizowanego materiału (leki, białka, enzymy, markery itp.). Chitozan i jego modyfikacje, dekstran oraz PEG należą do jednych z najczęściej używanych materiałów służących funkcjonalizacji nanocząstek.

Chitozan jest pochodną chityny uzyskiwaną ze skorupiaków. Ze względu na duże rozpowszechnienie w przyrodzie jest to drugi, po celulozie, biopolimer naturalny [23]. Dekstran jest pochodną glukozy i z uwagi na doskonałą rozpuszczalność znajduje szerokie zastosowanie w preparatach krwiozastępczych [24]. PEG jest polimerem syntetycznym, ale doskonale poprawia rozpuszczalność i stabilność cząstek, zmniejszając ich agregację i podnosząc biokompatybilność [25].

Proces otaczania nanocząstek można prowadzić po samej ich syntezie, w drugim oddzielnym etapie, lub na etapie samej syntezy (metoda jednoetapowa). Nanocząstki pokryte otoczką i z przyłączonym lekiem powinny osiągać rozmiary do około 100 nm, co umożliwi ich medyczne zastosowania.

Pierwszym etapem prowadzonej syntezy było uzyskanie nanocząstek tlenku żelaza metodą Massarta [23] w sposób powtarzalny i łatwy do powtórnego zastosowania. Wiązało się to z koniecznością kontroli warunków przeprowadzanej syntezy. Następnym krokiem było sfunkcjonalizowanie ich powierzchni za pomocą wybranych polimerów naturalnych, tzn. chitozanu i dekstranu, jak i syntetycznego – PEG. Materiały użyte do funkcjonalizacji nanocząstek Fe_3O_4 nie wymagały wstępnego oczyszczenia. Stopień deacetylacji chitozanu został określony metodą spektrometrii w podczerwieni [26] przy użyciu spektrometru FT IR iS50 firmy Nicolet. Dyspersję uzyskanego, sfunkcjonalizowanego materiału określono za pomocą mikroskopu sił atomowych (AFM) firmy Brücker, metodą PeakForce Tapping.

Kolejnym etapem było przyłączenie do uzyskanego materiału doświadczonego leku – ibuprofenu. Rozmiar zimmobilizowanych nanocząstek został wyznaczony za pomocą metody dynamicznego rozpraszania światła (DLS) przy użyciu analizatora Nano Zetasizer firmy Malvern.

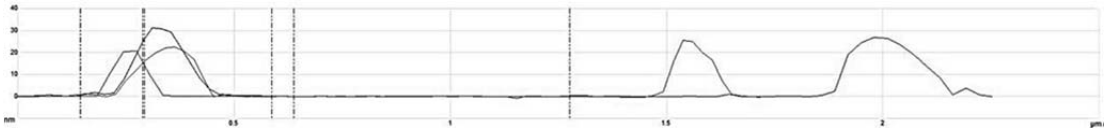
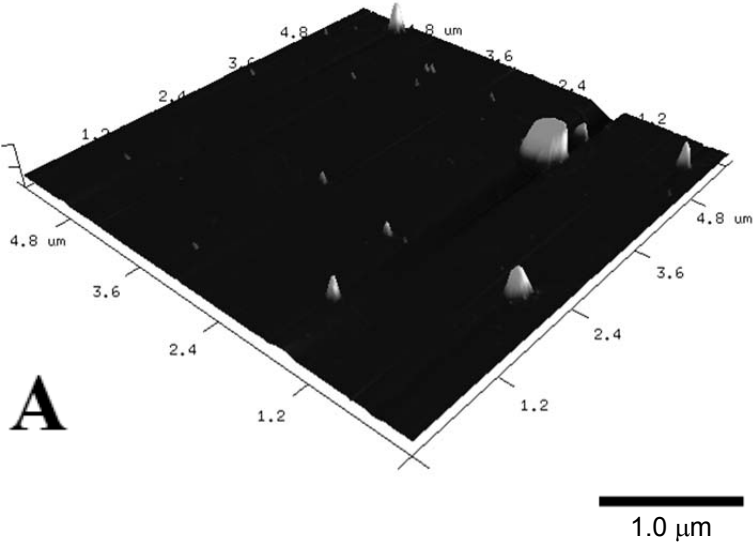
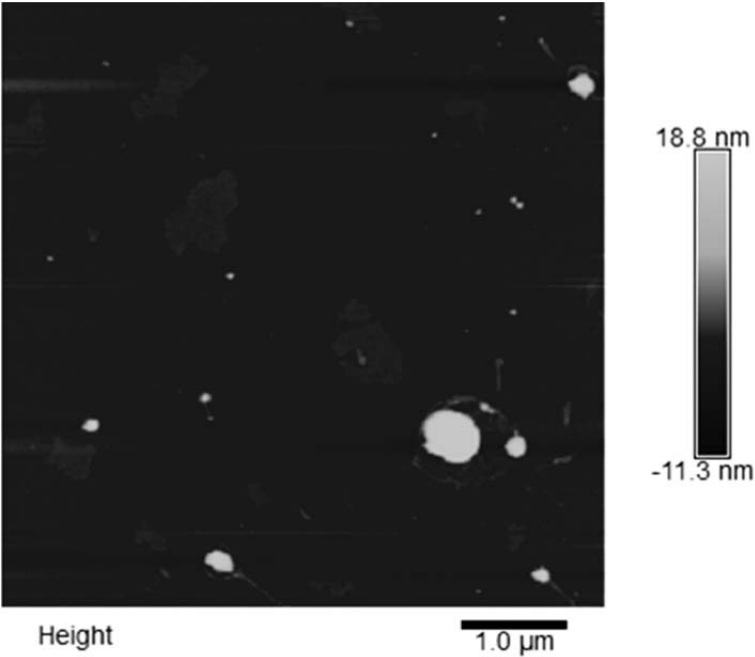
Dla otrzymanych i scharakteryzowanych materiałów została zbadana kinetyka uwalnianego ibuprofenu z powierzchni sfunkcjonalizowanych nanocząstek. W tym celu została sporządzona krzywa wzorcowa roztworów ibuprofenu o różnym stężeniu. Przy użyciu krzywej wzorcowej i na podstawie pomiarów intensywności fluorescencji, wykonanych spektrofлуorymetrem LS 55 firmy PerkinElmer dla roztworów zawierających zimmobilizowany materiał, wyznaczano stężenie molowe uwalnianego ibuprofenu.

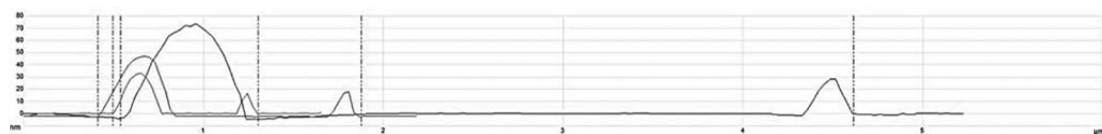
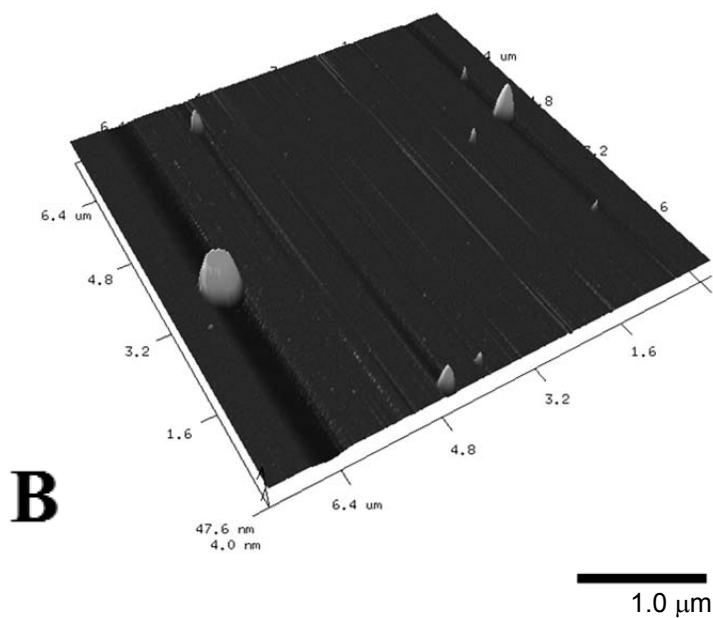
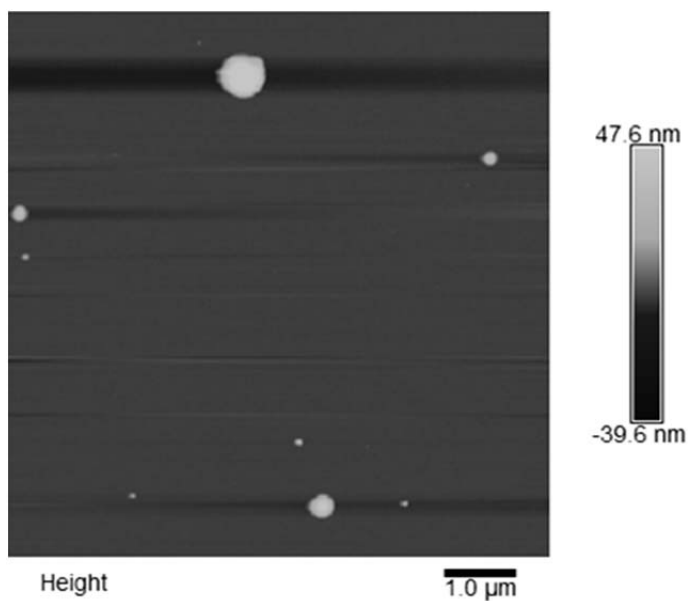
3. Wyniki

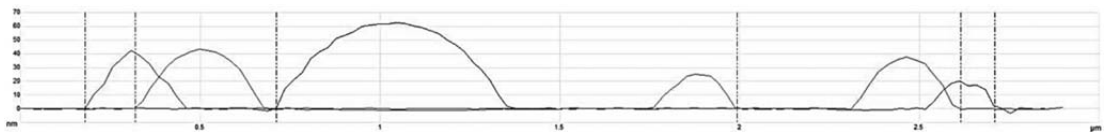
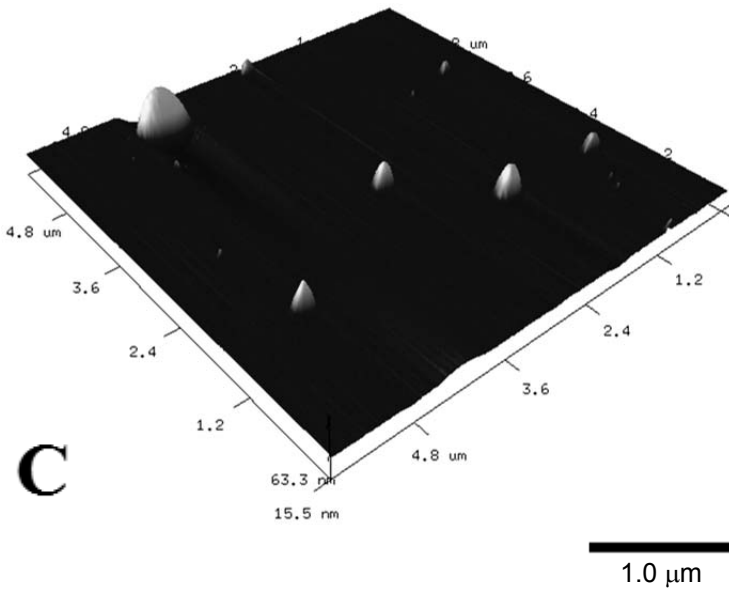
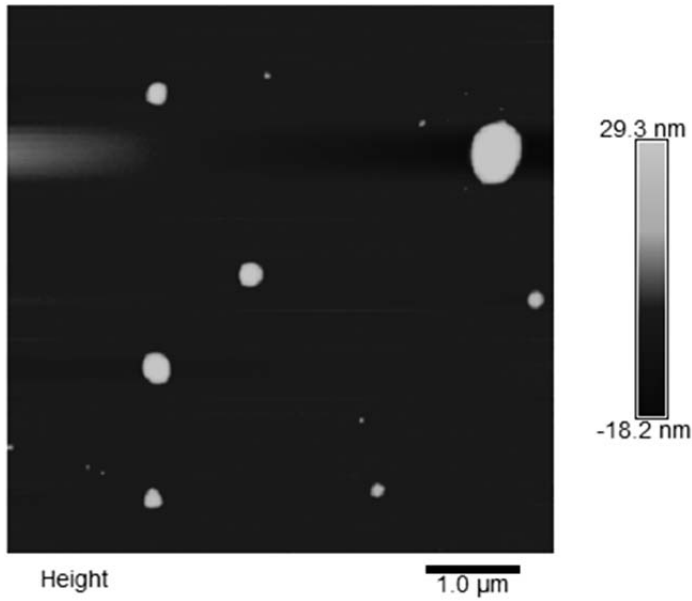
Metodą koprecypitacji zostały otrzymane nanocząstki Fe_3O_4 . Rozkład średnic otrzymanych nanocząstek zawierał się w przedziale 20–40 nm i został określony za pomocą mikroskopii sił atomowych. Otrzymane nanocząstki poddano funkcjonalizacji przy użyciu chitozanu, dekstranu oraz PEG. Dyspersja sfunkcjonalizowanych nanocząstek została określona również metodą spektroskopii sił atomowych, ich rozmiary zawierały się w przedziale 60–70 nm (Rys. 5). Obserwowany wzrost rozmiarów pośrednio potwierdza pozytywny wynik dla procesu funkcjonalizacji.

Uzyskana otoczka magnetycznego rdzenia Fe_3O_4 przez użyte do funkcjonalizacji substancje (chitozan, dekstran i PEG), oprócz podstawowego zadania polegającego na stworzeniu warunków do efektywnej immobilizacji za pomocą ibuprofenu, dodatkowo zapewnia stabilność w roztworze otrzymanego materiału i zapobiega procesom jego agregacji.

Substancje zastosowane do funkcjonalizacji nanocząstek Fe_3O_4 są jednoznacznie określone przez producenta: chitozan (Sigma, $M \sim 480,000$ Da), dekstran (Sigma, $M \sim 6000$ Da) oraz PEG (Sigma, $M \sim 5000$ Da). W przypadku chitozanu ważnym parametrem, oprócz masy molowej, jest wartość stopnia deacetylacji (DD). Jest to stosunek liczby grup aminowych do początkowej liczby grup acetylowych obecnych w chitynie, z której otrzymany został substrat. Jest wyrażany w procentach. Liczba wolnych grup aminowych w istotny sposób wpływa na przyłączanie czynnika immobilizującego. Stopień deacetylacji użytego chitozanu został wyznaczony metodą Miya [26] (Rys. 6) i obliczony ze wzoru



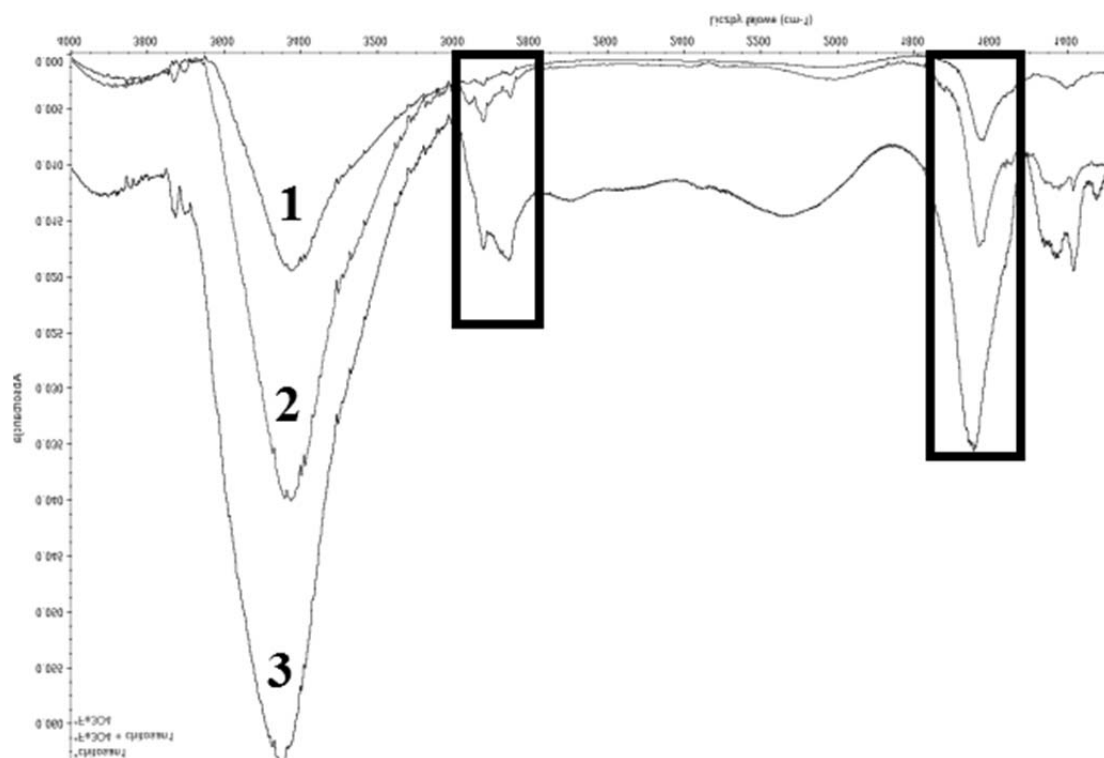




Rys. 5. Obrazy AFM nanocząstek Fe_3O_4 otoczonych chitozaniem (A), PEG (B) i dekstranem (C)

$$DD = 100 - \frac{A_{1665}}{A_{2867}} \times \frac{100}{1,33},$$

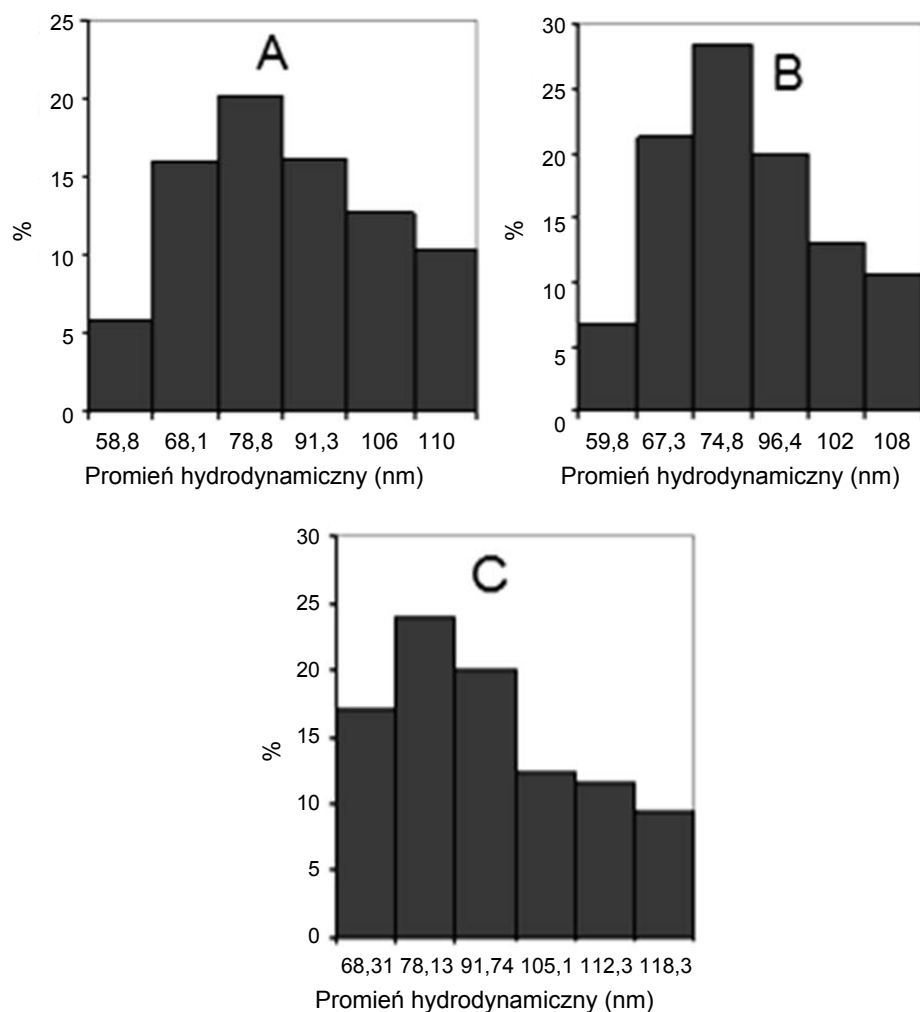
gdzie: A to wartość absorbancji w maksimum dla wskazanych pasm, a wartość 1,33 jest współczynnikiem kalibracji.



Rys. 6. Widma FTIR chitozanu (1), nanocząstek Fe₃O₄ otoczonych chitozaniem jednokrotnie (2) oraz dwukrotnie (3)

Dla użytego w badaniach chitozanu wartość współczynnika deacetylowania wynosiła 43,6%, jest ona stosunkowo niska, co przełożyło się na zdolność do immobilizacji użytego w badaniach chitozanu.

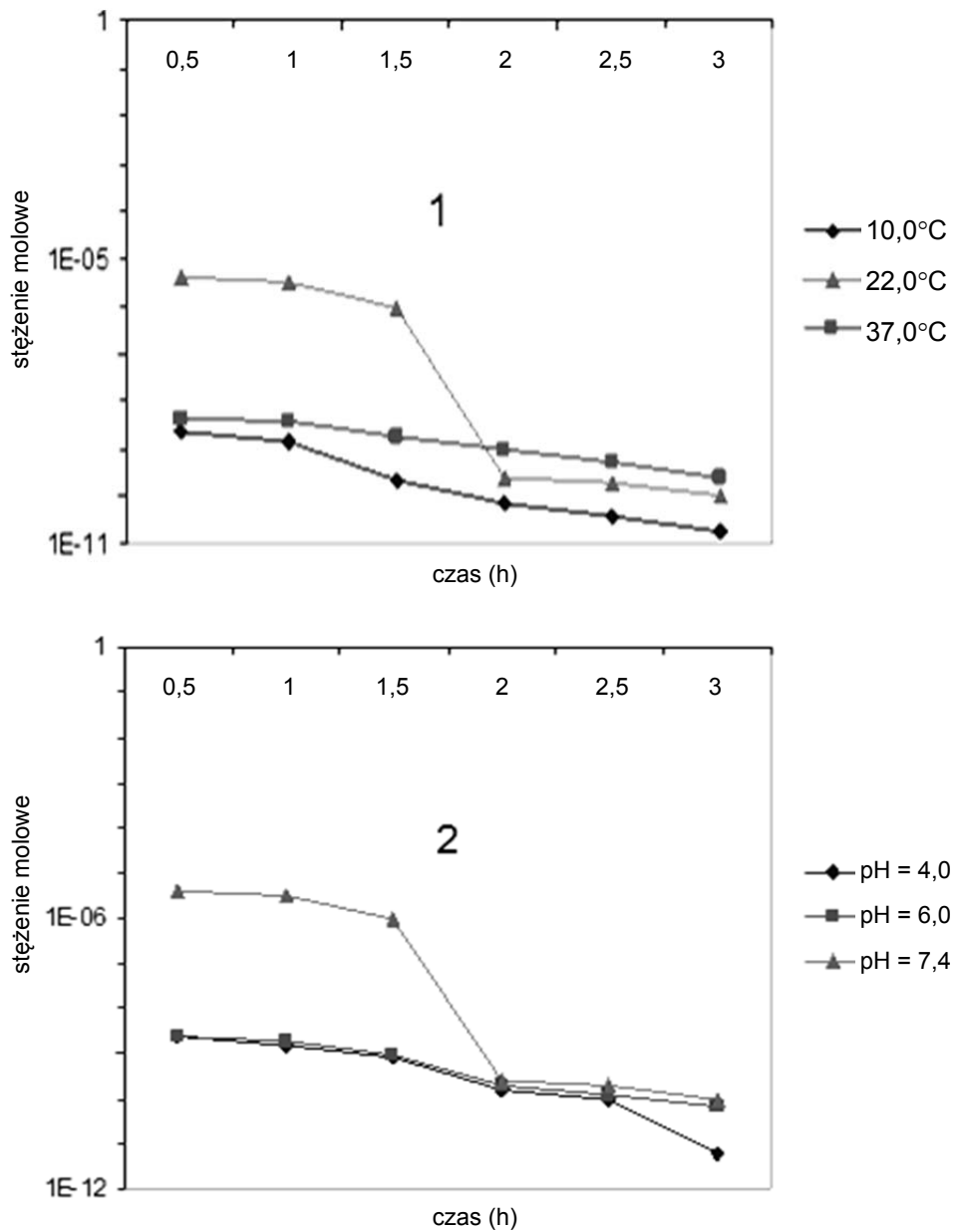
Rozkład promieni hydrodynamicznych dla sfunkcjonalizowanych i zimmobilizowanych nanocząstek Fe₃O₄ (Rys. 7), zmierzony techniką dynamicznego rozpraszania światła, należy do przedziału 80–100 nm. Obserwowany wzrost promienia hydrodynamicznego sfunkcjonalizowanych i zimmobilizowanych nanocząstek w stosunku do nanocząstek wyłącznie sfunkcjonalizowanych, rozumiany jako wzrost grubości warstwy otaczającej rdzeń



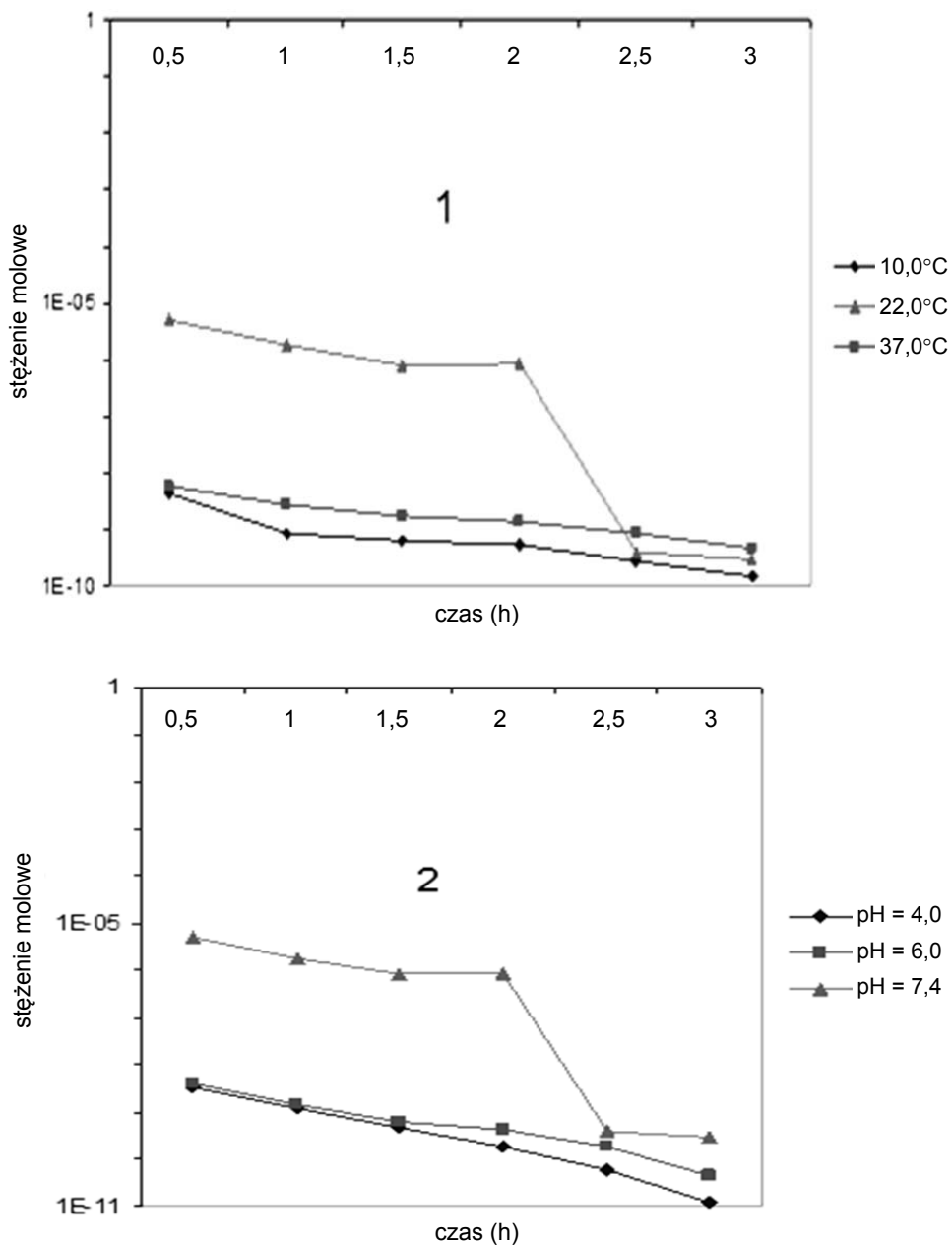
Rys. 7. Rozkład wielkości promieni hydrodynamicznych dla zsyntezowanych nanocząstek Fe₃O₄ otoczonych chitozanem (A), PEG (B) oraz dekstranem (C) z przyłączonym ibuprofenem

i zbudowanej z substancji funkcjonalizującej i immobilizującej, wskazuje na pozytywny przebieg procesu immobilizacji ibuprofenem. Rozmiary tak otrzymanych nanocząstek nie przekraczają średnicy 120 nm, co jest istotne z punktu widzenia zastosowań biologicznych i zgodne z literaturą [1].

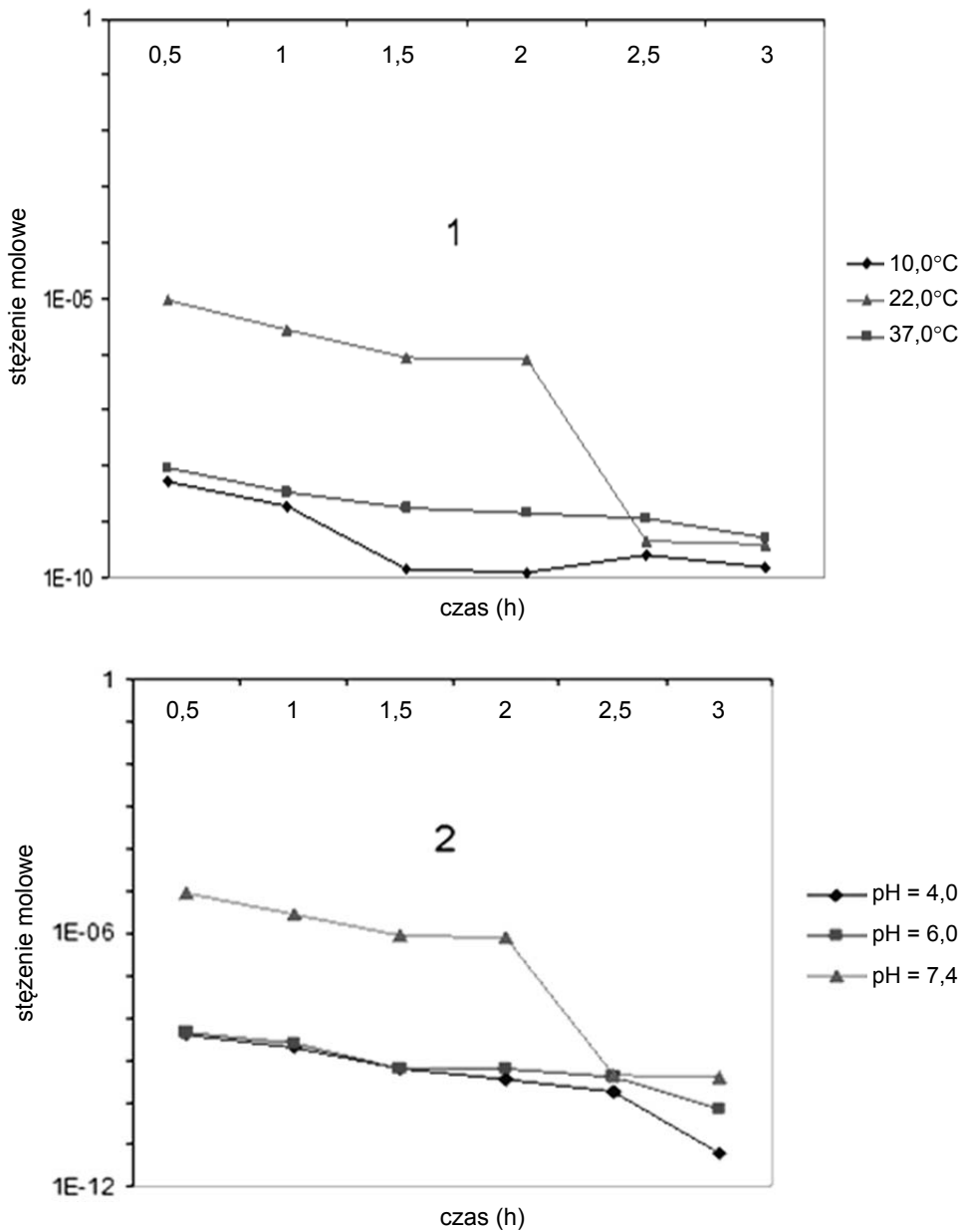
Otrzymany i scharakteryzowany materiał pozwolił na zrealizowanie głównego celu badań – określenie kinetyki uwalniania ibuprofenu w roztworach w zależności od rodzaju substancji użytej do funkcjonalizacji, temperatury oraz wartości pH środowiska uwalnianego leku (Rys. 8–12).



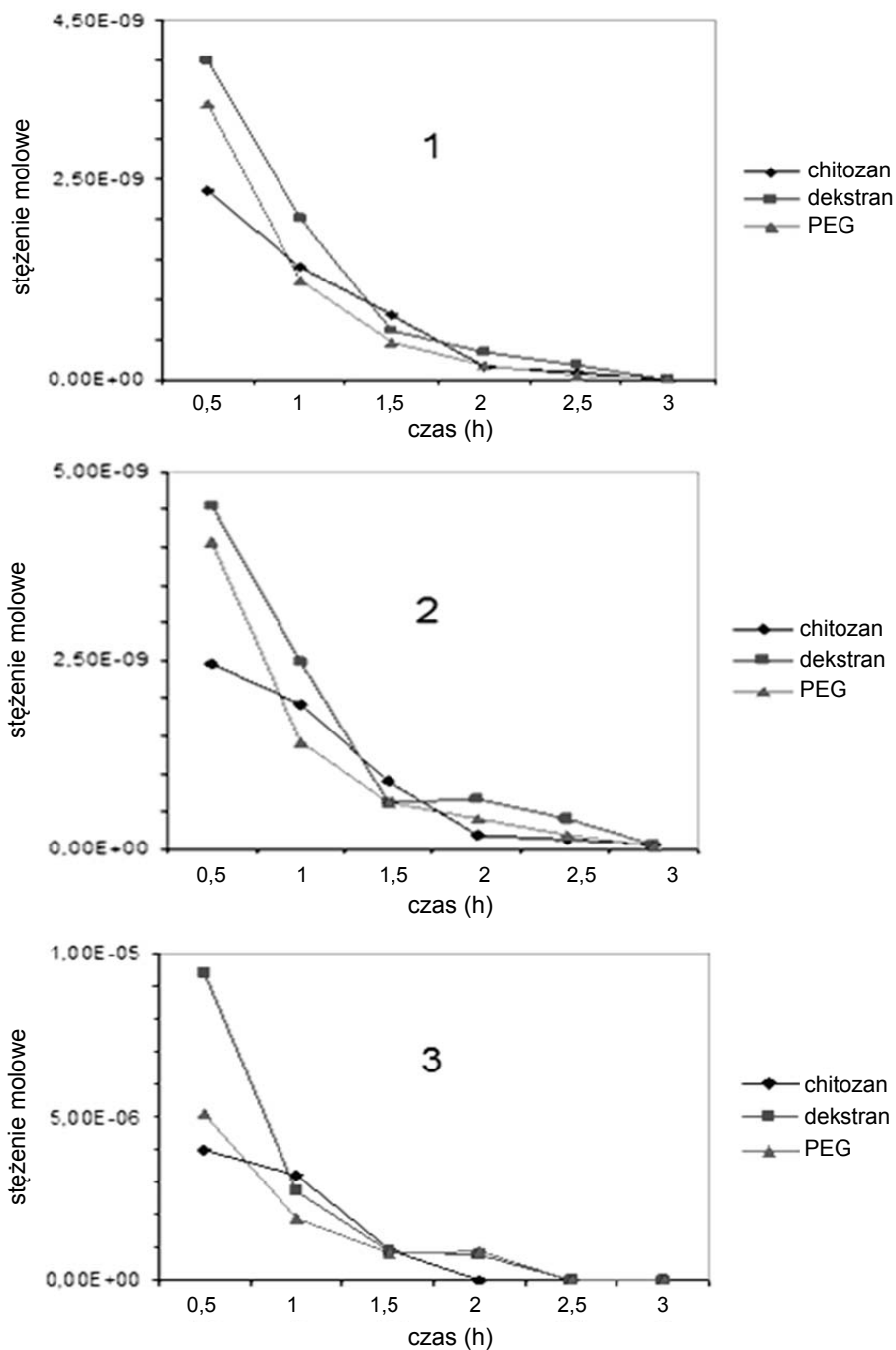
Rys. 8. Uwalnianie ibuprofenu z nanocząstek Fe_3O_4 otoczonych chitozanem. Pomiary dla różnych wartości temperatury (1) oraz dla różnych wartości pH (2)



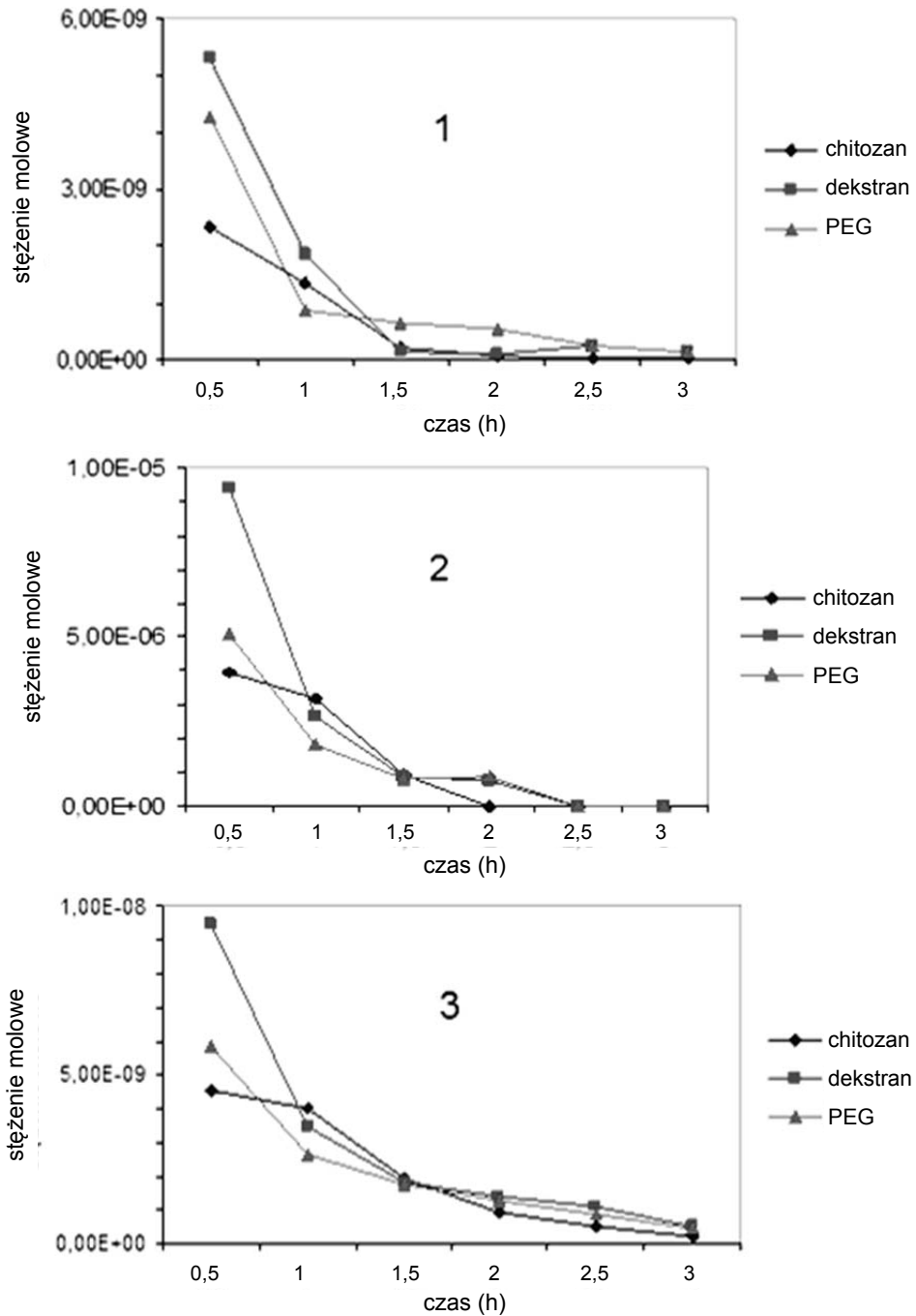
Rys. 9. Uwalnianie ibuprofenu z nanocząstek Fe_3O_4 otoczonych PEG. Pomiary dla różnych wartości temperatury (1) oraz dla różnych wartości pH (2)



Rys. 10. Uwalnianie ibuprofenu z nanocząstek Fe_3O_4 otoczonych dekstranem. Pomiary dla różnych wartości temperatury (1) oraz dla różnych wartości pH (2)



Rys. 11. Zestawienie krzywych uwalniania ibuprofenu z nanocząstek Fe_3O_4 o różnej funkcjonalizacji. Pomiary wykonane dla wartości pH = 4,0 (1); 6,0 (2) oraz 7,4 (3)



Rys. 12. Zestawienie krzywych uwalniania ibuprofenu z nanocząstek Fe_3O_4 o różnej funkcjonalizacji. Pomiary dla temperatur: 10,0°C (1); 22,0°C (2) i 37,0°C (3)

Analiza wyników pozwala stwierdzić, że najefektywniejszą substancją użytą do sfunkcjonalizowania nanocząstek Fe_3O_4 w celu przyłączenia leku jest dekstran, w miarę porównywalne właściwości wykazuje PEG, natomiast najslabszą jest użyty w badaniach chitozan. Pomiary uwalniania ibuprofenu przeprowadzono dla trzech wybranych i ustalonych wartości temperatury. Najwyższy poziom uwalniania leku uzyskano dla wartości temperatury $22,0^\circ\text{C}$; nieco słabszy dla $37,0^\circ\text{C}$; a zdecydowanie najniższy dla $10,0^\circ\text{C}$.

Ocena efektywności uwalniania ibuprofenu z badanego materiału w funkcji wartości pH środowiska, w którym ten proces zachodzi, wskazuje, że optymalną wartością pH jest charakterystyczna dla buforu PBS i wynosząca 7,4. Dla wartości niższych ($\text{pH} = 6,0$ i $4,0$) była ona obniżona. Zostało wykazane, że parametrami wpływającymi na kinetykę procesu uwalniania są: wartość pH środowiska oraz temperatura zachodzącego procesu.

4. Podsumowanie

W przeprowadzonych badaniach otrzymano magnetyczne nanocząstki tlenku żelaza Fe_3O_4 otoczone chitozaniem, PEG i dekstranem o rozmiarach poniżej 100 nm. Taka dyspersja zsyntezowanego materiału stwarza szansę na ich przydatność do zastosowań medycznych. Stopień dyspersji sfunkcjonalizowanych nanocząstek został określony techniką mikroskopii sił atomowych.

Sfunkcjonalizowane nanocząstki zostały zimmobilizowane ibuprofenem. Przyłączenie ibuprofenu wpłynęło na stopień dyspersji nowego materiału. Promienie hydrodynamiczne immobilizowanych nanocząstek, uzyskane z pomiarów dynamicznego rozpraszania światła, wynoszą około 100 nm.

Badanie kinetyki uwalniania leku w różnych warunkach pozwala stwierdzić, że zarówno rodzaj otoczki, pH środowiska, jak i temperatura mają istotny wpływ na jej wydajność. Najwyższy poziom uwalniania leku zaobserwowano w przypadku nanocząstek otoczonych dekstranem, pośredni w przypadku PEG i najniższy dla chitozanu.

Najkorzystniejszą okazała się temperatura $22,0^\circ\text{C}$; pośrednią $37,0^\circ\text{C}$; a najslabsze uwalnianie następowało w temperaturze $10,0^\circ\text{C}$.

Ważnym czynnikiem dla stopnia uwalniania leku była wartość pH środowiska. Przeprowadzone pomiary wskazują, że optymalna wartość pH dla badanych procesów wynosi 7,4; pośrednia 6,0; natomiast najgorzej ibuprofen uwalniał się przy pH środowiska równym 4,0.

Zaobserwowano, że stabilność nanocząstek immobilizowanych ibuprofenem w buforze PBS pokrywa się z intensywnością uwalniania leku i jest najwyższa kolejno dla: dekstranu, PEG i chitozanu. Powtarzające się słabe wyniki uwalniania ibuprofenu z nanocząstek otoczonych chitozanem można tłumaczyć niskim stopniem jego deacetylacji (wyznaczonym doświadczalnie za pomocą pomiarów FT IR – Rys. 6), ale również koniecznością przygotowywania roztworów dla wartości pH poniżej 7,0.

Zarówno niskie wartości pH, jak i obniżona temperatura wpływają negatywnie na proces uwalniania leku.

Optymalne warunki uwalniania ibuprofenu z otrzymanych materiałów to wartość pH zbliżona do wartości dla płynów ustrojowych i temperatura niższa od temperatury ciała (22,0°C); chociaż dla temperatury 37,0°C proces uwalniania ibuprofenu można oceniać jako zadowalający.

Uzyskane wyniki dotyczące otrzymywania i określania warunków funkcjonalizacji i immobilizacji nanocząstek Fe₃O₄ wskazują na potencjalne możliwości zastosowań terapeutycznych tych materiałów.

5. Perspektywy

Celem dalszych badań będzie próba wykazania bakteriobójczego i bakteriostatycznego działania nanocząstek z przyłączonym ibuprofenem na bakterie szczepu *Lactobacillus*, będące naturalnym składnikiem flory jelitowej człowieka.

Immobilizowanie nanocząstek Fe₃O₄ wybranym lekiem stwarza możliwość badań nad użyciem takiego materiału w terapii celowanej z zastosowaniem zewnętrznego pola magnetycznego. W tym aspekcie konieczne jest zbadanie wpływu zewnętrznego pola magnetycznego na kinetykę uwalniania leku. Istotnym zagadnieniem staje się zobrazowanie oddziaływania samych nanocząstek na strukturę komórki bakteryjnej, ale również wizualizacja procesu transportu i działania leku na wybrane organizmy bakteryjne za pomocą metod mikroskopii konfokalnej oraz mikroskopii sił atomowych.

Literatura

- [1] Wiley J., Kumar C.S.S.R. (2005) *Nanotechnologies for the Life Sciences*, Wiley Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- [2] Jadhav S.A., Patil S.V. (2014) Facile synthesis of magnetic iron oxide nanoparticles and their characterization, *Front. Mater. Sci.* 8(2), 193–198.

- [3] Wu W., He Q., Jiang C. (2008) Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis and Surface Functionalization Strategies, *Nanoscale Res. Lett.* 3, 397–415.
- [4] Dias A.M.G.C, Hussain A., Marcos A.S., Roque A.C.A. (2011) A biotechnological perspective on the application of iron oxide magnetic colloids modified with polysaccharides, *Biotech. Advan.* 29, 142–155.
- [5] Bucak S., Yavuztürk B., Sezer A.D. (2012) Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Surface Modifications and Application in Drug Delivery, *Rec. Advan. Novel Drug Carrier Systems* 7.
- [6] Shimanovskii N.L. (2014) Targeted Transport of Drugs by Iron Oxide Nanoparticles, *J. Gen. Chem.* 84, 2, 391–406.
- [7] Kumar C.S.S.R., Mohammad F. (2011) Magnetic nanomaterials for hyperthermia-based therapy and controlled drug delivery, *Adv. Drug Deliv.* 63(9), 789–808.
- [8] Hadjipanayis C.G., Bonder M.J., Balakrishnan S., Wang X., Mao H., Hadjipanayis G.C. (2008) Metallic Iron Nanoparticles for MRI Contrast Enhancement and Local Hyperthermia, *Small* 4(11), 1925–1929.
- [9] Gregorio-Jauregui K.M., Pindea M.G., Rivera-Salinas J.E., Hurtado G., Saade H., Martinez J.L., Ilyina A., Lopez R.G. (2012) One-Step Method for Preparation of Magnetic Nanoparticles Coated with Chitosan, *J. Nanomat.* 2012.
- [10] Honary S., Ebrahimi P., Rad H.A., Asgari M. (2013) Optimization of preparation of chitosan-coated iron oxide nanoparticles for biomedical applications by chemometrics approaches, *Intern. Nano Let.* 3, 48.
- [11] Tassa C., Shaw S.Y., Weissleder R. (2011) Dextran-Coated Iron Oxide Nanoparticles: A Versatile Platform for Targeted Molecular Imaging, Molecular Diagnostics, and Therapy, *Acc. Chem. Res.* 44(10), 842–852.
- [12] Tao K., Dou H., Sun K. (2006) Combined investigation of experimental characterization and theoretic calculation on the structure of dextran-Fe₃O₄ clusters, *Colloids Surf. A, Physicochem. Eng. Aspects* 290, 70–76.
- [13] Ravikumar C., Kumar S., Bandyopadhyaya R. (2012) Aggregation of dextran coated magnetic nanoparticles in aqueous medium: Experiments and Monte Carlo simulation, *Colloids Surf. A, Physicochem. Eng. Aspects* 403, 1–6.
- [14] Malhorta M., Lane C., Tomaro-Duchesneau C. (2011) A novel method for synthesizing PEGylated chitosan nanoparticles: strategy, preparation, and *in vitro* analysis, *Intern. J. Nanomed.* 6, 485–494.
- [15] Dorniani D., Kura A.U., Hussein M.Z.B., Fakurazi S., Shaari A.H., Ahmad Z. (2014) Controlled-release formulation of perindopril erbumine loaded PEG-coated magnetite nanoparticles for biomedical applications, *J. Mater. Sci.* 49, 8487–8497.
- [16] Wei H., Insin N., Lee J., Han H.S., Cordero J.M., Liu W., Bawendi M.G. (2012) Compact Zwitterion-Coated Iron Oxide Nanoparticles for Biological Applications, *Nano Lett.* 12, 22–25.
- [17] Yigit M.V., Moore A., Medarova Z. (2012) Magnetic Nanoparticles for Cancer Diagnosis and Therapy, *Pharm. Res.* 29, 1180–1188.
- [18] Song L., Zhi Z., Pickup J.C. (2014) Nanolayer encapsulation of insulin-chitosan complexes improves efficiency of oral insulin delivery, *Intern. J. Nanomed.* 9, 2127–2136.
- [19] Laurent S., Forge D., Port M., Roch A., Robic C., Elst L.V., Muller R.N. (2008) Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations, and Biological Applications, *Chem. Rev.* (6), 2064–2110; (4), 2574.

-
- [20] Jiang S., Eltoukhy A.A., Love K.T., Langer R., Anderson D.G. (2013) Lipidoid-Coated Iron Oxide Nanoparticles for Efficient DNA and siRNA Delivery, *Nano Lett.* 13, 1059–1064.
- [21] Najafabadi A.H., Abdouss M., Faghihi S. (2014) Synthesis and evaluation of PEG-O-chitosan nanoparticles for delivery of poor water soluble drugs: Ibuprofen, *Mater. Sci. Eng.* 41, 91–99.
- [22] Massart R. (1981) Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media, *IEEE Trans. Magnet.* 17, 1247–1248.
- [23] Lu C., Liu P. (2011) Effect of chitosan multilayers encapsulation on controlled release performance of drug-loaded superparamagnetic alginate nanoparticles, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 23(2), 393–398.
- [24] Owczarczak A., Schroeder G. (2011) *Chemiczna funkcjonalizacja powierzchni dla potrzeb nanotechnologii*, Cursiva, wyd. I, rozdz. 5.
- [25] Narayanan D., Geena M.G., Lakshmi H., Koyakutty M., Nair S., Menon D. (2013) Poly-(ethylene glycol) modified gelatin nanoparticles for sustained delivery of the anti-inflammatory drug Ibuprofen-Sodium: An *in vitro* and *in vivo* analysis, *Nanomedicine* 9, 6, 818–828.
- [26] Miya M., Iwamoto R., Yoshikawa S. (1980 *Int. J. Biol. Macromol.* 2, 323.

ISBN 978-83-232-2988-9



9 788323 229889