

WIADOMOSCI *chemiczne*



2011

(65)

3-4

(765-766)

JUBILEUSZE

LECH PAJDOWSKI – CZŁOWIEK I UCZONY

LECH PAJDOWSKI – THE PERSON AND SCIENTIST

Krystyna Bukietyńska, Halina Podsiadły

*Wydział Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego,
ul. F. Joliot-Curie 14, 50-383 Wrocław
e-mail: ph@wchuwr.pl*



Profesor Lech Pajdowski przyjmuje gratulacje od JM Rektora Uniwersytetu Wrocławskiego, prof. dr hab. Marka Bojarskiego na przyjęciu urodzinowym zorganizowanym przez Dziekana Wydziału Chemii prof. dr hab. Leszka Z. Ciunika

Pod koniec ubiegłego roku piękny Jubileusz 90-lecia obchodził prof. dr hab. Lech Pajdowski – jeden z współtwórców wrocławskiego ośrodka chemii koordynacyjnej. Prof. Pajdowski należy do tych wybitnych polskich uczonych, którzy mimo trudnych warunków pracy – zwłaszcza w okresie powojennym – w istotny sposób przyczynili się do rozwoju swojej dyscypliny, a ich dorobek jest trwałym wkładem polskiej chemii w naukę światową. Profesor jest autorem około stu prac oryginalnych, kilku przeglądowych, a także cenionego podręcznika „Chemia ogólna”, który doczekał się aż jedenastu wydań.

Warto podkreślić, że w ówczesnych trudnych warunkach, kiedy brakowało aparatury oraz dewiz na jej zakup, przy ograniczonych kontaktach zagranicznych; podjęcie badań z dziedziny stanowiącej przedmiot zainteresowań wielu czołowych ośrodków zagranicznych wymagało wielkich umiejętności i ogromnej pracy dodatkowej, często związanej z projektowaniem, a nierzadko z wykonywaniem urządzeń pomiarowych spełniających standardy światowe.

Sądzymy, że w czasach burzliwego rozwoju chemii warto przyrzeć się dorobkowi naukowemu Profesora, tym bardziej, że zaskakująca jest jego aktualność oraz przydatność uzyskanych wyników dla współczesnej termodynamiki i struktury związków kompleksowych w roztworach. Problem ten jest obecnie szczególnie aktualny ze względu na badania roli metali i ich związków w organizmach żywych. Mają one na celu zarówno wyjaśnienie podstawowych procesów życiowych, jak i poszukiwania nowych czynników terapeutycznych i diagnostycznych.

Szczególne miejsce w badaniach prof. Pajdowskiego zajmuje chemia wanadu – struktura i właściwości termodynamiczne związków tego pierwiastka w roztworach. Pierwsza ważna praca z tej dziedziny dotyczyła badań układu: chlorek wanadu(III) – chlorooctan [1]. Autor zbadał ten układ w roztworach wodnych metodą potencjometryczną i spektrofotometryczną. Mimo tego, że badania spektrofotometryczne

nie dały jednoznacznych wyników ilościowych, to korelacja ich z danymi uzyskanymi metodą potencjometryczną pozwoliła na szczegółową identyfikację form kompleksów istniejących w roztworach wodnych. Udowodniono między innymi występowanie kompleksów dwu- i trójrdzeniowych. Istnienie takich form kompleksowych potwierdziło wyizolowanie związku $V_3[(ClCH_2COO)_4(OH)_2]$ w fazie stałej – analogu znanych już wówczas kompleksów Fe^{3+} i Ru^{3+} . Jednoznacznie istnienie w roztworach wodnych wanadu(III), kwasu chlorooctowego i różnych wielordzeniowych kompleksów V(III) będących produktami częściowej hydrolizy jonu V^{3+} , potwierdziły badania potencjometryczne i dializy [1].

W tym czasie wiodącymi ośrodkami w badaniach roztworów była Szwecja (L.G. Sillen) i Dania (N. Bjerrum, J. Bjerrum). Zainteresowanie wynikami prac młodego polskiego uczonego zaowocowało (co nie było łatwe w tym okresie) wyjazdem L. Pajdowskiego na roczny staż naukowy do prof. L.G. Sillena do Sztokholmu. Owocem tego wyjazdu była praca dotycząca hydrolizy jonów Pb^{2+} [2]. Po powrocie do Polski prof. Pajdowski powrócił do chemii wanadu. Jego pionierskie prace dotyczyły przede wszystkim hydrolizy rozcieńczonych roztworów chlorku wanadu(III) w zakresie siły jonowej 0,03–1 M NaCl dla których wyznaczył stechiometrię i wartości termodynamicznych stałych hydrolizy. Dalszym etapem tych badań były pomiary potencjometryczne i spektrofotometryczne pozwalające na wyznaczenie stałych hydrolizy VCl_3 , w szerokim zakresie stężeń jonu wanadu i z uwzględnieniem tworzenia się przy wyższych stężeniach metalu kompleksów wielordzeniowych [3].

Warto podkreślić, że mimo problemów aparaturowych, braku możliwości wykorzystania komputerów w obliczeniach oraz przy dużo mniejszej ilości ogólnych informacji o hydrolizie jonów metali; Pajdowski potrafił nie tylko zaproponować ogólny model hydrolizy trójrdzeniowego jonu pierwiastka przejściowego, ale także wyznaczyć stałe hydrolizy z taką dokładnością, że do dnia dzisiejszego wartości te są aktualne i stanowią podstawę obliczeń stałych tworzenia kompleksów wanadu(III) w roztworach wodnych.

Dla lepszego zrozumienia właściwości kompleksotwórczych wanadu(III) i określenia możliwości wiązania w pierwszej sferze koordynacyjnej innych niż tlen atomów liganda, Pajdowski podjął obszerne badania kompleksów wanadu(III) z aminokwasami i peptydami w roztworach wodnych [4] oraz z ligandami azotowymi (pirydyna i jej pochodne, benzotriazol, tiazol, pirazol itp.) w roztworach alkoholowych [5]. W badaniach tych udowodniono tworzenie jednordzeniowych kompleksów z aminokwasami i glicyloglicyną w kwaśnym roztworze wodnym oraz występowanie dwurdzeniowych kompleksów z ligandami azotowymi w roztworze alkoholowym. Istnienie wiązania wanad(III)–azot zostało poparte wyizolowaniem kompleksów w fazie stałej.

Równoległe z badaniami właściwości kompleksotwórczych d^2 elektronowego jonu V(III), L. Pajdowski podjął prace badawcze reakcji kompleksowania d^5 elektronowego jonu Fe^{3+} – realizował to głównie ze względu na analogie istniejące między charakterystycznymi dla obu jonów mechanizmami tworzenia kompleksów wielordzeniowych, zwłaszcza trójrdzeniowych [6]. Ze względu na odwracalny cha-

rakter układu redoks $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ badania takich złożonych układów w roztworach są nieco łatwiejsze i dają bardziej jednoznaczne rezultaty. Wyznaczono stałe trwałości zarówno jednordzeniowych, jak i trójrdzeniowych, oktaedrycznych kompleksów Fe^{3+} z kwasami karboksylowymi [6].

W latach siedemdziesiątych ubiegłego wieku Lech Pajdowski rozpoczął współpracę z nowopowstałym wtedy Kombinatem Górniczo-Hutniczym Miedzi w Legnicy i Lubinie oraz Instytutem Metali Nieżelaznych w Gliwicach. Jako wybitny specjalista z zakresu elektrochemii brał udział w rozwiązywaniu problemów pojawiających się przy elektrorafinacji miedzi w hucie „Legnica”. Doprowadziło to profesora Pajdowskiego do podjęcia wraz z zespołem i pracownikami hut miedzi w Legnicy i Głogowie badań w ramach programu rządowego PR-2 „Mechanizm procesu elektrorafinacji miedzi i działania inhibitorów”. Prace te miały w większości charakter badań podstawowych. Praktycznym ich celem było stałe polepszanie jakości miedzi katodowej, odzysk metali towarzyszących (głównie srebra współosadzającego się na katodzie) oraz eliminacja zanieczyszczeń katodowych. Istotne było także zapobieżenie zakłóceniom procesu elektrorafinacji spowodowanym różnymi czynnikami (np. pasywacją anod) [7].

Zbadano mechanizm działania inhibitorów procesu rafinacji. Jako podstawowy układ inhibitorów przyjęto: kolagen–tiomocznik–jon chlorkowy [8]. Wykryto, że w układzie kolagen–tiomocznik prąd i napięcie elektrolizy ulegają powolnym (okres od kilku do kilkudziesięciu minut) oscylacjom sinusoidalnym, proporcjonalnie do stopnia periodycznej pasywacji i depasywacji anod miedziowych. W miarę wzrostu stężenia jonów chlorkowych oscylacje ulegają tłumieniu, ale np. jony bromkowe tych właściwości nie wykazują [7b]. Doświadczenie Pajdowskiego w zakresie równowag związków kompleksowych pozwoliło na termodynamiczne rozwiązanie skomplikowanego układu Cu(II) -tiomocznik, który jest jednoczesnym procesem redoks i kompleksowania. Tiomocznik w środowisku silnie kwaśnym tworzy trwałe kompleksy z jonami Cu^+ , zaś część cząsteczek tego związku utlenia się do disiarczku formamidyny. Wyznaczono stałe równowagi reakcji redoks Cu^{2+} -tiomocznik oraz stałe trwałości kompleksów Cu(I) z tiomocznikiem w roztworze wodnym [9]. Należy podkreślić, że zaproponowane mechanizmy reakcji są akceptowane w literaturze naukowej do dnia dzisiejszego.

Zbadano także proces hydrolizy kolagenu wykazując, że nie tylko sam kolagen, ale i produkty jego hydrolizy (w końcowym etapie aminokwasy) poprawiają strukturę i jakość uzyskiwanej w procesie elektrorafinacji miedzi katodowej [8c].

Ujemną stroną stosowania tiomocznika jako inhibitora jest fakt, że związek ten powoduje występowanie w miedzi katodowej zanieczyszczeń siarką, co oczywiście pogarsza jej jakość. Dlatego też podjęto badania nad poszukiwaniem nowych, efektywniejszych inhibitorów. Przebadano wiele związków, między innymi były to związki posiadające donorowy atom azotu. Jon Cu^{2+} szczególnie łatwo tworzy wiązanie Me-N . Wynikiem tych badań są np. prace dotyczące reakcji kompleksowania miedzi(II) i miedzi(I) z benzotriazolem [10]. Inną grupą nowych inhibitorów bada-

nych w tym czasie były polimery takie jak: alkohol poliwinylowy, polietylenoglikol czy Triton X-100. Spośród tych związków najlepsze właściwości ma alkohol poliwinylowy [11].

Ważnym problemem w procesie elektrorafinacji miedzi był problem zużywania się inhibitorów oraz wynikająca stąd konieczność ich ilościowego oznaczania w trakcie procesu technologicznego. Prof. Pajdowski z zespołem opracował oryginalną metodę jednoczesnego oznaczania tiomocznika i kolagenu amperometrycznie, stosując do tego mikroelektrody miedziowe lub złote [12].

Warto podkreślić, że profesor Pajdowski przez cały okres swej działalności interesował się także chemią analityczną. Jego działalność dydaktyczna koncentrowała się właśnie na tej dziedzinie. Był doskonałym nauczycielem akademickim, twórcą bardzo nowatorskiego jak na owe czasy programu nauczania analizy instrumentalnej oraz odpowiednio przystosowanej do celów dydaktycznych pracowni. W swoim dorobku, poza już wspomnianą metodą oznaczenia inhibitorów Profesor ma także inne prace typowo analityczne [13].

Przedstawione opracowanie nie ma charakteru szczegółowej monografii działalności prof. Pajdowskiego. Jest to raczej zwrócenie uwagi na te wyniki, które w opinii autorek stanowią trwały wkład do chemii związków kompleksowych, bądź też są do dziś aktualne w technologii.

Profesor Pajdowski jest typowym przedstawicielem pokolenia „polskich kolumbów”. Był w partyzantce AK-owskiej, w wyniku czego półtora roku spędził w sowieckim łagrze. Po powrocie do Polski pracował jako wychowawca w Domu Dziecka we Wrocławiu, gdzie przyjechał z Lublina, obawiając się dalszych represji ze strony totalitarnego systemu. Ten ciężko doświadczony przez wojnę człowiek skończył studia i rozbudziła się w nim pasja naukowa. Nie pieniądze, lecz instynkt społeczny skłonił go do podjęcia badań dla przemysłu, gdyż wiedział, że jego wiedza może być przydatna dla nowopowstałego wtedy kombinatu miedziowego. Zawsze był wierny swoim zasadom. W opublikowanym niedawno fragmencie Jego wspomnień [14] zdanie „że nigdy nie uchybił etyce nauczyciela akademickiego” nabiera szczególnie głębokiego sensu.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] a) B. Jeżowska-Trzebiatowska, L. Pajdowski, *Roczniki Chemii*, 1957, **31**, 769;
b) B. Jeżowska-Trzebiatowska, L. Pajdowski, *Roczniki Chemii*, 1958, **32**, 1061;
c) L. Pajdowski, *Roczniki Chemii*, 1960, **34**, 763;
d) L. Pajdowski, B. Jeżowska-Trzebiatowska, *Roczniki Chemii*, 1960, **34**, 775;
e) B. Jeżowska-Trzebiatowska, L. Pajdowski, *Roczniki Chemii*, 1960, **34**, 787.
- [2] L. Pajdowski, A. Olin, *Acta Chem. Scand.*, 1962, **16**, 983.
- [3] a) L. Pajdowski, *Roczniki Chemii*, 1963, **37**, 1351;
b) L. Pajdowski, *Roczniki Chemii*, 1963, **37**, 1363;
c) L. Pajdowski, *Chemicke zvesti*, 1965, **19**, 192;

- d) L. Pajdowski, B. Jeżowska-Trzebiatowska, J. Inorg. Nucl. Chem., 1965, **28**, 443;
e) L. Pajdowski, J. Inorg. Nucl. Chem., 1966, **28**, 433.
- [4] a) L. Pajdowski, Z. Karwecka, Roczniki Chemii, 1970, **44**, 1857;
b) L. Pajdowski, Z. Karwecka, Roczniki Chemii, 1970, **44**, 2055;
c) L. Pajdowski, Z. Karwecka, Adv. Mol. Rel. Proc., 1973, **5**, 45.
- [5] a) L. Pajdowski, Z. Karwecka, K. Fred, H. Adamczak, J. Inorg. Nucl. Chem., 1974, **36**, 585;
b) Z. Karwecka, L. Pajdowski, J. Chord. Chem., 1977, **6**, 151;
c) Z. Karwecka, L. Pajdowski, Pol. J. Chem., 1988, **62**, 343.
- [6] a) S. Krzewska, L. Pajdowski, Roczniki Chemii, 1970, **44**, 249;
b) L. Pajdowski, S. Krzewska, Z. Pruchnik, Pure Appl. Chem., 1972, **269**, 275;
c) L. Pajdowski, H.M. Ratajczak, Pol. J. Chem., 1982, **56**, 49.
- [7] a) L. Pajdowski, Electrochimica Acta, 1977, **22**, 1249;
b) L. Pajdowski, J. Podsiadły, Electrochimica Acta, 1977, **22**, 1307.
- [8] a) H.M. Ratajczak, L. Pajdowski, J. Inorg. Nucl. Chem., 1974, **36**, 459;
b) H.M. Ratajczak, L. Pajdowski, M. Ostern, Electrochimica Acta, 1975, **20**, 427;
c) H.M. Ratajczak, L. Pajdowski, M. Ostern, Electrochimica Acta, 1975, **20**, 431;
d) A. Szymaszek, M.F. Rudolf, J. Biernat, L. Pajdowski, J. Inorg. Nucl. Chem., 1977, **39**, 1631;
e) A. Szymaszek, J. Biernat, L. Pajdowski, Electrochimica Acta, 1977, **22**, 359;
f) A. Szymaszek, J. Biernat, L. Pajdowski, Pol. J. Chem., 1980, **54**, 65;
g) A. Szymaszek, J. Biernat, L. Pajdowski, Electrochimica Acta, 1980, **25**, 985.
- [9] a) S. Krzewska, H. Podsiadły, L. Pajdowski, J. Inorg. Nucl. Chem., 1980, **42**, 83;
b) S. Krzewska, H. Podsiadły, L. Pajdowski, J. Inorg. Nucl. Chem., 1980, **42**, 87;
c) S. Krzewska, H. Podsiadły, L. Pajdowski, J. Inorg. Nucl. Chem., 1980, **42**, 89.
- [10] a) Z. Karwecka, L. Pajdowski, Roczniki Chemii, 1976, **50**, 1251;
b) Z. Karwecka, L. Pajdowski, Roczniki Chemii, 1977, **51**, 2017.
- [11] a) L. Pajdowski, H. Podsiadły, Chemia Stosowana XXXII, 1988, **1**, 129;
b) H. Podsiadły, L. Pajdowski, Chemia Stosowana XXXII, 1988, **3-4**, 485.
- [12] S. Krzewska, L. Pajdowski, H. Podsiadły, J. Podsiadły, Met. Trans. B, 1984, **15B**, 451.
- [13] a) L. Pajdowski, Z. Karwecka, Roczniki Chemii, 1969, **43**, 1817;
b) L. Pajdowski, S. Krzewska, Chem. Anal., 1970, **15**, 377;
c) L. Pajdowski, Z. Karwecka, Roczniki Chemii, 1973, **47**, 1113.
- [14] H. Podsiadły, K. Bukietyńska, Przegląd Uniwersytecki, grudzień 2010.

Praca wpłynęła do Redakcji 29 marca 2011

**WYKORZYSTANIE SPEKTROMETRII MAS
DO ANALIZY MODYFIKACJI NUKLEOTYDÓW
I ADDUKTÓW DNA**

**APPLICATION OF MASS SPECTROMETRY METHODS
FOR ANALYSIS OF MODIFIED NUCLEOTIDES
AND DNA ADDUCTS**

Jakub Hanus, Karol Jelonek, Monika Pietrowska

*Centrum Badań Translacyjnych i Biologii Molekularnej Nowotworów,
Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie Oddział w Gliwicach,
ul. Wybrzeże Armii Krajowej 15, 44-101 Gliwice*

Abstract

1. Addukty DNA i ich znaczenie biologiczne
2. Metody wykorzystywane do analizy adduktów DNA
3. Metody spektrometrii mas wykorzystywane do analizy modyfikacji nukleotydów
4. Wykorzystanie spektrometrii mas do analizy metylacji DNA

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane



dr Jakub Hanus (ur. 1982 r.) absolwent biologii na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach. Prace magisterską wykonał w Zakładzie Radiobiologii Doświadczalnej w Centrum Onkologii oddział w Gliwicach. Po uzyskaniu tytułu magistra kontynuował pracę naukową w Centrum Onkologii, gdzie w 2010 roku uzyskał tytuł doktora. Obecnie pracuje w University of Texas Southwestern Medical Center w Dallas, USA.



Monika Pietrowska (ur. 1974 r.) uzyskała stopień magistra z biologii na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach (1998 r.), a stopień doktora nauk medycznych w 2005 w Centrum Onkologii oddział w Warszawie. Zainteresowania naukowe obejmują wykorzystanie technik spektrometrii w analizie proteomu surowicy krwi i identyfikacji indywidualnych wzorów peptydowych pacjentów chorujących na nowotwory. Obecnie zatrudniona w Centrum Onkologii w Gliwicach kontynuuje pracę naukową.



Karol Jelonek (ur. 1983 r.) absolwent technologii chemicznej (z wyróżnieniem) na Wydziale Chemicznym Politechniki Śląskiej w Gliwicach. Prace magisterską wykonał w Zakładzie Radiobiologii Doświadczalnej w centrum Onkologii w Gliwicach. Pan mgr inż. Karol Jelonek uzyskał również tytuł magistra radiobiologii na Wydziale Onkologii University College London w Londynie. Obecnie kontynuuje pracę naukową w ramach studiów doktoranckich w Centrum Onkologii w Gliwicach.

ABSTRACT

Chemically modified nucleotides, which are not normally present in genetic material, are called DNA adducts. This type of DNA modifications (damage) is directly related to processes of mutagenesis and carcinogenesis. Elevated levels of DNA adducts present in genetic material reflect exposure of humans to carcinogenic factors and are markers of increased risk of cancer [1]. For this reason different methods useful for quantitative and qualitative analyses of DNA adducts are used in the field of cancer prevention and research (Tab. 1). Enzymatically-catalyzed methylation of cytosine, observed mostly in so called CpG islands, is a frequent endogenous modification of genetic material. Such a DNA methylation is a key factor involved in regulation of gene expression, and methylation status of oncogenes and tumor suppressor genes is an important biomarker of carcinogenesis. As such, analytical methods for assessment of DNA methylation are of great importance for molecular diagnostics of cancer.

During the last decade significant progress has been made in methods available for quantitative, qualitative and structural analyses of biological molecules. Among intensively developed tools for bioanalyses are methods of mass spectrometry. Spectrometers that are based on two methods of ionization, namely electrospray ionization (ESI) [30] and matrix-assisted laser desorption-ionization (MALDI) [48], are particularly suitable for analyses of biological macromolecules: proteins and nucleic acids. Currently available mass spectrometers, together with microscale methods for sample preparation and separation, significantly increased sensitivity and accessible mass range of analyses. New generation of "user-friendly" instruments is developed to bring the techniques directly into the workplaces of biological and clinical investigators.

This review demonstrates representative examples of mass spectrometry techniques used for qualitative analyses of nucleotide modifications and adducts present in genetic material of humans. In this field several methods base on spectrometers with electrospray ionization. Generated ions are separated according to their mass-to-charge ratio in an analyzer by electric fields; among different ion analyzers frequently used in this methods are single or triple quadrupole and ion traps (Fig. 1). Among other methods available for assessment of DNA adducts is so called Accelerator Mass Spectrometry (Fig. 2) [41]. The most frequently applied method for the assessment of DNA methylation is based on methylation-specific PCR reaction. Products of such PCR reactions are analyzed using MALDI mass spectrometry [54] (Fig. 3). In summary, new powerful methods of mass spectrometry that made available qualitative analyses of damage and modifications of human genetic material found their important place in modern biological and medical laboratories.

Keywords: carcinogenesis, molecular diagnostics, mass spectrometry, nucleotides, DNA damage, DNA adducts, DNA methylation

Słowa kluczowe: kancerogeneza, diagnostyka molekularna, spektrometria mas, nukleotydy, uszkodzenia DNA, addukty DNA, metylacja DNA

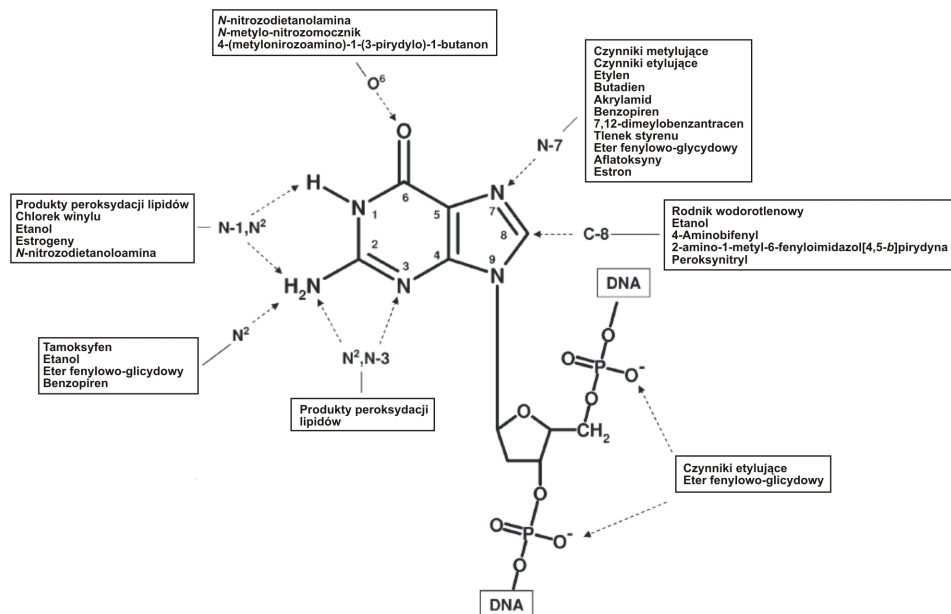
1. ADDUKTY DNA I ICH ZNACZENIE BIOLOGICZNE

Uszkodzenia struktury DNA będące wynikiem kowalencyjnej modyfikacji struktury chemicznej puryn i pirymidyn nazywane są adduktami DNA. Szacuje się, że ok. 90% związków chemicznych uważanych za mutagenne lub kancerogenne posiada zdolność, bezpośrednio lub po modyfikacji metabolicznej, wiązania z DNA i tworzenia adduktów [1]. Związki chemiczne, które powodują relatywnie proste zmiany w DNA, takie jak przyłączenie grupy alkilowej czy metylowej, są opisywane jako związki alkilujące. Do związków alkilujących badanych najszerzej w kontekście procesu nowotworzenia należą m.in. chlorek winylu, akroleina czy akrylonitryl. Addukty DNA tworzy wiele związków zawierających pierścienie aromatyczne takie jak aminy aromatyczne (aryloaminy, np. 4-aminobifenyl czy 2-aminofluoren) i wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (np. alfa-benzopiren). Związki arylujące wymagają zazwyczaj tzw. aktywacji metabolicznej do form mogących oddziaływać z DNA, które to reakcje katalizowane są przez oksydazy z rodziny cytochromów P-450 [2]. Do adduktów DNA zalicza się również uszkodzenia oksydacyjne indukowane przez tzw. reaktywne formy tlenu (ROS), czyli m.in. rodniki wodorotlenowe, tlen singletowy, nadtlenek wodoru czy nadtlenoazotyn, często będące produktami metabolizmu wewnątrzkomórkowego. Również światło UV powoduje powstawanie adduktów DNA (tzw. fotoadduktów), do których należą przede wszystkim cyklobutanowe dimery tymidynowe [3]. Wiadomo, że wysoki poziom adduktów DNA związany z behawioralną (np. palenie tytoniu), środowiskową lub zawodową ekspozycją na czynniki mutagenne jest ważnym czynnikiem ryzyka chorób nowotworowych, m.in. raków skóry, płuc, wątroby i trzustki [4–7].

W strukturze puryn i pirymidyn obecnych jest 17 potencjalnych miejsc powstania adduktów, mających charakter centrów nukleofilowych. Alkylacji może ulec również grupa OH reszty fosforanowej w obrębie szkieletu DNA. Reaktywność poszczególnych miejsc zależy od chemicznej natury cząsteczki, nukleofilowości poszczególnych miejsc i efektów sterycznych [8–10]. Rysunek 1 przedstawia miejsca pierścienia guaniny, w których mogą powstawać addukty indukowane przez różne czynniki chemiczne.

Powstały addukt DNA może zmieniać strukturę przestrzenną i właściwości fizyczne nici DNA, a miejsce uszkodzenia może nie być prawidłowo rozpoznane przez enzymy replikujące DNA lub czynniki transkrypcyjne [8]. Addukty DNA powstałe w wyniku działania kancerogenów lub reaktywnych form tlenu są uważane za pierwszy etap w inicjacji rozwoju nowotworu. Obecność adduktu DNA może prowadzić, na przykład w skutek błędu replikacji DNA w jego pobliżu, do mutacji punktowych, najczęściej o charakterze substytucji lub delecji. Mechanizmami obronnymi komórki umożliwiającymi usunięcie adduktów i odtworzenie prawidłowej struktury DNA są mechanizmy naprawy DNA [11]. Zdolność adduktów DNA do indukcji mutagenyzy i kancerogenyzy zależy od ich struktury chemicznej, stabilności i zdolności do rozpoznania uszkodzenia przez enzymy naprawiające DNA. Struktura przestrzenna danego fragmentu DNA lub kontekst lokalnej sekwencji ma

wpływ na poziom naprawy uszkodzonego nukleotydu lub powstania źle sparowanych zasad w trakcie replikacji DNA [12, 13].



Rysunek 1. Miejsca tworzenia adduktów w nukleotydzie deoksyguanozycznym
 Figure 1. Sites of adduct formation in deoxyguanine nucleotide

2. METODY WYKORZYSTYWANE DO ANALIZY ADDUKTÓW DNA

Addukty DNA powstają *in vivo* w relatywnie niewielkich ilościach, a większość z nich jest bardzo szybko usuwana z komórki. Szacuje się, że w genomie pojedynczej komórki można znaleźć jeden addukt na 10^6 do 10^9 nukleotydów. Dlatego też techniki służące do ich analizy muszą spełniać określone wymagania, z których najważniejszym jest wysoka czułość umożliwiająca wykrywanie ich nawet w bardzo niskich stężeniach. Optymalne techniki analityczne powinny również wykorzystywać niewielką ilość materiału, pozwalać na określenie wielu klas adduktów i umożliwiać szybką analizę wielu próbek.

Czynnikiem najmocniej ograniczającym możliwość badania adduktów w ludzkim DNA jest zazwyczaj jego niewielka ilość dostępna do analiz. Jedynie niektóre addukty DNA mogą być analizowane w sposób nieinwazyjny, tak jak 8-oksoguanozyna, której obecność w moczu jest wynikiem enzymatycznej naprawy DNA [14]. W standardowych procedurach DNA do oznaczeń adduktów izolowane jest z komórek, zazwyczaj z białych ciałek krwi, łożyska lub wymazu z jamy ustnej. Przy pobieraniu materiału należy zwrócić uwagę na moment pobrania próbki, ponieważ addukty

mogą zostać usunięte z materiału genetycznego komórek już w krótkim czasie po ekspozycji na czynnik uszkodzający. W badaniach populacyjnych najczęściej wykorzystywanym materiałem jest DNA uzyskany z limfocytów krwi obwodowej. Z limfocytów otrzymanych z 1 ml krwi izoluje się 20–40 µg DNA. Tak więc metody analityczne wykorzystywane do badań adduktów DNA powinny mieć czułość i specyficzność umożliwiającą wykrywanie jednego adduktu na 10^8 – 10^9 nie zmodyfikowanych nukleotydów używając przy tym niewielkiej ilości DNA (rzędu 10–100 µg) [10].

Badania adduktów DNA przeprowadza się obecnie wieloma technikami analitycznymi, jednakże każda z nich ma swoje ograniczenia w zakresie czułości, ilości wymaganego materiału, swoistości czy możliwości automatyzacji. Tabela 1 zawiera porównanie czułości szeregu technik analitycznych wykorzystywanych do analizy adduktów DNA. Należy zwrócić uwagę, że w zależności od stosowanej metody, addukty mogą być analizowane w trzech różnych formach: zasad azotowych, nukleozydów i nukleotydów. Metodą pozwalającą na wykrywanie wszystkich tych trzech form jest immunodetekcja, natomiast metoda enzymatyczna (tzw. ^{32}P -postlabeling) wymaga jako substratu deoksynukleotydów w postaci 3'-monofosforanów.

Tabela 1. Porównanie czułości technik wykorzystywanych do analizy adduktów DNA
Table 1. Comparison of sensitivity of different techniques used for analysis of DNA adducts

Metoda	Maksymalna czułość (addukt/nukleotyd)	Potrzebna ilość DNA (µg)
HPLC z detekcją elektrochemiczną lub fluorescencyjną	$1/10^8$	1–100
Immunodetekcja z wykorzystaniem swoistych przeciwciał	$1/10^8$	1–200
^{32}P -postlabeling	$1/10^{10}$	1–10
Spektrometria mas	$1/10^8$	10–100
Akceleratorowa spektrometria mas	$1/10^{12}$	10–2000

Metoda enzymatycznego znakowania zmodyfikowanych nukleotydów radioaktywnym fosforem (tzw. ^{32}P -postlabeling) jest szeroko wykorzystywaną metodą detekcji adduktów DNA ze względu na łatwość wykonania, czułość i zdolność wykrywania różnych rodzajów adduktów, przede wszystkim wywoływanych przez policykliczne węglowodory aromatyczne. Metoda ta pozwala na identyfikację jednego adduktu na 10^9 – 10^{10} nukleotydów i wymaga niewielkiej ilości DNA (1–10 µg). Wadą metody jest praca z dużymi ilościami substancji radioaktywnych, czasochłonność i niewielka możliwość automatyzacji. W przypadku braku wewnętrznego standardu, na podstawie którego określa się wydajność znakowania, oznaczania ilościowe mają jedynie orientacyjny charakter. Metoda ta nie daje również informacji o strukturze adduktów, a złożone wzory adduktów i obfitość zmian wykrywanych w DNA powodują niepewność co do identyfikacji pożądanych adduktów. W metodzie ^{32}P -postlabeling wyznakowane nukleotydy rozdziela się chromatograficznie w chromatografii cienkowarstwowej (TLC; detekcja następuje dzięki auto-

radiografii) lub wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) z detektorem radioaktywności [15, 16]. Chromatografia HPLC sprzężona z detektorami elektrochemicznymi wykorzystywana jest do wykrywania uszkodzeń oksydacyjnych (np. 8-oksoguaniny), a sprzężona z detektorami fluorescencji do wykrywania adduktów aromatycznych. W obu tych przypadkach czułość metody jest jednak znacznie niższa niż w przypadku detektorów radioaktywności, a oznaczane mogą być w ten sposób jedynie niektóre typy adduktów DNA. Innymi metodami wykorzystywanymi do detekcji znanych typów adduktów DNA są metody immunologiczne, na przykład immunohistochemia lub ELISA. Metody te pozwalają na detekcję jednego adduktu na 10^6 – 10^8 nukleotydów, a stosowane są do analizy fotoadduktów, adduktów aromatycznych i uszkodzeń oksydacyjnych. Wadą metod immunologicznych jest często niewielka swoistość stosowanych przeciwciał i duża ilość wymaganego materiału [17–20].

Ponieważ każda z wspomnianych wyżej metod posiada szereg wad, trwają próby przystosowania i wykorzystania do badania adduktów DNA nowych fizykochemicznych metod analitycznych. Jedną z takich metod jest spektrometria mas, a przykłady jej zastosowania do badania modyfikacji struktury nukleotydów omówione są w dalszej części pracy.

3. METODY SPEKTROMETRII MAS WYKORZYSTYWANE DO ANALIZY MODYFIKACJI NUKLEOTYDÓW

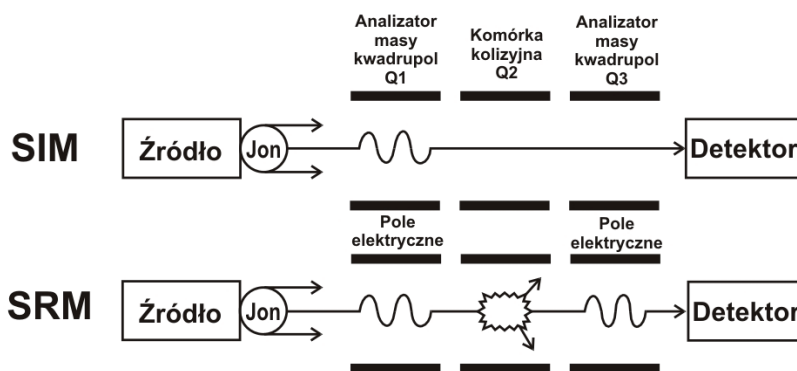
Istota spektrometrii mas polega na rozdzielaniu zjonizowanych cząstek ze względu na wartość stosunku masy – m do ładunku – z (m/z). Wysokorozdzielcze spektrometry mas umożliwiają wyznaczenie masy cząsteczkowej z dokładnością 0,01–0,001%, co umożliwia określenie składu elementarnego analizowanego jonu. Typowy spektrometr mas składa się z komory jonizacyjnej, analizatora i detektora, sprzężonych z komputerowym systemem kontroli oraz rejestracji i analizy danych. Ponieważ modyfikacje zasad azotowych skutkują zmianą masy, mogą być one łatwo wykrywane za pomocą wielu typów spektrometrów masowych [21]. Każdy spektrometr w zależności od swojej budowy wymaga innych metod przygotowania próbki, wykorzystuje różne techniki jonizacji, metody rozdziału i analizy jonów. W przypadku analizy modyfikowanych 2'-deoksynukleozydów przed analizą na spektrometrach mas niezbędna jest enzymatyczna obróbka i oczyszczenie preparatów DNA. Preparaty DNA trawione są do nukleozydów za pomocą endo- i egzodeoksyrybonukleaz, fosfodiesteraz i fosfataz [22–24]. Uzyskana mieszanina normalnych i zmodyfikowanych nukleozydów może być następnie rozdzielana chromatograficznie dla podwyższenia czułości detekcji [9, 25]. Wczesne prace z wykorzystaniem spektrometrii mas do analizy modyfikacji nukleotydów wykorzystywały jonizację przy pomocy wiązki elektronów (ang. *electron ionization*, EI). Materiał analizowano przez bezpośrednie wstrzyknięcie do komory jonizacyjnej dużej ilości kwasów nukleinowych, na przykład w celu analizy N7-metylowanej guaniny wyko-

rzystano 50 mg DNA [26]. Obecnie do analizy adduktów używa się DNA w ilości kilkudziesięciu mikrogramów, próbki hydrolizuje się enzymatycznie i frakcjonuje chromatograficznie. Najczęściej wykorzystywane metody to chromatografia gazowa z detektorem mas z chemiczną jonizacją ujemną, oraz połączenie chromatografii HPLC z jonizacją przez rozpylanie w polu elektrycznym (elektrorozpraszanie, ang. *electrospray ionization*, ESI) [9]. Chromatografia gazowa z detekcją mas z chemiczną jonizacją ujemną (GC-MS-NCI) jest z powodzeniem wykorzystywana do analizowania kilku rodzajów adduktów DNA powstających w wyniku alkilacji zasad DNA przez N-nitrozoaminy, np. O⁶-butylguanina (O⁶BuG) [27, 28]. Wadą tej metody jest konieczność tzw. derywatywacji, czyli modyfikacji w celu przekształcenia trudno lotnych związków w ich lotne i trwałe pochodne. Wprowadzona niedawno modyfikacja metody NCI, technika jonizacji pod ciśnieniem atmosferycznym (API) jest wykorzystywana do detekcji nietrwałych i termicznie labilnych adduktów DNA [17, 29].

Badania nad możliwością zastosowania spektrometrii mas do analizy uszkodzeń DNA zostały zintensyfikowane po rozpowszechnieniu urządzeń wykorzystujących technikę jonizacji przez elektrorozpraszanie. Spektrometry tego typu pozwalają na bezpośrednią analizę polarnych związków bez potrzeby ich derywatywacji i umożliwiają bezpośrednie podłączenie chromatografii ciekowej (ang. *liquid chromatography*, LC) w układzie „on-line”. Technika ESI polega na tworzeniu w polu elektrycznym aerozolu roztworu cząsteczek analizowanej substancji, które jonizują się podczas odparowania rozpuszczalnika poprzez przyłączenie lub odłączenie protonów (lub innych jonów) [30]. Proces jonizacji w systemie ESI zachodzi w warunkach ciśnienia atmosferycznego. Frakcje z LC (lub kompletna mieszanina) wprowadzane są do mającej kształt stożka komory jonizacyjnej przez kapilarną sondę, na której koniec przykładane jest wysokie napięcie w stosunku do elektrody znajdującej się na końcu stożka (zwykle pomiędzy 2 a 5 kV). Skutkuje to powstaniem gradientu potencjału w komorze jonizacyjnej. Przepływ azotu współosiowy do stalowej kapilary skutkuje powstaniem aerozolu naładowanych kropeł, a po odparowaniu rozpuszczalnika do powstania jonów w fazie gazowej, które przez stożek komory jonizacyjnej przechodzą do próżni analizatora [31, 32].

Do badań adduktów DNA w spektrometrach ze źródłem jonów typu ESI najczęściej wykorzystuje się analizatory z systemem trzech kwadrupoli. Kwadrupol to analizator zbudowany z czterech równoległych, symetrycznych prętów będących elektrodami, między którymi tworzone jest oscylujące pole elektryczne. Potrójny kwadrupol umożliwia przeprowadzenie tandemowej spektrometrii mas. W układzie takim pierwszy i trzeci kwadrupol (oznaczane jako Q1 i Q3) są analizatorami wartości m/z jonów, a drugi kwadrupol (Q2) jest komorą kolizyjną zawierającą niewielką ilość argonu, gdzie analizowane jony poddawane są fragmentacji indukowanej kolizyjnie (CID). Dwie główne metody analizy adduktów DNA w potrójnym kwadrupolu to tryb kontroli wybranych jonów (SIM) i tryb kontroli wybranych reakcji (SRM). W analizie SIM pierwszy kwadrupol ustawiony jest w taki sposób,

aby przepuszczał do detektora tylko określone jony, natomiast analiza SRM pozwala na wybranie jonu w pierwszym kwadrupolu, który następnie w Q2 ulega dysocjacji indukowanej kolizyjnie do jonów, których masy określone są w Q3 (schematycznie przedstawione na Rys. 2) [10]. Połączenie chromatografii HPLC ze spektrometrami z jonizacją typu ESI i tandemową spektrometrią mas (LC-ESI/MS/MS) wykorzystane zostało do analizy adduktów DNA powstałych na skutek działania kancerogennych nitrozoamin obecnych w dymie tytoniowym: 4-(metylnitrozoamino)-1-(3-pirydył)-1-butanon i *N*'-nitrozonornikotyina [33–35], oraz adduktów powstałych na skutek ekspozycji na policykliczne węglowodory aromatyczne [36].



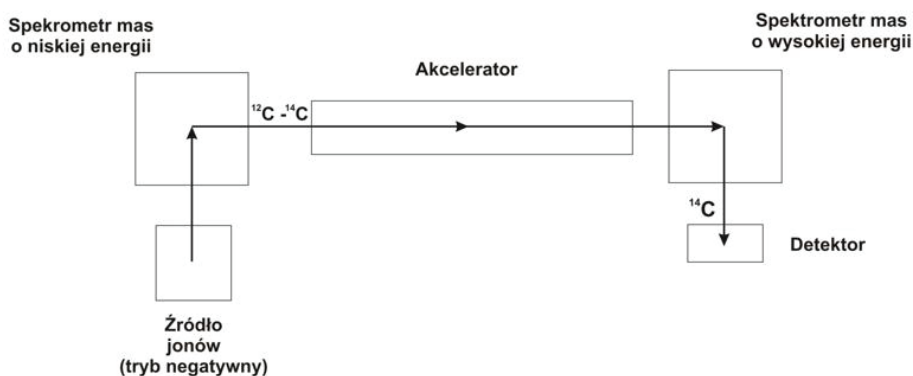
Rysunek 2. Schematyczne przedstawienie metod analizy jonów z wykorzystaniem spektrometru z trzema kwadrupolami

Figure 2. Scheme of methods of ion analysis in three-quadropole mass spectrometer

Innym rodzajem urządzenia wykorzystywanego do analizy adduktów DNA jest spektrometr mas z pułapką jonową (ang. *ion trap*, IT), umożliwiającą akumulację wybranych jonów w celu poprawy proporcji wartości sygnału analizowanej substancji do sygnału tła (tzw. szumu) [17]. Spektrometry wykorzystujące pułapki jonowe z kwadrupolowym analizatorem mas (TQ/MS) są rzadko używane do analizy adduktów DNA indukowanych w warunkach *in vivo* ponieważ wolne tempo skanowania i jego mała czułość utrudniają detekcję adduktów występujących w śladowych ilościach. Dlatego w zastosowaniach bioanalitycznych częściej wykorzystywane są spektrometry z analizatorami będącymi kwadrupolową pułapką jonową (QIT/MS). Różnica pomiędzy tymi dwoma technikami leży w sposobie działania analizatora masy. W technice TQ/MS analizator działa jako filtr masy i w jednym momencie przepuszcza tylko jony o określonej wartości m/z . Technika QIT/MS pozwala na przetrzymywanie jonów i wyrzucanie do detektora kolejnych grup jonów o określonym m/z [17]. Technika ta powszechnie wykorzystywana jest do analizy adduktów DNA będących pochodnymi 2-amino-1-metyl-6-fenylimidazol[4,5-*b*]pirymidyny (PhIP) [17, 37, 38].

Najbardziej czułą metodą spektrometrii mas, która może być wykorzystana do analizy adduktów DNA jest tzw. akceleratorowa spektrometria mas (ang. *Accelerator*

Mass Spectrometry, AMS), która umożliwia wykrywanie jednego adduktu na 10^{12} nukleotydów. Spektrometria AMS pozwala na rejestrację jonów zawierających rzadko występujące izotopy (np. ^{14}C) i ich oddzielenie od jonów zawierających pozostałe formy pierwiastka (np. ^{12}C). W klasycznej spektrometrii mas, wykrywalność metody (minimalna ilość atomów substancji analizowanej) jest silnie ograniczona poprzez wymaganie wysokiej rozdzielczości masowej koniecznej do rozdzielenia izobarów. Podstawowa różnica pomiędzy techniką AMS, a innymi metodami spektrometrii mas polega na nadaniu jonom dużego przyspieszenia poprzedzającego analizę mas. Spektrometr AMS stanowi połączenie dwóch rodzajów spektrometrów (Rys. 3). Pierwszy spektrometr mas o niskiej energii selekcjonuje jony ujemne o właściwej masie i przepuszcza je do akceleratora. Dzięki obecności akceleratora mas jony są przyspieszane i przeładowywane tj. następuje zmiana ładunku jonów na dodatni poprzez przepuszczanie tych jonów przez cienką warstwę substancji (np. cienka folia węglowa), na której zostają elektrony. Jony po przyspieszeniu trafiają do spektrometru o wysokiej energii, gdzie selekcjonowane są przez układ kwadrupola pod względem masy i ładunku, a następnie kierowane do układu magnesów ponownie rozpędzających jony i selekcjonujących je pod względem przyspieszenia zanim zostaną poddane analizie na detektorze. Drugi spektrometr selekcjonuje jony zawierające rzadko występujące izotopy.



Rysunek 3. Schemat spektrometru wykorzystującego technikę AMS (zaznaczono kierunek przepływu jonów)

Figure 3. Scheme of AMS mass spectrometer (flow of ions is shown)

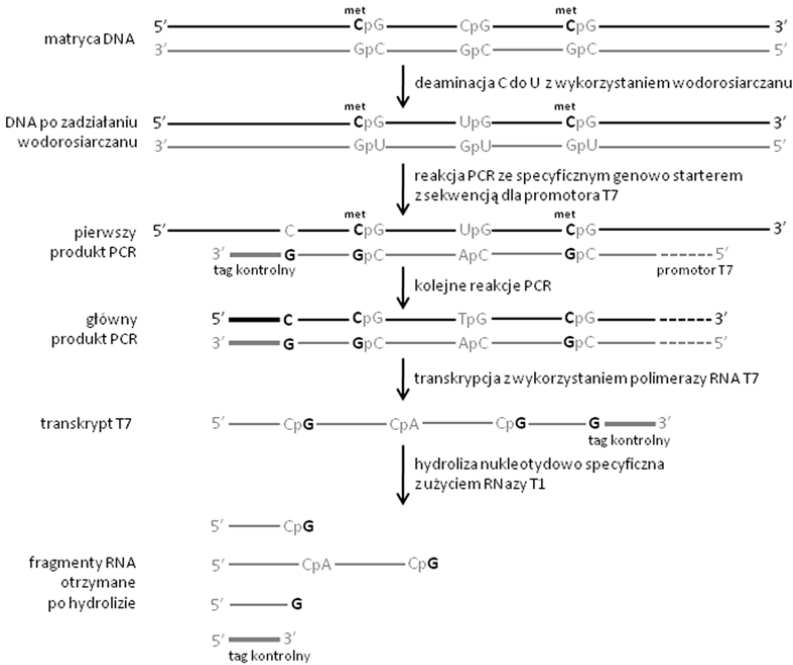
Główne ograniczenie techniki AMS polega na jej zależności od obecności izotopów ^{14}C lub ^3H w badanej cząsteczce. Oznacza to, że obecnie technika ta ograniczona jest przede wszystkim do układów eksperymentalnych, w których wykorzystuje się związki znakowane wybranymi izotopami. Jednak podejmowane są próby wykorzystania techniki AMS do wykrywania adduktów DNA indukowanych w ludzkim materiale genetycznym przez naturalne czynniki zawierające węgiel ^{14}C [39–41]. Modyfikacje tej metody pozwalają na oznaczanie 8-metylodeoksoguanozyny [42], oraz adduktów indukowanych przez oksaliplatinę [43] i adriamycynę [39].

4. WYKORZYSTANIE SPEKTROMETRII MAS DO ANALIZY METYLACJI DNA

Chemiczną modyfikacją struktury DNA występującą naturalnie w komórkach kręgowców jest metylacja cytozyny. Metylacji podlega węgiel C5 pierścienia cytozyny, w efekcie czego powstaje 5-metylocytozyna (5-mC). Szacuje się, że 5-mC stanowi około 4% wszystkich nukleotydów deoksycytozynowych w komórkach ludzkich [44]. Metylacja cytozyn jest procesem enzymatycznym, katalizowanym przez metylotransferazy DNA, w którym donorem grupy metylowej jest S-adenozylometionina. W większości przypadków metylacja dotyczy sekwencji 5'-CG-3' zwanych wyspami CpG, lecz może także dotyczyć sekwencji CpA i CpT [45, 46]. Metylacja DNA jest jednym z epigenetycznych mechanizmów kontroli ekspresji genów, a metylacja wysp CpG w okolicach promotorowych jest czynnikiem inicjującym zmiany struktury chromatyny i wyciszenie transkrypcji. Metylacja DNA jest niezbędna dla prawidłowego rozwoju organizmu, a jej nieprawidłowy przebieg może prowadzić do rozwoju wielu chorób. Błędy w metylacji DNA nagromadzające się wraz z wiekiem mogą wpływać na funkcjonowanie organizmu. Zmiany w metylacji DNA mogą aktywować onkogeny i hamować ekspresję genów supresorowych, przyczyniając się do rozwoju nowotworów. Szacuje się, że w nowotworach 5% wszystkich genów jest hipermetylowana [47].

Biorąc pod uwagę jej znaczenie funkcjonalne metylacja DNA jest potencjalnie ważnym klinicznym markerem molekularnym w diagnostyce nowotworów. Jedną z metod analitycznych stosowanych w praktyce diagnostycznej do badania metylacji DNA, również w swoistych sekwencjach genowych, wykorzystuje spektrometrię mas typu MALDI-ToF [48]. W przypadku jonizacji typu MALDI (ang. *matrix-assisted laser desorption-ionization*) cząsteczki analitu (w tym przypadku oligonukleotydy) ko-krystalizują z cząsteczkami matrycy absorbującej promieniowanie ultrafioletowe generowane przez laser; zazwyczaj jako matryce wykorzystuje się kwasy aromatyczne. W efekcie naświetlenia laserem z mieszaniny kryształów matrycy i analitu desorbowane są protonowane cząsteczki analizowanej substancji. Analizator czasu przelotu jonów (ang. *time of flight*, ToF) rejestruje czas przelotu zjonizowanych cząsteczek (zwykle wynoszący od 0,01 do 1 ms), który jest wprost proporcjonalny do pierwiastka z wartości m/z jonów poddawanych analizie. Spektrometry MALDI-ToF umożliwiają analizę cząsteczek w szerokim zakresie mas od kilkuset do kilkuset tysięcy Da [49, 50]. Metoda MALDI-ToF wykorzystywana jest do pomiaru masy cząsteczkowej produktów reakcji PCR wykrywającej obecność 5-metylo-cytozyny. W pierwszym etapie analizy DNA jest denaturowane i taktowane wodorosiarczanem, który powoduje deaminację cytozyny (C) do uracylu (U), natomiast 5-metylo-cytozyna jest oporna na działanie tego związku; konwersja C do U powoduje zmianę zapisu sekwencji nukleotydów w analizowanym genie. Następnie w reakcji PCR wykorzystującej startery swoiste dla wybranego genu i uzupełnione o sekwencję rozpoznawaną przez polimerazę RNA T7 syntetyzuje się nić, w której w miejscu komplementarnym do U występuje A, a w miejscu kom-

plementarnym do 5-me-C występuje G (produkt zawiera dodatkowo promotor polimerazy RNA T7). W kolejnych cyklach PCR powielane są produkty zawierające pary A-T w miejscu pierwotnie zajmowanym przez nie metylovaną cytozynę, oraz pary G-C w miejscu pierwotnie zajmowanym przez metylovaną cytozynę (ponadto do produktów wprowadzony zostaje tzw. tag kontrolny, wykorzystany później do kontroli hydrolizy RNA). W następnym etapie przeprowadza się transkrypcję *in vitro* katalizowaną przez polimerazę RNA T7, w wyniku której powstają cząsteczki RNA zawierające A w miejscu nie metylowanej cytozyny i G w miejscu metylowanej cytozyny. Powstałe produkty trawione są przez endorybonukleazę T1, która przecina RNA po stronie 3' guaniny. W efekcie trawienia powstają różniące się długością cząsteczki, w których prekursorach występowała metylowana (krótsze; im więcej miejsc metylacji tym więcej guanin w cząsteczce RNA rozpoznawanych przez endonukleazę T1) lub nie metylowana cytozyna (dłuższe) (schemat na Rys. 4). Wielkość cząsteczek RNA wygenerowanych w opisaney wyżej procedurze analizowana jest metodą MALDI-ToF [48, 51–55].



Rysunek 4. Schemat metody analizy metylacji DNA wykorzystującej reakcję PCR i pomiar mas produktów metodą MALDI-ToF (na podstawie [54])

Figure 4. Scheme of methods of analysis of DNA methylation that based on PCR reaction and assessment of mass of products with MALDI-ToF spectrometry (based on [54])

Do wykrywania obecności w DNA 5-metylo-cytozyny stosuje się także techniki wykorzystujące opisaney wcześniej połączenie chromatografii cieczowej z tandemową spektrometrią mas typu ESI (LC-ESI-MS/MS). Metoda ta wymaga hydrolizy

DNA do mononukleotydów (np. w obecności kwasu mrówkowego) i rozdzielanie cytozyny od 5-metylocytozyny za pomocą chromatografii wykorzystującej jako nośnik kwas fluoroantymonowy [56, 57]. Metoda ta umożliwia globalny pomiar 5-metylo-cytozyny, nie pozwala jednak na analizę swoistego wzoru metylacji w obrębie poszczególnych genów.

PODSUMOWANIE

Modyfikacje DNA, zarówno uszkodzenia nukleotydów indukowane np. przez środowiskowe związki kancerogenne, jak i endogenna metylacja cytozyn, stanowią bardzo ważny czynnik regulujący funkcjonowanie organizmu i mający istotny wpływ na ryzyko groźnych chorób (przede wszystkim chorób nowotworowych). Możliwość jakościowej i ilościowej analizy tych modyfikacji ma olbrzymie znaczenie praktyczne, nie tylko dla badań naukowych, ale również dla diagnostyki medycznej. Techniki spektrometrii mas (zwłaszcza w połączeniu z technikami chromatograficznymi), ze względu na relatywnie wysoką czułość oraz możliwość analizy złożonych mieszanin biologicznych, wydają się być bardzo dobrym narzędziem analitycznym dla badania modyfikacji materiału genetycznego. Racjonalne wykorzystanie tych narzędzi wymaga oczywiście optymalnego dostosowania właściwości różnych typów spektrometrów do konkretnej aplikacji praktycznej. Można jednak przypuszczać, że w przyszłości metody spektrometrii mas wejdą do szerszej praktyki laboratoryjnej i będą wykorzystywane dla celów medycznych również w aspekcie analizy modyfikacji i uszkodzeń materiału genetycznego.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] O.J. Schmitz, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2006, **384**, 34.
- [2] M.P. Chiarelli, O.J. Lay, *Mass Spectrom. Rev.*, 1992, **11**, 447.
- [3] D.S. Goodsell, *The Oncologist*, 2001, **6**, 298.
- [4] F. Liu, Y. He, X. Peng, W. Wang, X. Yang, *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, 2010, **11**, 1257.
- [5] K. Osawa, A. Miyaishi, K. Muchino, Y. Osawa, N. Inoue, C. Nakarai, A. Tsutou, Y. Kido, M. Yoshimura, N. Tsubota, J. Takahashi, *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, 2010, **11**, 1181.
- [6] S. Landi, *Mutat. Res.*, 2009, **681**, 299.
- [7] L. Shack, C. Jordan, CS Thomson, V. Mak, H. Moller, B.M.C. *Cancer*, 2008, **8**, 271.
- [8] J. Roboz, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2003, **14**, 79.
- [9] P.B. Farmer, K. Brown, E. Tompkins, V.L. Emms, D.J.L. Jones, R. Singh, D.H. Phillips, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2005, **207**, 293.
- [10] R. Singh, P.B. Farmer, *Carcinogenesis*, 2006, **27**, 178.
- [11] A. Sancar, L.A. Lindsey-Boltz, K. Unsal-Kaçmaz, S. Linn, *Annu. Rev. Biochem.*, 2004, **73**, 39.
- [12] P. Wiślak, *Kosmos*, 2002, **1**, 5.
- [13] J.H. Banoub, P.A. Limbach, CRC Press, 2009, **1**, 95.
- [14] Z. Davanipour, H.E. Poulsen, A. Weimann, E. Sobel, *BMC Endocr. Disord.*, 2009, **9**, 22.
- [15] J. Nair, A. Gal, S. Tamir, S. Tannenbaum, G. Wogan, H. Bartsch, *Carcinogenesis*, 1998, **19**, 2081.

- [16] K. Yang, J. Fang, F. Chung, K. Hemminki, *IARC Sci. Publ.*, 1999, **150**, 205.
- [17] A.K. Goodenough, H.A. Schut, R.J. Turesky, *Chem. Res. Toxicol.*, 2007, **20**, 236.
- [18] C.M. Dale, R.C. Garner, *Food Chem. Toxicol.*, 1996, **34**, 905.
- [19] M.C. Poirier, A. Weston, *Environ. Health Perspect.*, 1996, **104**, 883.
- [20] H. Kaur, B. Halliwell, *Biochem J.*, 1996, **318**, 21.
- [21] S. Douthwaite, F. Kirpekar, *Methods Enzymol.*, 2007, **425**, 1.
- [22] E.P. Quinlivan, J.F. Gregory, *Anal. Biochem.*, 2008, **373**, 383.
- [23] D. Mohamed, M. Linscheid, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2008, **392**, 805.
- [24] S. Mowaka, M. Linscheid, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2008, **392**, 819.
- [25] J.L. Ravanat, *FABAD J. Pharm. Sci.*, 2005, **30**, 100.
- [26] W. Lijinsky, J. Loo, A.E. Ross, *Nature*, 1968, **218**, 1174.
- [27] M. Bonfanti, C. Magagnotti, A. Galli, R. Bagnati, M. Moret, P. Gariboldi, R. Fanelli, L. Airoidi, *Cancer Res.*, 1990, **50**, 6870.
- [28] L. Airoidi, A. Galli, C. Magagnotti, R. Bagnati, M. Lolli, M. Fanelli, *Cancer Research*, 1992, **52**, 6699.
- [29] H. Koc, J.A. Swenberg, *J. Chromatogr.*, 2002, **778**, 323.
- [30] J.B. Fenn, M. Mann, C.K. Meng, S.F. Wong, C.M. Whitehouse, *Science*, 1989, **246**, 64.
- [31] N.B. Cech, C.G. Enke, *Mass Spectrom. Rev.*, 2001, **20**, 362.
- [32] W.J. Griffiths, A.P. Jonsson, S. Liu, D.K. Rai, Y. Wang, *Biochem. J.*, 2001, **355**, 545.
- [33] S.S. Hecht, P.W. Villalta, S.J. Sturla, G. Cheng, N. Yu, P. Upadhyaya, M. Wang, *Chem. Res. Toxicol.*, 2004, **17**, 588.
- [34] N.M. Thomson, R.S. Mijal, R. Ziegel, N.L. Fleischer, A.E. Pegg, N.Y. Tretyakova, L.A. Peterson, *Chem. Res. Toxicol.*, 2004, **17**, 1600.
- [35] M.K. Dennehy, R.N. Loepky, *Chem. Res. Toxicol.*, 2005, **18**, 556.
- [36] R. Singh, F. Teichert, A. Seidel, J. Roach, R. Cordell, M. Cheng, H. Frank, W.P. Steward, M.M. Manson, P.B. Farmer, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2010, **24**, 2329.
- [37] E.E. Bessette, A.K. Goodenough, S. Langouet, *Anal. Chem.*, 2009, **81**, 809.
- [38] E.E. Bessette, S.D. Spivack, A.K. Goodenough, T. Wang, S. Pinto, F.F. Kadlubar, R.J. Turesky, *Chem. Res. Toxicol.*, 2010, **23**, 1234.
- [39] K.E. Coldwell, S.M. Cutts, T.J. Ognibene, P.T. Henderson, D.R. Phillips, *Nucleic Acids Res.*, 2008, **36**, 1.
- [40] K.W. Turteltaub, J.S. Felton, B.L. Gledhill, J.S. Vogel, J.R. Southon, M.W. Caffee, R.C. Finkel, D.E. Nelson, I.D. Proctor, J.C. Davis, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1990, **87**, 5288.
- [41] K.H. Dingley, M.L. Roberts, C.A. Velsko, K.W. Turteltaub, *Chem. Res. Toxicol.*, 1998, **11**, 1217.
- [42] E.M. Tompkins, P.B. Farmer, J.H. Lamb, R. Jukes, K. Dingley, E. Ubick, K.W. Turteltaub, E.A. Martin, K. Brown, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2006, **20**, 883.
- [43] S.S. Hah, R.A. Sumbad, R.W. de Vere White, K.W. Turteltaub, P.T. Henderson, *Chem. Res. Toxicol.*, 2007, **20**, 1745.
- [44] H. Cao, Y. Wang, *Nucleic Acids Res.*, 2007, **35**, 4833.
- [45] P.M. Das, R. Signal, *J. Clin. Oncol.*, 2004, **22**, 4632.
- [46] K. Fabianowska-Majewska, *Acta Haematol. Pol.*, 2000, **31**, 399.
- [47] S.F. Gilbert, *J. Biosci.*, 2009, **34**, 601.
- [48] M. Ehrlich, M.R. Nelson, P. Stanssens, M. Zabeau, T. Liloglou, G. Xinarianos, C.R. Cantor, J.K. Field, D. Boom, *PNAS*, 2005, **102**, 15785.
- [49] M. Karas, F. Hillenkamp, *Anal. Chem.*, 1988, **60**, 2299.
- [50] C.E. Costello, *Biophys. Chem.*, 1997, **68**, 173.
- [51] P. Stanssens, M. Zabeau, G. Meersseman, G. Remes, Y. Gansemans, N. Storm, R. Hartmer, C. Honisch, C.P. Rodi, S. Böcker, D. van den Boom, *Genome Res.*, 2004, **14**, 126.

-
- [52] D. K. Vanaja, M. Ehrich, D.V. Boom, J.C. Cheville, R.J. Karnes, D.J. Tindall, C.R. Cantor, C.Y.F. Young, *Cancer Invest.*, 2009, **27**, 549.
- [53] M. Frommer, L.E. McDonald, D.S. Millar, C.M. Collis, F. Watt, G.W. Grigg, P.L. Molloy, C.L. Paul, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1992, **89**, 1827.
- [54] P. Schatz, D. Dietrich, M. Schuster, *Nucleic Acids Res.*, 2004, **32**, 1.
- [55] S.J. Clark, A. Statham, C. Stirzaker, P.L. Molloy, M. Frommer, *Nature Protocols*, 2007, **1**, 2353.
- [56] R.M. Kok, D.E. Smith, R. Barto, A.M. Spijkerman, T. Teerlink, H.J. Gellekink, C. Jakobs, Y.M. Smulders, *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2007, **45**, 903.
- [57] N. Tretyakova, R. Guza, B. Matter, *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 2008, **52**, 49.

Praca wpłynęła do Redakcji 26 stycznia 2011

**WYKORZYSTANIE REAKCJI 1,3-DIPOLARNEJ
CYKLOADDYCJI HUISGENA DO MODYFIKACJI
NUKLEOZYDÓW I OLIGONUKLEOTYDÓW**

**AN APPLICATION OF THE HUISGEN 1,3-DIPOLAR
CYCLOADDITION TO MODIFY NUKLEOSIDES
AND OLIGONUCLEOTIDES**

E. Radzikowska

*Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych Polskiej Akademii Nauk,
Zakład Chemii Bioorganicznej
ul. Sienkiewicza 112, 90-363 Łódź
e-mail: eradziko@bio.cbmm.lodz.pl*

Abstract

Wykaz stosowanych skrótów

Wstęp

1. Nukleozydy

1.1. Nukleozydy modyfikowane w obrębie nukleozasady

1.2. Nukleozydy modyfikowane w jednostce cukrowej

2. Biokoniugaty nukleozydów i oligonukleotydów

3. Oligonukleotydy

3.1. Pre- i postsymtetyczne modyfikacje DNA

3.2. 1,2,3-Triazol jako zamiennik wiązania internukleotydogo

3.3. 1,2,3-Triazol jako linker w syntezie na fazie stałej

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane

mgr Ewa Radzikowska – w roku 2007 ukończyła Wydział Chemii Uniwersytetu Łódzkiego i rozpoczęła pracę w Zakładzie Chemii Bioorganicznej CBMM PAN w Łodzi. Jej obszar zainteresowań stanowi synteza oligonukleotydów i koniugatów oligonukleotydów z peptydami.

ABSTRACT

The 1,3-dipolar cycloaddition reaction between azides and terminal alkynes, known as the Huisgen reaction, constitutes a powerful tool for the synthesis of versatile molecules containing carbon – heteroatom bond. The use of a copper(I) salt in this reaction allowed Sharpless to develop the concept of „click chemistry” [1]. This strategy is based on reactions between small units characterized by mild reaction conditions, versatility, high yields and stereospecificity.

The chemistry of nucleic acids and nucleoside analogues is undergoing rapid developments and numerous compounds from these classes of compounds are used in medicinal treatment. Analogues of nucleoside constitute a class of drugs that possesses either anticancer or/and antiviral activity (against HIV, HSV, VZV or HCV viruses) [3]. Many modified oligonucleotides show biological activity. As potential drugs oligonucleotides are employed in antisense, antigen and aptamer strategies. An antisense therapeutic agent acts on the pathogenic mRNA causing inactivation of the target whereas an antigen agent acts on DNA and aptamer on unwanted protein.

It is not surprising that number of research groups are trying to join the concept of click chemistry with nucleic acids chemistry. In this way, it is possible to obtain new molecules like base- or sugar-modified nucleosides, nucleosides, bioconjugates and oligonucleotides. The copper-catalyzed 1,3-dipolar cycloaddition CuAAC allows to functionalize DNA, for example by labelling it through attaching small molecules to DNA. Two general strategies have been developed for this purpose: presynthetic and postsynthetic labelling. In the presynthetic method nucleotide monomers are labelled before DNA synthesis and purification. In the postsynthetic strategy DNA containing small reactive groups is synthesized first and then it is conjugated with the desired molecules. CuAAC is also a convenient method for the synthesis of modified oligonucleotides in which phosphodiester linkage is replaced by 1,2,3-triazole or for a solid phase synthesis. Such molecules appear to be useful in medicine, molecular diagnostic (e.g. fluorescent dyes) or mechanistic molecular model in the future.

Keywords: 1,3-dipolar cycloaddition, analogues of nucleosides, „click chemistry”, synthesis of modified oligonucleotide, 1,2,3-triazole, bioconjugates

Słowa kluczowe: 1,3-dipolarna cykloaddycja, analogii nukleozydów, chemia „click”, synteza modyfikowanych oligonukleotydów, 1,2,3-triazol, biokoniugaty

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

CC	–	<i>click chemistry</i>
CuAAC	–	katalizowana miedzią reakcja 1,3-dipolarnej cykloaddycji
DMSO	–	dimetylosulfotlenek
DMF	–	dimetyloformamid
DIEA	–	diizopropylodetyloamina
DCM	–	chlorek metylenu
DMT	–	grupa 4,4'-dimetoksytrytylowa [bis(4-metoksyfenylo)fenylometyl]
Cy5	–	cyjanina
TMS	–	grupa trimetylosililowa
MW	–	promieniowanie mikrofalowe
NBS	–	<i>N</i> -bromoimid kwasu bursztynowego
TBDMS	–	eter <i>tert</i> -butylo-dimetylosililowy
HCV	–	wirus zapalenia wątroby typu C
cADPR	–	cykliczny adenozyndifosforan rybozy
HSV	–	wirus opryszczki pospolitej
VZV	–	wirus ospy wietrznej i półpaśca
HIV	–	ludzki wirus zespołu nabytego braku odporności
HBV	–	wirus zapalenia wątroby typu B
FAM	–	alkinylo-6-karboksyfluoresceina
PCR	–	reakcja łańcuchowa polimerazy
BNCT	–	terapia nowotworów metodą wychwytywania neutronów przez bor
TB	–	gruźlica
GDP	–	guanozynodifosforan
TMV	–	wirus mozaiki tytoniowej
THF	–	tetrahydrofuran
TBTA	–	tris[(1-benzylo-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-yl)metylo]amina

WSTĘP

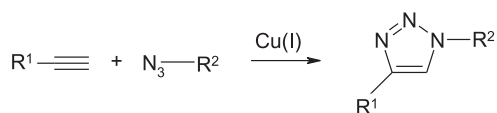
Prowadzone w latach 60. pionierskie prace Huisgena dotyczące reakcji 1,3-dipolarnej cykloaddycji azydków do alkinów stanowią podstawę opracowanej w latach 90. przez Sharplessa koncepcji tzw. „click chemistry” [1]. Koncepcja ta oparta jest na tworzeniu nowej cząsteczki poprzez łączenie mniejszych jednostek za pomocą łącznika posiadającego w swoim szkielecie heteroatom (C–X–C). Tego typu podejście może mieć zastosowanie zarówno do syntezy na małą jak i dużą skalę. Sam pomysł, jakkolwiek ciekawy nie jest niczym nowym. Został on zaczerpnięty z „matki natury”, która do syntezy wielu znaczących biomolekuł wykorzystuje ograniczoną ilość stosunkowo prostych monomerów (np. amino kwasy tworzą białka, nukleotydy – kwasy nukleinowe itd.). Do reakcji typu CC należy zaliczyć reakcje, które charakteryzuje:

- modularność tj. produkty powinny się tworzyć na drodze łączenia się prostych podjednostek,
- wysoka wydajność procesu przebiegającego w łagodnych warunkach,
- tworzenie się nieszkodliwych produktów ubocznych, które powinny być wyeliminowane na drodze innej niż chromatograficzna (np. przez krystalizację czy destylację),
- stereospecyficzność (ale niekoniecznie enancjoselektywność),
- otrzymywanie dużych bibliotek związków,
- brak rozpuszczalnika lub zastosowanie innych łatwo usuwalnych mediów,
- łatwa dostępność substratów i reagentów,
- łatwa izolacja produktów,
- dogodny profil termodynamiczny.

Mając na uwadze powyższe kryteria do reakcji typu CC zaliczyć należy następujące transformacje chemiczne:

- cykloaddycję związków nienasyconych, w szczególności reakcje 1,3-dipolarnej cykloaddycji, ale także reakcje typu addycji Dielsa-Aldera,
- reakcje substytucji nukleofilowej, a zwłaszcza reakcje otwarcia pierścienia naprężonych elektrofilowych układów heterocyklicznych, takich jak: azyrydyny, epoksydy, cykliczne siarczany, jony episulfoniowe etc.,
- „nie-aldolowe” reakcje związków karbonylowych obejmujące tworzenie się karbamidów, tiomocznika, eterów oksymowych, aromatycznych heterocykli, hydrazonów, amidów, etc.,
- addycje do wielokrotnego wiązania węgiel-węgiel, szczególnie procesy oksydatywne takie jak epoksydacja, niektóre warianty addycji Michaela, diuwodornienie (asymetryczne uwodornienie).

Jednakże w chwili obecnej termin „click chemistry” odnosi się praktycznie wyłącznie do katalizowanej miedzią reakcji 1,3-dipolarnej cykloaddycji Huisgena (CuAAC, ang. *copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition*, Schemat 1) [2]. Pomimo tego swoistego ograniczenia reakcje typu CuAAC znalazły swoje trwałe miejsce w chemii kwasów nukleinowych stanowiąc użyteczne narzędzie do otrzymywania różnorodnych pochodnych tych biomolekuł.



anti 1,4-dipodstawiony 1,2,3-triazol

Schemat 1. Reakcja 1,3-dipolarnej cykloaddycji pomiędzy azydkami, a alkinami

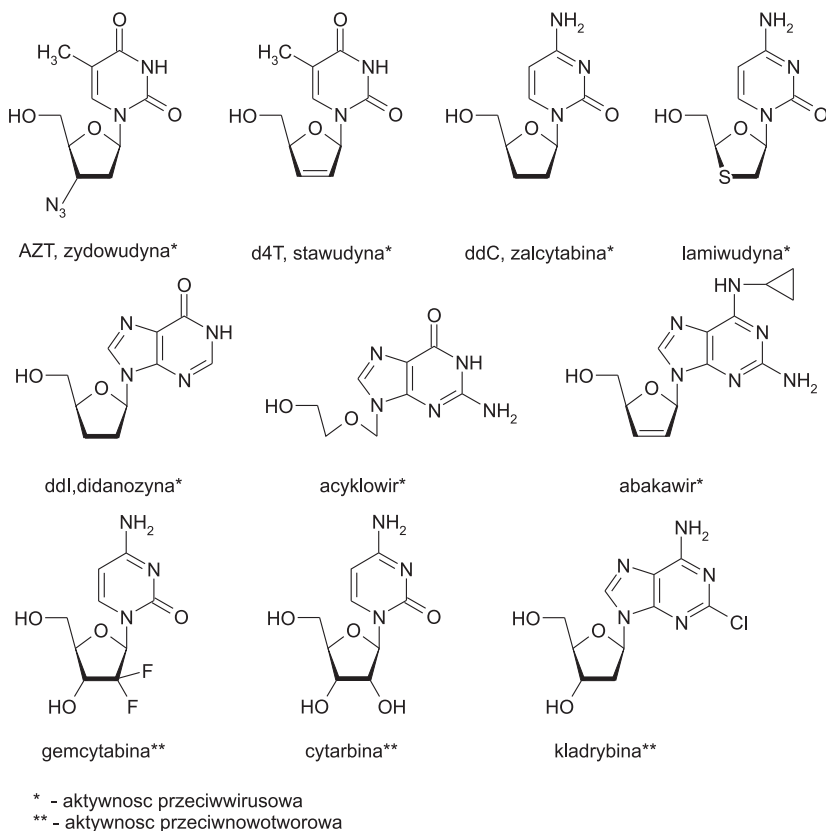
Scheme 1. 1,3-Dipolar cycloaddition between azides and alkynes

Celem niniejszego artykułu jest zaprezentowanie wybranych przykładów zastosowania reakcji CuAAC w chemii nukleozydów, nukleotydów i kwasów nukleinowych.

Jakkolwiek w *Wiadomościach Chemicznych* w 2005 roku ukazał się interesujący artykuł opisujący zastosowanie koncepcji „click chemistry” w różnych obszarach chemii z uwzględnieniem chemii medycznej i biologii molekularnej, to nie obejmował on zagadnień będących przedmiotem mojego opracowania.

1. NUKLEOZYDY

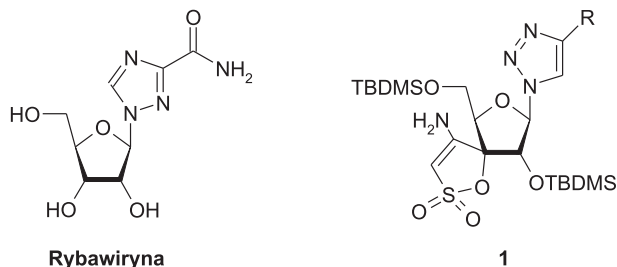
W chemii nukleozydów reakcja CuAAC pozwala na otrzymywanie pochodnych zawierających modyfikację zarówno w obrębie nukleozasady jak i reszty cukrowej, a także na uzyskiwanie biokoniugatów. Strukturalna różnorodność pochodnych nukleozydowych (Rys. 1) [3] wykazujących aktywność przeciwwirusową i przeciwnowotworową pozwala sądzić, że zastosowanie podejścia „click chemistry” umożliwi znalezienie nowych terapeutyków.



Rysunek 1. Analogii nukleozydów o właściwościach terapeutycznych
 Figure 1. Therapeutic nucleoside analogues

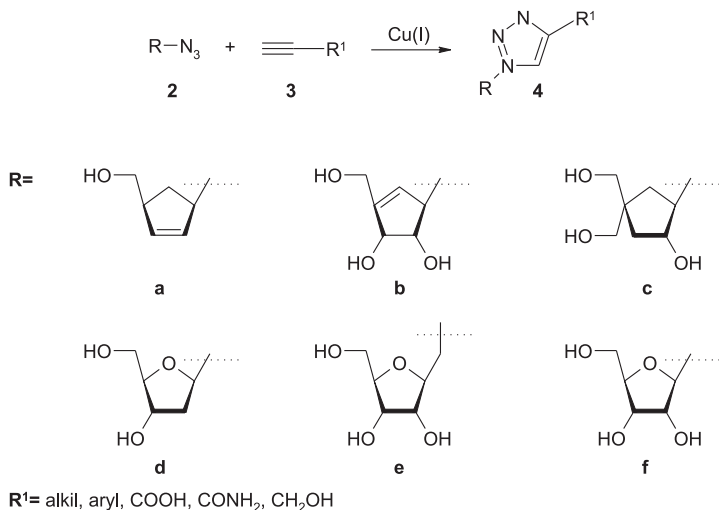
1.1. NUKLEOZYDY MODYFIKOWANE W OBRĘBIE NUKLEOZASADY

Zastosowanie reakcji CuAAC do syntezy analogów nukleozydów stało się szczególnie interesujące z chwilą odkrycia klinicznie użytecznych związków takich jak Rybawiryna [4] czy **1** (Rys. 2) [5].



Rysunek 2. Analogii nukleozydów posiadające pięciocłonową zasadę heterocykliczną
 Figure 2. Nucleoside analogues with five membered heterocyclic base

Istotną cechą tych związków jest to, że posiadają one w miejscu zasady azotowej pierścień triazolowy, którego dogodną metodę syntezy stanowi właśnie 1,3-dipolarna cykloaddycja. W tym wypadku utworzenie pierścienia triazolowego najłatwiej przeprowadzić na drodze reakcji odpowiedniego β -1'-azydocukru **2** z różnego typu pochodnymi alkinowymi **3** (Schemat 2) [6].

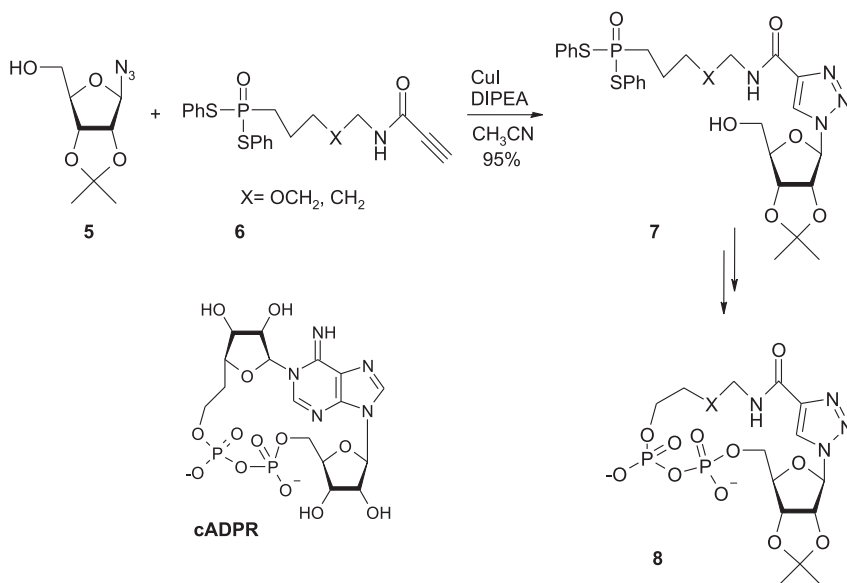


Schemat 2. Synteza modyfikowanych nukleozydów posiadających pierścień 1,2,3-triazolowy w miejscu zasady azotowej

Scheme 2. Synthesis of modified nucleosides bearing 1,2,3-triazole base

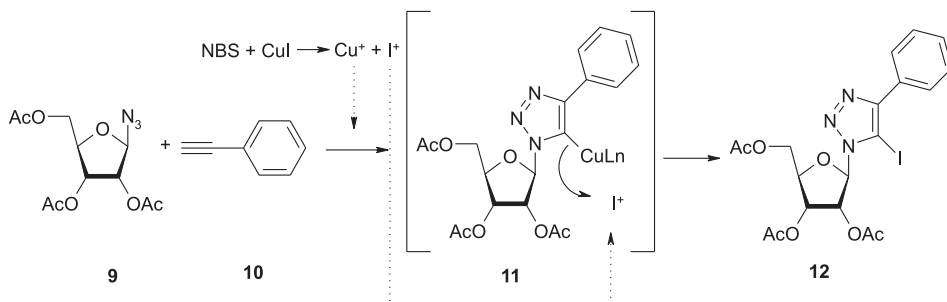
Tego typu podejście zastosował Li i współpracownicy [7] do syntezy związku **8** naśladującego cykliczny adenozynodifosforan rybozy (cADPR, Schemat 3). Związek **8** podobnie jak cADPR indukuje uwalnianie jonów Ca²⁺ w ludzkich komórkach Jurkat T (nieśmiertelna linia komórkowa limfocytów T).

Ci sami autorzy opracowali tzw. „one pot” metodę otrzymywania 5-jodopodstawionych 1,2,3-triazoli [8]. Odpowiednie azydki **9** poddali reakcji z fenyloacetylenem (**10**) w obecności CuI i NBS. Tworzący się w trakcie procesu cykloaddycji związek przejściowy **11** o strukturze karboanionu był wychwytywany przez generowane *in situ* jony I⁺ i Cu⁺ (Schemat 4).



Schemat 3. Synteza związku 8 („naśladowcy” cyklicznego adenozyno-difosforanu rybozy)

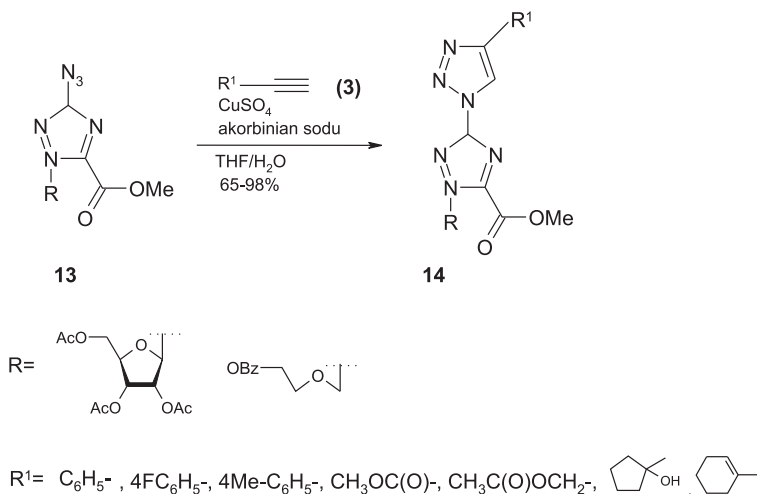
Scheme 3. Synthesis of 8 (the mimic of cyclic adenosine diphosphate-ribose)



Schemat 4. Prawdopodobny mechanizm tworzenia się związku 12

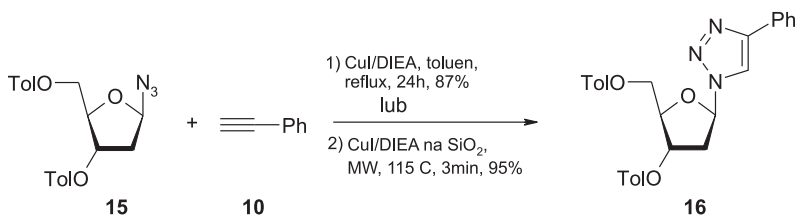
Scheme 4. Plausible mechanism of formation of compound 12

Podobnie Xia i współpracownicy, stosując cykloaddycję Huisgena, otrzymywali bis-triazoilo-nukleozydy **14** w reakcji związków **13** z pochodnymi alkinowymi wobec CuSO₄ i askorbinianu sodu (Schemat 5) [9]. Reakcje prowadzone były w mieszaninie wody i THF, a produkty uzyskiwano z dobrymi wydajnościami. Warto zaznaczyć, że bis-triazoilo-nukleozydy zsyntezowano pod kątem badania ich aktywności przeciw wirusowi mozaiki tytoniowej (TMV).



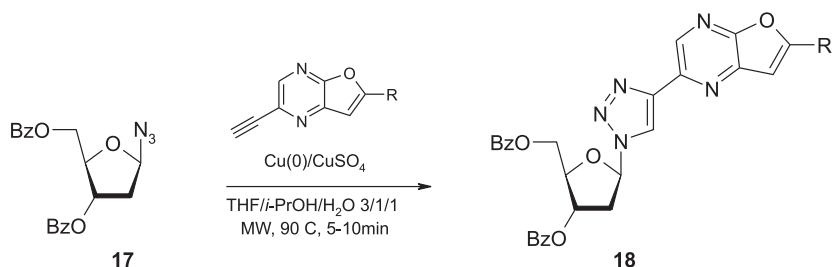
Schemat 5. Synteza bis-triazoilo nukleozydów
 Scheme 5. Synthesis of bis-triazolyl nucleosides

Zastosowanie w reakcji CuAAC promieniowania mikrofalowego (MW) pozwoliło w niektórych przypadkach znacząco skrócić czas trwania procesu. Guezguez zsyntezował związek **16** stosując zarówno klasyczną metodologię jak i wykorzystując promieniowanie mikrofalowe [10]. Tak zmodyfikowana procedura prowadziła do zmniejszenia czasu reakcji z 24 godzin do 3 minut (Schemat 6).

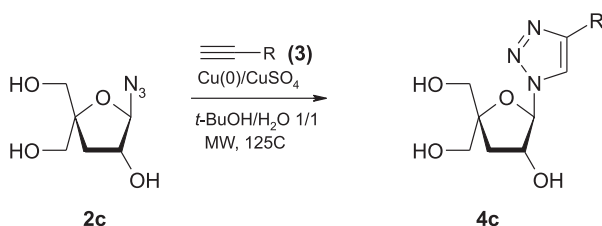


Schemat 6. Synteza analogów nukleozydów posiadających w szkieletcie układ 4-podstawiony 1,2,3-triazolowy
 Scheme 6. Synthesis of 4-substituted 1,2,3-triazolo nucleoside analogues

Podobnych obserwacji dokonali Ermolat'ev i Broggi w syntezach odpowiednio związków **18** (Schemat 7) [11] i **4c** (Schemat 8) [12].

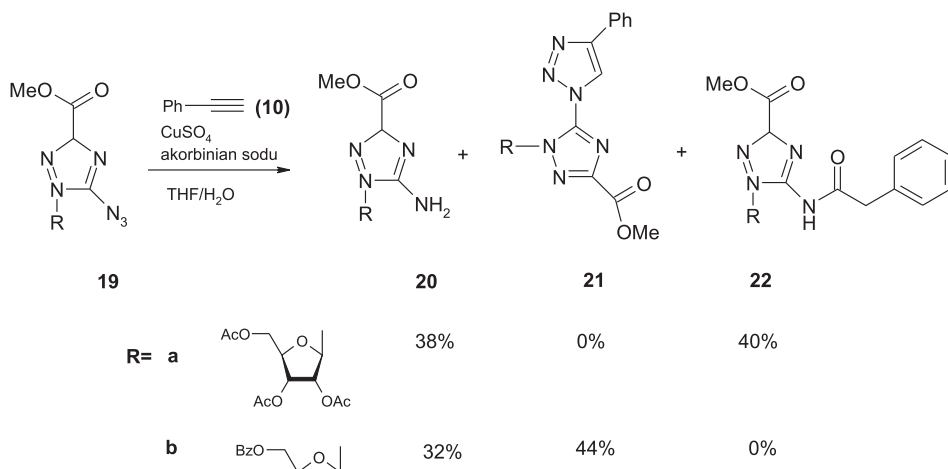


Schemat 7. Synteza 1,2,3-triazolowych analogów nukleozydów wspomagana promieniowaniem mikrofalowym
 Scheme 7. Synthesis of 1,2,3-triazolo nucleoside analogues via microwave irradiation



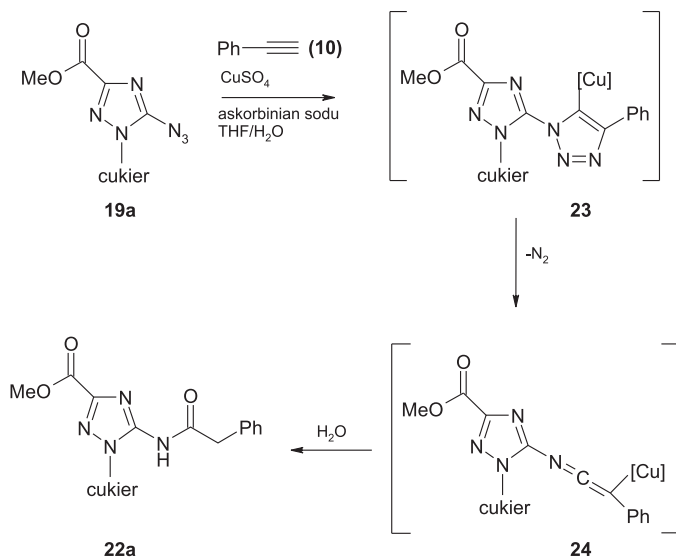
Schemat 8. Synteza 1,2,3-triazolowych analogów nukleozydów wspomagana promieniowaniem mikrofalowym
 Scheme 8. Synthesis of 1,2,3-triazolo nucleoside analogues via microwave irradiation

Należy zaznaczyć, że w niektórych przypadkach reakcji CuAAC towarzyszyło tworzenie się nieoczekiwanych produktów ubocznych. Przykładem może być reakcja związku **19** z fenylacetylenem (**10**) (Schemat 9) [13].



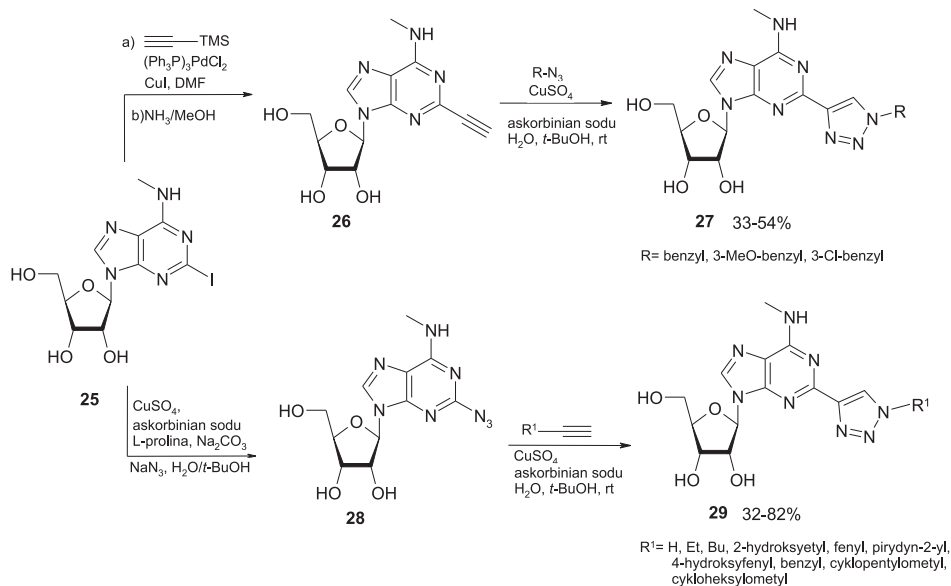
Schemat 9. Reaktywność azydo związków w reakcji 1,3-dipolarnej cykloaddykcji CuAAC
 Scheme 9. Reactivity of azido compounds in CuAAC reaction

W przypadku użycia arylowanej pochodnej cukrowej **19a** obserwowano wyłącznie tworzenie się produktów ubocznych tj. aminy **20a** i amidu **22a**. Natomiast nie powstawał pożądaný związek **21a**. Reakcja inaczej przebiegała dla pochodnej **19b** gdzie w przewodzie otrzymano związek **21b**, chociaż w mieszaninie reakcyjnej obecny był również będący produktem redukcji związek **20b**. Autorzy tłumaczyli tę zaskakującą reaktywność tym, że reszta cukrowa stanowi dostateczną zawadę przestrzenną, która czyni elektrono-ubogie heterocykle, posiadające grupę azydkową, niezdolnymi do reakcji 1,3-dipolarnej cykloaddycji. Natomiast tworzenie związku **22a** zachodziło poprzez przejściową iminę **24** (Schemat 10).



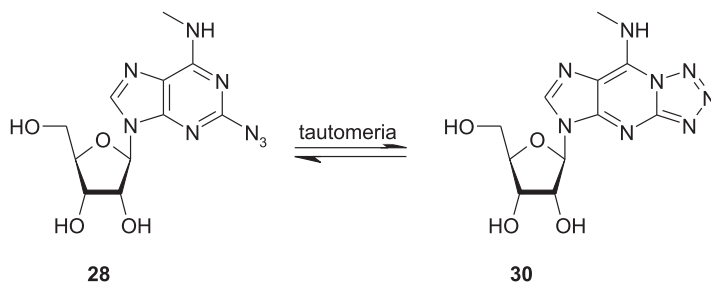
Schemat 10. Prawdopodobny mechanizm tworzenia się związku **22a**
 Scheme 10. Plausible mechanism of preparation of compound **22a**

Jednakże inna grupa badaczy zademonstrowała, że reakcja CuAAC może również zachodzić z udziałem elektrono-ubogich pierścieni takich jak np. puryny. Cosyn i współpracownicy [14] zaprezentowali syntezę związków **27** i **29** wychodząc z pochodnej adenozyiny **25**, która na potrzeby reakcji CuAAC została zmodyfikowana w taki sposób, aby zawierała grupę azydkową lub alkinową w pozycji 2 nukleozasady. Grupa alkinowa w pochodnej **26** była wprowadzona w reakcji sprzęgania Sonogashiry natomiast grupa azydkowa w pochodnej **28** w reakcji substytucji nukleofilowej z NaN₃ w obecności Cu(I) (Schemat 11).



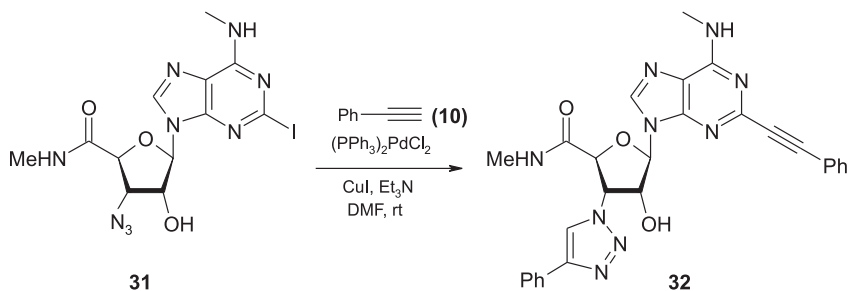
Schemat 11. Synteza 2-(1,2,3-triazoilo)-pochodnych adenozyiny
 Scheme 11. Synthesis of 2-(1,2,3-triazoly)adenosine derivatives

Uzyskane w niektórych przypadkach niskie wydajności docelowych związków **29** autorzy tłumaczyli tym, że tworzący się związek **28** występuje w równowadze tautomerycznej ze związkiem **30** (Schemat 12). Obserwacja ta pozostaje w zgodzie z faktem, że podstawione grupą azydkową π -elektronoubogie heterocykle azotowe ulegają spontanicznej cyklizacji do odpowiednich skondensowanych triazoli [15].



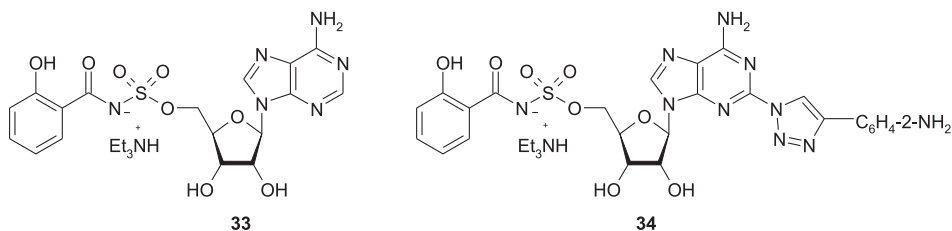
Schemat 12. Tautomeria azydo/tetrazolowa związku **28**
 Scheme 12. Azido/tetrazole tautomerism of compound **28**

Ten sam zespół wykazał, że zastosowanie warunków reakcji sprzęgania Sonogashira, w przypadku obecności w cząsteczce ugrupowania azydkowego w pozycji 3' reszty cukrowej (związek **31**), pozwala również na przebieg 1,3-dipolarnej cykloaddykcji Huisgena (Schemat 13) [16]. Źródłem miedzi w tym przypadku był CuI.



Schemat 13. Cykloaddycja Huisgen'a indukowana w warunkach reakcji sprzęgania Sonogashira
 Scheme 13. Huisgen cycloaddition induced by Sonogashira condition

Reakcja CuAAC była również wykorzystywana do poszukiwania nowych leków [17]. Związek **33** stanowiący tzw. strukturę wiodącą (*ang. lead compound*) został zmodyfikowany poprzez przyłączenie do węgla C-2 puryny 1,2,3-triazoli podstawionych w pozycji 4. Otrzymane w ten sposób związki **34** w granicach stężeń od submikromolarnych do mikromolarnych wykazywały własności przeciwgruźlicze (inhibitory enzymu katalizującego syntezę bakteryjnego chelatora żelaza).

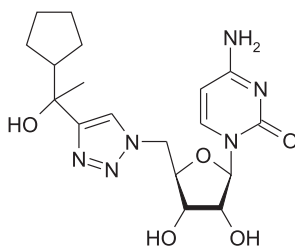


Rysunek 3. [N-(salicylo)sulfamoiolo]adenozyna i jej analog modyfikowany pierścieniem 1,2,3-triazolowym w pozycji C-2

Figure 3. [N-(salicyl)sulfamoyl]adensine and its analogue modified in the C-2 position with 4-substituted 1,2,3-triazole ring

1.2. NUKLEOZYDY MODYFIKOWANE W JEDNOSTCE CUKROWEJ

Reakcja 1,3-dipolarnej cykloaddycji Huisgena katalizowana miedzią stanowi również dogodną metodę syntezy pochodnych nukleozydowych zawierających modyfikacje w obrębie pierścienia cukrowego. Na tej drodze otrzymano różnorodne pirymidynowe [18] i adenzynowe analogi [19] z wysoką regioselektywnością. Związek **35** będący pochodną cytydyny okazał się być inhibitorem α -2,3-sialylotransferazy (Rys. 4) [20].

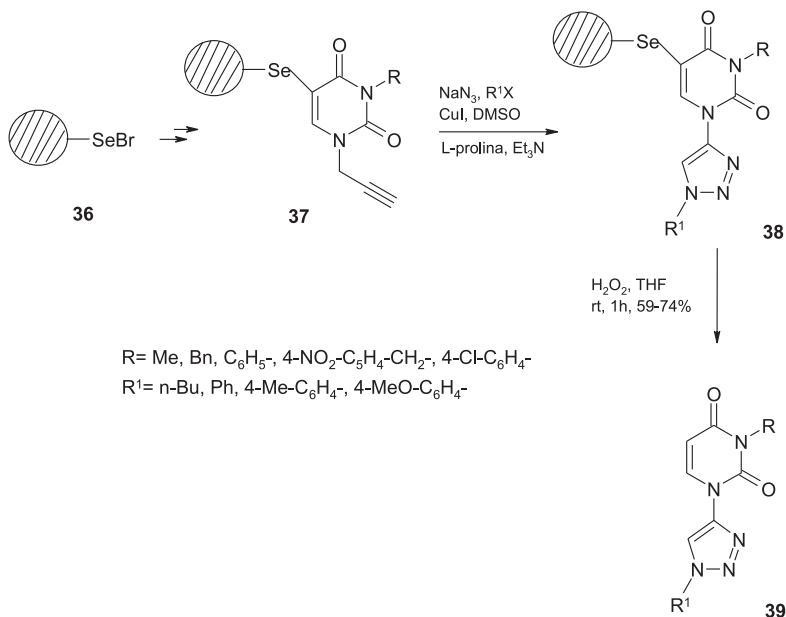


35

Rysunek 4. Inhibitor a-2-3-sialilotransferazy

Figure 4. Inhibitor of a-2-3-sialyltransferase

W ostatnim czasie wzrosło zainteresowanie analogami nukleozydów, w których pierścień furanozowy zastąpiony został przez resztę heterocykliczną. Jak pokazały liczne badania, związki tego typu mogą wykazywać zarówno przeciwwirusową jak i przeciwnowotworową aktywność. Spostrzeżenia te skłoniły Cao i współpracowników do otrzymania biblioteki analogów uracylu [21]. Reakcje CuAAC prowadzone były na fazie stałej z wykorzystaniem polimerowej żywicy (Schemat 14). Finalne produkty **39** były odcinane od złoża za pomocą H_2O_2 .

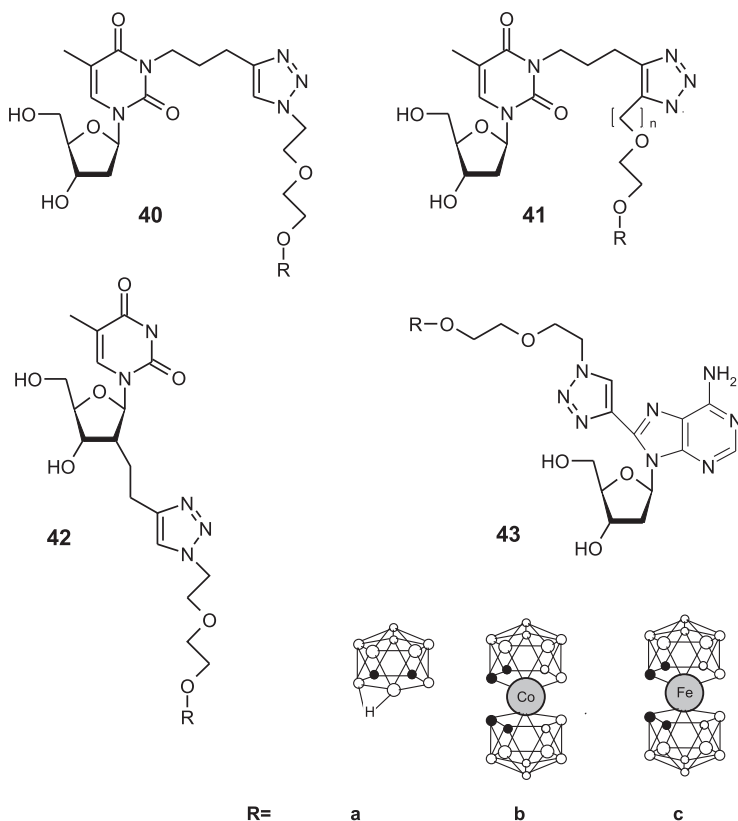


Schemat 14. Synteza na fazie stałej analogów nukleozydów modyfikowanych pierścieniem 1,2,3-triazolowym
 Scheme 14. Solid-phase synthesis of nucleoside analogues modified with 1,2,3-triazole ring

2. BIKONIUGATY NUKLEOZYDÓW I OLIGONUKLEOTYDÓW

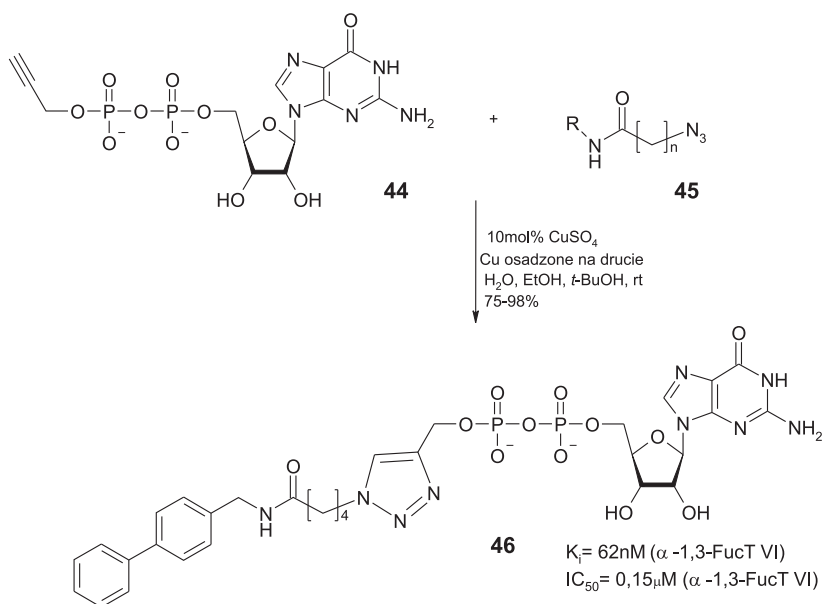
Reakcje 1,3-dipolarnej cykloaddycji azydków do alkinów znalazły również zastosowanie w syntezie biokoniugatów. Prostota i skuteczność tej reakcji sprawia, że stała się ona atrakcyjną metodą tworzenia kowalencyjnego wiązania pomiędzy dwoma cząsteczkami w wyniku czego zostaje utworzona biocząsteczka o zwiększonym biopowinowactwie, zmienionej aktywności i hydrofobowości. Szeroko pojęta definicja biokoniugacji obejmuje modyfikacje białek czy kwasów nukleinowych i polega na inkorporacji fluoroforów, ligandów, chelatów, radioizotopów, cząstek zwiększających powinowactwo względem celu, a także dotyczy fuzji dwóch białek czy połączenia kompleksu węglowodanu z peptydem. Siła biokoniugacji tkwi w możliwości znakowania *in vivo*.

Dzięki zastosowaniu reakcji CuAAC w zespole Leśnikowskiego przeprowadzono syntezę koniugatów pirymidynowych i purynowych zawierających kompleksy karboranowe **40–43a** i metalokarboranowe **40–43b,c** [22] (Rys. 5). Związki tego typu mogą znaleźć zastosowanie jako źródło boru w terapii BNCT (*ang. Boron Neutron Capture Therapy*) nowotworów.



Rysunek 5. Koniugaty nukleozydów zawierające kompleksy karboranowe i metalokarboranowe
 Figure 5. Nucleoside conjugates containing carborane and metalocarborane complexes

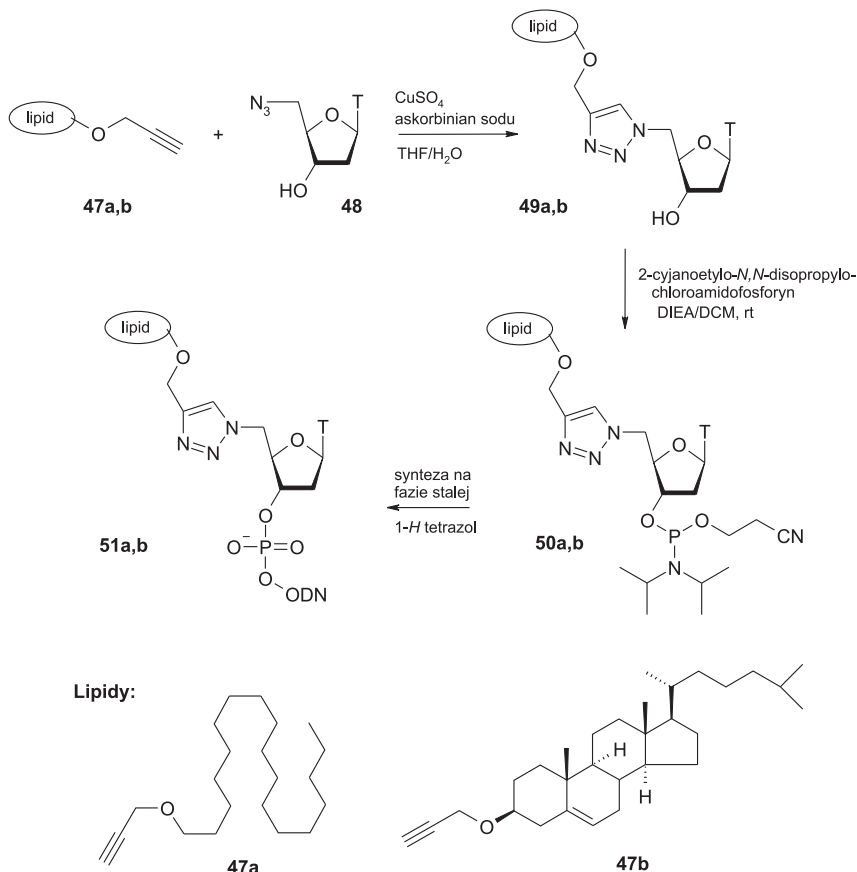
Innym przykładem syntezy potencjalnego leku w oparciu o reakcję tworzenia triazoli z azydków i alkinów jest wyselekcjonowanie inhibitora fukozylotransferazy – enzymu odpowiedzialnego za katalizę finalnego etapu glikozylacji w procesie biosyntezy i ekspresji wielu ważnych sacharydów. Glikoproteiny i glikolipidy występujące na powierzchni komórki (składnik błon komórkowych i wielu receptorów powierzchniowych), pośredniczą w szeregu procesów związanych z rozpoznawaniem komórkowym, embriogenezą, odpowiedzią immunologiczną i metastazą. Lee i współpracownicy z biblioteki związków wytworzonych przy pomocy CuAAC zidentyfikowali nanomolarny inhibitor fukozylotransferazy [23]. Autorzy łącząc ze sobą acetylowe pochodne GDP **44** z azydkami **45** (Schemat 15) otrzymali w ten sposób 85 związków, które poddali screeningowi bezpośrednio z mieszaniny reakcyjnej. Najlepszym inhibitorem okazał się związek **46**.



Schemat 15. Synteza potencjalnych inhibitorów fukozylotransferazy w reakcji CuAAC
 Scheme 15. Synthesis of potential inhibitors of fucosyl-transferases by CuAAC reaction

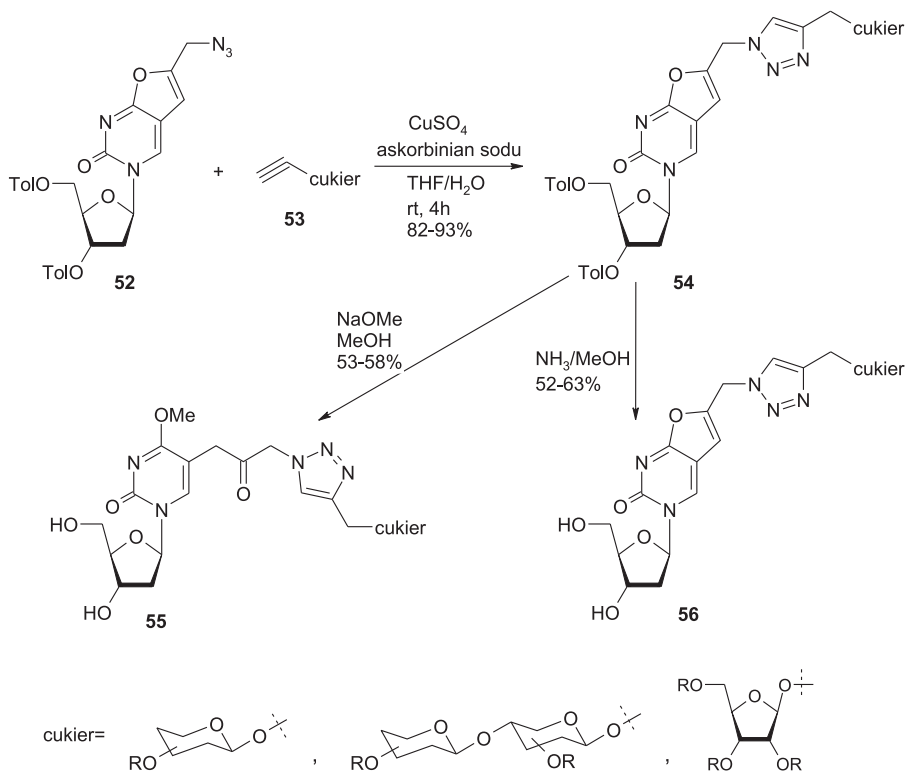
Otrzymanie lipidowych koniugatów oligonukleotydów jako potencjalnych inhibitorów procesu translacji wirusa zapalenia wątroby typu C (HCV) stanowi inny ciekawy przykład wykorzystania „click chemistry”. Alkino-modyfikowane lipidy będące pochodnymi cholesterolu **47a** i oktadekanolu **47b** poddawano reakcji z 5'-azydo-5'-deoksytymidyną **48** w obecności askorbinianu sodu i katalitycznych ilości siarczynu miedzi(I) (Schemat 16). Uzyskane w ten sposób związki **49a** i **49b** zostały w kolejnym kroku przekształcone w amidofosforiny **50a,b**. Następnie związki te były sprzęgane z przyczepionym do fazy stałej łańcuchem oligonukleotydowym będącym 17-merowym, 2'-*O*-metylorybonukleotydem antysensowym wiążącym się

specyficznie na 5'-końcu wirusowego RNA [24]. Modyfikacja lipidowa, co potwierdziły badania, znacząco zwiększyła lipofilowość użytych oligonukleotydów.



Schemat 16. Synteza koniugatów lipid-oligonukleotyd
Scheme 16. Synthesis of lipid-oligonucleotide conjugates

Innym również interesującym przykładem wykorzystania reakcji 1,3-dipolarnej cykloaddycji do poszukiwania związków o potencjalnej aktywności biologicznej, są badania Jina i współpracowników dotyczące projektowania leków przeciw wirusowi ospy wietrznej i półpaśca (VZV) [25]. W celu polepszenia rozpuszczalności i rozpoznania molekularnego aktywnych bicyklicznych furo[2,3-d]pirymidyno nukleozydów autorzy otrzymali serię koniugatów węglowodanów z analogami tymidyny. W wyniku reakcji związku **52** z propargilowymi pochodnymi cukrowymi **53**, w obecności CuSO_4 i askorbinianu sodu, otrzymano odpowiednie 1,4-dipodstawione 1,2,3-triazole **54** (Schemat 17). Związki te w następnym kroku były przekształcane za pomocą metanolanu sodu w formy otwarte ketonów **55** lub w struktury zamknięte **56** w przypadku zastosowania metanolowego roztworu amoniaku. Związki **55** i **56** są obecnie poddane badaniom biologicznym.



Schemat 17. Synteza koniugatów węglowodanów z pochodnymi tymidyny
 Scheme 17. Synthesis of carbohydrate-thymidine analogue conjugates

3. OLIGONUKLEOTYDY

3.1. PRE- I POSTSYNTETYCZNE MODYFIKACJE DNA

Znane są także liczne prace dotyczące wykorzystania reakcji CuAAC do otrzymywania znakowanego DNA, które między innymi mogłyby znaleźć zastosowanie jako sondy molekularne czy znaczniki fluorescencyjne. Do znakowania oligonukleotydów wykorzystywana jest strategia presyntetyczna lub postsyntetyczna [26].

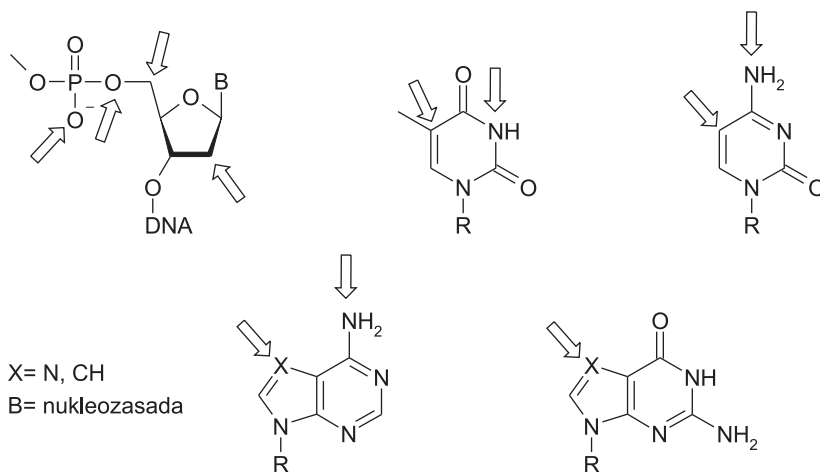
Pierwsza z nich obejmuje znakowanie monomerów nukleotydowych używanych do syntezy DNA za pomocą standardowo stosowanej metody amidofosforynowej. Stąd też wynika konieczność uzyskania odpowiednio zmodyfikowanego amidofosforynu, który musi być stabilny w warunkach prowadzenia reakcji na fazie stałej (warunki zasadowe, kwasowe, utleniające). Ponadto atom fosforu(III) w amidofosforynowym ugrupowaniu, który jest wrażliwy na utlenienie do fosforu(V), musi być stabilny w obecności znacznika. Alternatywną drogą presyntetycznej strategii jest

stosowanie wyznakowanych trójfosforanów, które są włączane do łańcucha DNA przez polimerazę w reakcji PCR. Ograniczeniem tej metodologii jest konieczność stosowania tylko takich modyfikacji, które są substratami dla polimerazy.

W strategii postsyntetycznej wprowadza się małe grupy reaktywne do DNA, które następnie są sprzęgane ze znacznikiem po zakończeniu procesu syntezy i deprotekcji DNA. Najczęściej stosuje się grupy aminowe, które później reagują z aktywnymi grupami estrowymi znacznika. Wadą tego podejścia jest niska wydajność sprzęgania i konieczność oczyszczania DNA techniką HPLC, co sprawia, że tworzenie znakowanych w ten sposób oligonukleotydów staje się bardzo kosztowne.

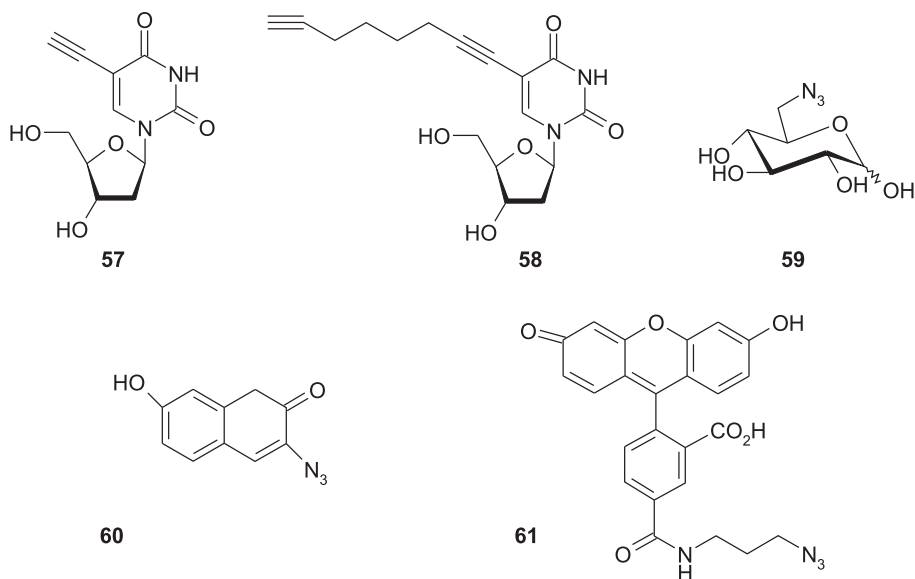
Zalety reakcji typu „click chemistry” w syntezie modyfikowanych oligonukleotydów to:

- wysoka wydajność,
- łagodne warunki prowadzenia syntezy,
- szerokie spektrum miejsc (zarówno w nukleozadach, reszcie cukrowej i fosforanowej) pozwalających na przyłączenie grupy azydkowej i alkinylowej do DNA (Rys. 6).



Rysunek 6. Możliwe miejsca przyłączenia grupy azydkowej lub alkinowej do DNA
Rysunek 6. Possible position for modification of DNA by attachment of azides or alkynes

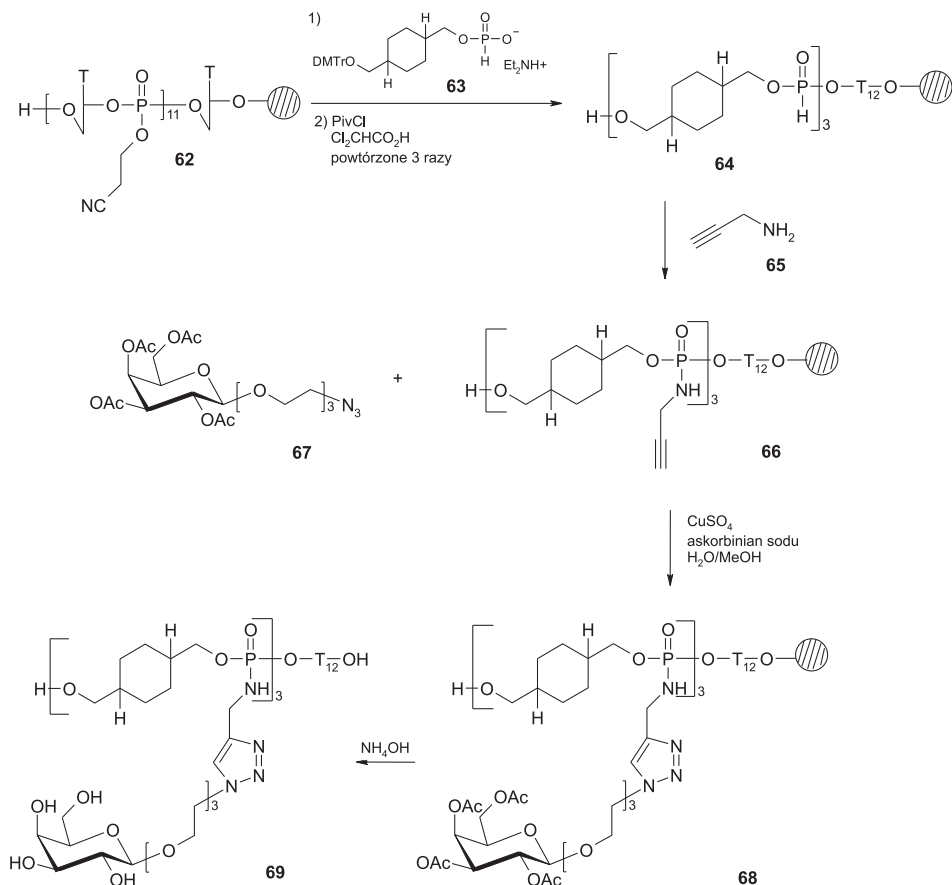
Gierlich i współpracownicy zastosowali CC do postsyntetycznej modyfikacji otrzymanego metodą amidofosforynową DNA zawierającego zmodyfikowane pochodne urydyny **57** i **58** (Rys. 7) [27]. Azydki **59–61** zostały wybrane ze względu na to, że mogą one stanowić potencjalne znaczniki molekularne.



Rysunek 7. Alkiny modyfikowane pochodne urydyny i azydki o potencjalnym zastosowaniu jako znaczniki molekularne

Figure 7. Alkyne modified uridine nucleosides and azides as potential molecular labels

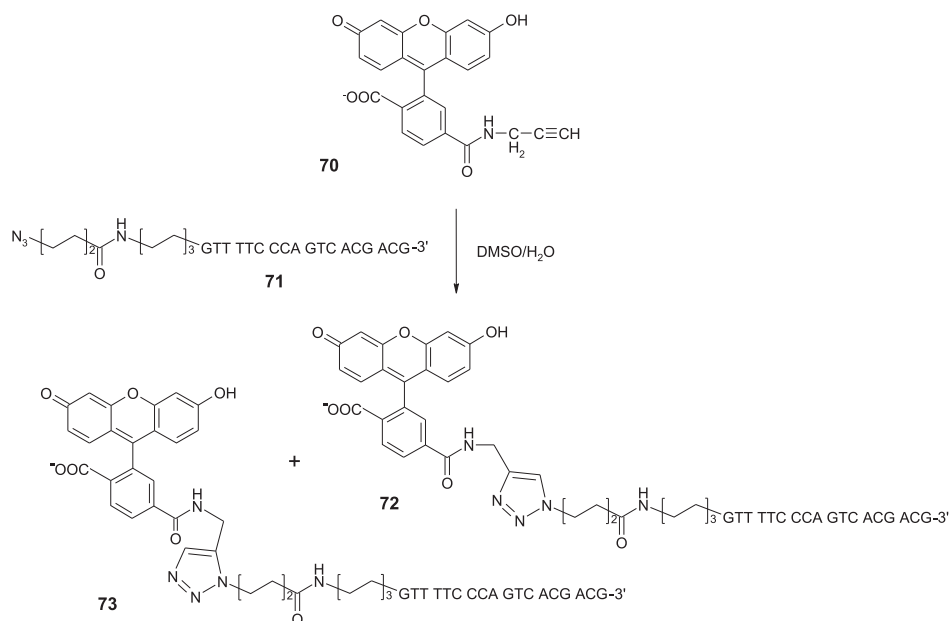
Bouillon i współpracownicy zaprezentowali dogodną syntezę wielokrotnie znakowanych oligonukleotydów opartą na wspomaganą promieniowaniem mikrofalowym reakcji CuAAC [28]. Autorzy zastosowali w tym przypadku cykloaddycję do przyłączenia reszt węglowodanowych do szkieletu oligonukleotydowego (Schemat 18). Pierwszy etap syntezy polegał na otrzymaniu za pomocą metody amidofosforynowej przyłączonego do złoza dodekameru tymidynowego **62**. Następnie wprowadzono linker w skład którego wchodziły trzy ugrupowania H-fosfoniodiestrowe. Oksydatywne aminowanie otrzymanego związku **64** z użyciem CCl_4 wobec propargiloaminy **65** prowadziło do związku **66**, który w następnym etapie poddawano reakcji cykloaddykcji ze związkiem **67** w obecności CuSO_4 i askorbinianu sodu. Amonoliza otrzymanego w ten sposób związku **68** dawała finalny produkt **69**.



Schemat 18. Synteza na fazie stałej oligonukleotydów z przyłączonymi resztami cukrowym w reakcji CuAAC wspomaganą promieniowaniem mikrofalowym

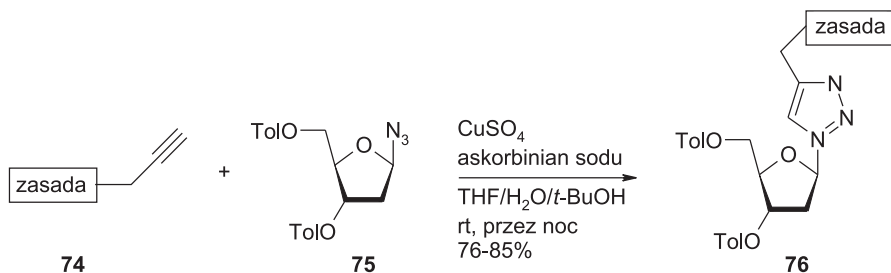
Scheme 18. Solid-phase synthesis of oligonucleotides with attached carbohydrate residues in CuAAC reaction via microwave activation

Reakcję 1,3-dipolarnej cykloaddycji, pomiędzy alkiyno-6-karboksyfluoresceiną (FAM) **70** i zawierającą ugrupowanie azydkowe pojedynczą nicią DNA (**71**), zastosowano do syntezy fluorescencyjnych oligonukleotydów **72** i **73** (Schemat 19) [29]. Prowadząc reakcję CuAAC w środowisku wodnym otrzymano pożądane produkty z ilościową wydajnością. Znakowany w ten sposób DNA posłużył następnie jako primer w reakcji Sangera.



Schemat 19. Synteza znakowanych DNA **72** i **73** w reakcji 1,3-dipolarnej cykloaddykcji
 Scheme 19. Synthesis of FAM-labeled DNAs **72** and **73** by 1,3-dipolar cycloaddition

Wzrastająca liczba otrzymanych struktur krystalicznych różnorodnych kompleksów enzym–substrat pokazała, że w enzymach istnieje wiele miejsc aktywnych, które są bardziej „elastyczne” niż wcześniej uważano. Konsekwencją tej „elastyczności” jest to, że pojedynczy enzym akceptuje szersze spektrum substratów. Z tego powodu metoda projektowania leków w oparciu o strukturę miejsca katalitycznego często bywa mało efektywna, a znaleziona struktura pomimo bardzo dobrego dopasowania przestrzennego okazuje się być słabym inhibitorem enzymu. Rozwiązaniem tego problemu może okazać się zastosowanie tak zwanych „fleximerów” tj. nukleozydów modyfikowanych w taki sposób, że nukleozasada zostaje oddzielona od reszty cukrowej poprzez wprowadzenie dodatkowego ugrupowania. Dzięki takiej modyfikacji pierścień purynowy umocowany jest bardziej „elastycznie”, a tym samym łatwiej dopasowuje się do miejsca aktywnego, przy czym związek nadal zachowuje cechy typowego nukleozydu. Obszerne badania w tej dziedzinie przeprowadziła grupa Chitpeua [30], która opracowała syntezę nowych 1,2,3-triazolowych analogów nukleozydów **76** stosując reakcję 1,3-dipolarnej cykloaddykcji pomiędzy nukleozasadą **74** posiadającą grupę alkinową, a azydową pochodną cukrową **75** (Schemat 20). Następnie związki **76** przekształcane były w amidofosforyny i inkorporowane do łańcucha DNA.



Zasada = uracyl, cytozyna, adenina, 6-chloro-7-deazapuryna, 2-amino-6-chloro-deazapuryna

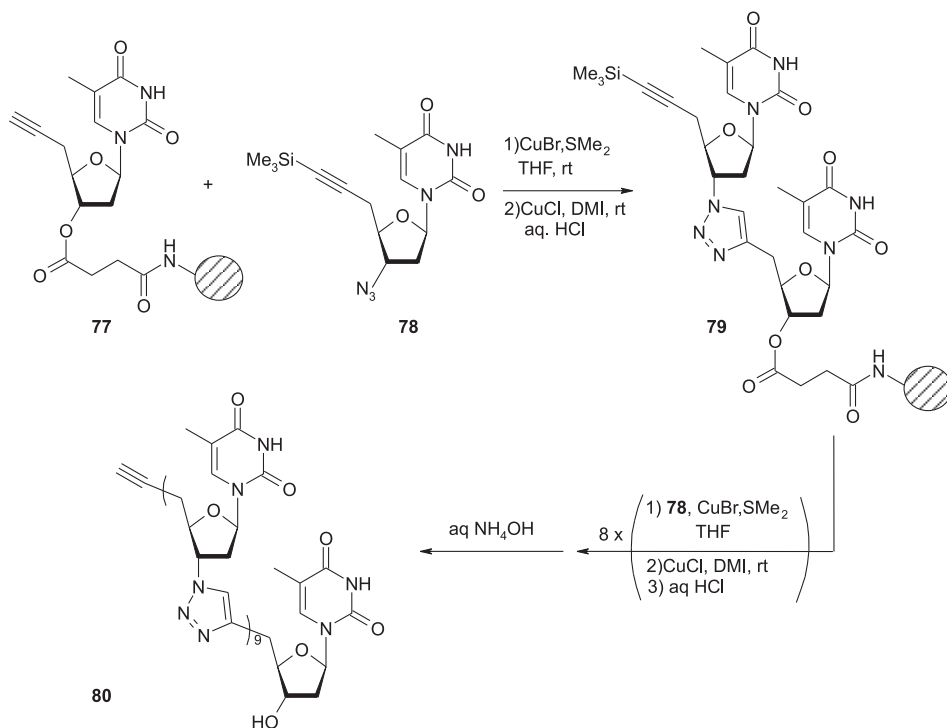
Schemat 20. Synteza „fleximerów” **76**

Scheme 20. Synthesis of „fleximers” **76**

3.2. 1,2,3-TRIAZOL JAKO ZAMIENNIK WIĄZANIA INTERNUKLEOTYDOWEGO

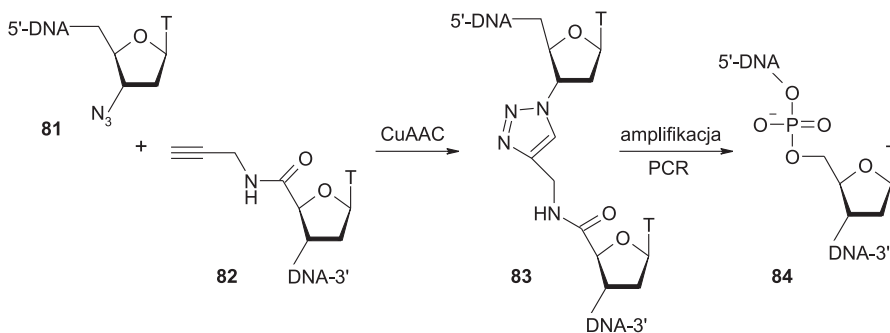
Reakcja katalizowanej miedzią 1,3-dipolarnej cykloaddycji stała się użytecznym narzędziem otrzymywania różnej klasy modyfikowanych oligonukleotydów. Znane są właściwości naturalnie nie występujących oligodeoksyrybonukleotydów antysensowych, które działają jako posttranskrypcyjne czynniki wyciszenia genów. W literaturze opisana jest synteza oligonukleotydów, w których internukleotydowe wiązanie fosfodiesterowe zastąpione zostało pierścieniem triazolowym powstałym w wyniku reakcji CuAAC.

Wykorzystując strategię „click chemistry” Isobe i współpracownicy przedstawili syntezę nowego analogu DNA (**80**, Schemat 21), w którym kolejne nukleozasady połączone są pierścieniem triazolowym [31]. Reakcja zawieszona na fazie stałej związku **77** z monomerem **78** prowadziła do związku **79**. Kolejne przyłączenia monomeru **78** i następcze odcięcie od złoża dawało finalny produkt **80**.



Schemat 21. Synteza analogu DNA posiadającego pierścień triazolowy w miejscu wiązania internukleotydu
 Scheme 21. Synthesis of DNA analogue with triazole ring in place of internucleotide linkage

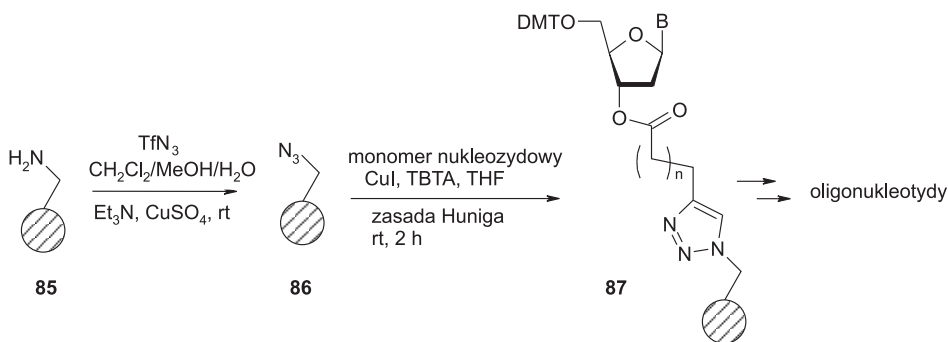
W literaturze przedstawiona jest także interesująca synteza nici DNA zawierających nie występujący naturalnie łącznik składający się z dwóch reszt tymidyny połączonych triazolem (T-triazol-T) [32]. Połączenie tego typu otrzymano na drodze ligacji oligonukleotydu **81** zawierającego na 3'-końcu resztę AZT z oligonukleotydem **82** zawierającym na 5'-końcu propargiloamidotymidynę. Następnie modyfikowany oligonukleotyd **83** był z powodzeniem użyty w reakcji amplifikacji PCR z wykorzystaniem kilku różnych polimeraz (Schemat 22).



Schemat 22. Synteza DNA zawierającego w szkielecie nie występujący naturalnie fragment T-triazol-T
 Scheme 22. Synthesis of oligonucleotides containing an unnatural T-triazole-T linkage

3.3. 1,2,3-TRIAZOL JAKO LINKER W SYNTEZIE NA FAZIE STAŁEJ

Synteza na fazie stałej stanowi obecnie najczęściej stosowaną metodę otrzymywania takich makrocząsteczek jak peptydy czy kwasy nukleinowe. Jednakże kowalencyjne przyłączenie pierwszego monomeru często bywa problematyczne. Na przykład przy zastosowaniu złoza posiadającego wolne grupy aminowe proces upakowania może przebiegać bardzo powoli i jednocześnie musi być przeprowadzany w ściśle bezwodnym medium. Konsekwencją niepełnego upakowania złoza są niepożądane reakcje uboczne, a co za tym idzie niższa wydajność i utrata czystości finalnego produktu. W celu obejścia tych trudności Oyelere i współpracownicy zaproponowali syntezę złoza z grupami azydowymi **86** (Schemat 23), co pozwalało na przyłączenie do niego nukleozydów podstawionych alkinylem w reakcji 1,3-dipolarnej cykloaddycji [33]. Funkcjonalizowane w ten sposób złoże **87** umożliwiło syntezę 15- i 30-merowych oligonukleotydów na fazie stałej.



Schemat 23. Synteza oligonukleotydów z wykorzystaniem złoza z przyłączonymi grupami azydowymi
Scheme 23. Synthesis of oligonucleotides using the azido-coated support

PODSUMOWANIE

Katalizowana miedzią reakcja 1,3-dipolarnej cykloaddycji pomiędzy azydami, a alkinami (CuAAC) stanowi nową drogę otrzymywania modyfikowanych nukleozydów, nukleotydów oraz oligonukleotydów. Metoda ta pozwala, przy pomocy modyfikowanego alkinylem amidofosforynów, na przyłączenie wszelkiego rodzaju znaczników do oligonukleotydów. Z pomocą modyfikowanego alkinylem trifosforanów lub przy użyciu technologii metylotransferaz można otrzymywać duże fragmenty genomowego DNA, które następnie można modyfikować wykorzystując reakcję CuAAC. Zaskakującym faktem jest to, że znaczna ilość podstawionych grupą alkinylową zasad jest łatwo akceptowana przez polimerazy, dzięki czemu mogą one w pełni zastąpić zasady kanoniczne we fragmencie DNA powstałym w wyniku naturalnej lub sztucznej amplifikacji. Następnie fragmenty DNA zawierające w swoim szkielecie ugrupowania alkinowe mogą być, z wysokimi wydajnościami, w reakcji 1,3 dipolarnej

cykloaddycji modyfikowane na wiele różnych sposobów. Znaczna część otrzymanych w ten sposób oligonukleotydów daje się w łatwy sposób oczyścić np. przez wytrącanie z etanolu, co pozwala uniknąć czasochłonnej i drogiej techniki HPLC.

Nici DNA z grupami alkinowymi mogą znaleźć zastosowanie w nowoczesnej diagnostyce molekularnej albo jako jednostki budulcowe do konstrukcji nanomateriałów. Dla chemików zajmujących się DNA reakcja CuAAC poszerza możliwości syntezy tej klasy połączeń, pozwalając jednocześnie otrzymywać zupełnie nowe pochodne DNA, które w przyszłości mogą być wykorzystywane w wielu obszarach między innymi w medycynie czy nanotechnologii.

Serdecznie dziękuję dr hab. Janinie Baraniak za materiały i sugestie, które pozwoliły na powstanie tego artykułu.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] K.B. Sharpless et al., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2001, **40**, 2004.
- [2] R. Huisgen, *1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry*, Vol. 1, Wiley, New York, 1984, 1.
- [3] a) E. De Clercq, *J. Clin. Virol.*, 2004, **30**, 115; b) D. Jochmans, *Virus Res.*, 2008, **134**, 171; c) S. Miura, S. Izuta, *Curr. Drug Targets*, 2004, **5**, 191.
- [4] J.Y. Lau, R.C. Tam, T.J. Liang, Z. Hong, *Hepatology*, 2002, **35**, 1002.
- [5] R. Alvarez, S. Valazquez, A. San-Felix, S. Aquaro, E. De Clercq, C. F. Perno, A. Karlsson, J. Balzarini, M.J. Camarasa, *J. Med. Chem.*, 1994, **37**, 4185.
- [6] a) I. Perez-Castro, O. Caamano, F. Fernandez, M.D. Garcia, C. Lopez, E. De Clercq, *Org. Biomol. Chem.*, 2007, **5**, 3805; b) J.H. Cho, D.L. Bernard, R.W. Sidwell, E.R. Kern, C.K. Chu, *J. Med. Chem.*, 2006, **49**, 1140; c) J. Broggi, N. Joubert, V. Aucagne, T. Zevaco, S. Berteina-Raboin, S.P. Nolan, L.A. Agrofoglio, *Nucleosides Nucleotides* 2007, **26**, 779.
- [7] L. Li, B. Lin, Z. Yang, L. Zhang, L. Zhang, *Tetrahedron Lett.*, 2008, **49**, 4491.
- [8] L. Li, G. Zhang, L. Zhang, A. Zhu, *J. Org. Chem.*, 2008, **73**, 3630.
- [9] a) Y. Xia, W. Li, F. Qu, Z. Fan, X. Liu, C. Berro, E. Rauzy, L. Peng, *Org. Biomol. Chem.*, 2007, **5**, 1695; b) W. Li, Y. Xia, F. Qu, Z. Fan, L. Peng, Q. Wu, *Tetrahedron Lett.*, 2008, **49**, 2804.
- [10] R. Guezquez, K. Bourgin, K. El Akri, R. Benhida, *Tetrahedron Lett.*, 2006, **47**, 4807.
- [11] D.S. Ermolat'ev, V.P. Metha, E.V. Van der Eycken, *QSAR Com. Sci.*, 2007, **26**, 1266.
- [12] J. Broggi, N. Joubert, V. Aucagne, S. Berteina-Raboin, S. Diez-Gonzalez, S.P. Nolan, D. Topalis, D. Deville-Bonne, J. Balzarini, J. Neyts, G. Andrei, R. Snoeck, L. Agrofoglio, *Nucleosides Nucleotides*, 2007, **26**, 1391.
- [13] a) S.H. Cho, E.J. Yoo, I. Bae, S. Chang, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 16046; b) E.J. Yoo, M. Ahlquist, I. Bae, K.B. Sharpless, V. Fokin, S. Chang, *J. Org. Chem.*, 2008, **73**, 5520.
- [14] L. Cosyn, K.K. Palaniappan, S.K. Kim, H.T. Duong, Z.G. Gao, K.A. Jacobson, S. Van Calenbergh, *J. Med. Chem.*, 2006, **49**, 7373.
- [15] a) C. Temple, C.L. Kussner, J. Montgommery, *J. Org. Chem.*, 1966, **31**, 2210; b) T. Lioux, G. Gosselin, C. Mathe, *Eur. J. Org. Chem.*, 2003, **20**, 3997.
- [16] L. Cosyn, Z.G. Gao, P. Van Rompaey, C. Lu, K.A. Jacobson, S. Van Calenbergh, *Bioorg. Med. Chem.*, 2006, **14**, 1403.
- [17] A. Gupte, H.I. Boshoff, D.J. Wilson, J. Neres, N. Labello, R.V. Somu, C. Xing, C.E. Barry, C.C. Aldrich, *J. Med. Chem.*, 2008, **51**, 7495.

- [18] a) L. Zhou, A. Amer, M. Korn, R. Burda, J. Balzarini, E. De Clercq, E.R. Kern, P.F. Torrence, *Antiviral Chem. Chemother.* 2005, **16**, 375; b) H. Ding, R. Yang, Y. Song, Q. Xiao, J. Wu, *Nucleosides Nucleotides*, 2008, **27**, 368.
- [19] G. O'Mahony, S. Svensson, A. Sundgreen, M. Grotli, *Nucleosides Nucleotides*, 2008, **27**, 449.
- [20] L. Lee, K.H. Chang, F. Valiyev, H.J. Liu, S.J. W, J. Chin. Chem. Soc., 2006, **53**, 1547.
- [21] J. Cao, X. Huang, *J. Comb. Chem.*, 2008, **10**, 526.
- [22] A. Olejniczak, B.A. Wojtczak, Z. Lesnikowski, *Nucleosides, Nucleotides, Nucleic Acids*, 2007, **26**, 1611.
- [23] L.V. Lee et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**, 9588.
- [24] G. Godeau, C. Staedel, P. Barthelemy, *J. Med. Chem.*, 2008, **51**, 4374.
- [25] X. Jin, R. Yang, P. Jin, Q. Xiao, Y. Ju, *Synthesis*, 2007, **19**, 2967.
- [26] P.M.E. Gramlich, C.T. Wirges, A. Manetto, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2008, **47**, 8350.
- [27] J. Gierlich, G.A. Burley, P.M.E. Gramlich, D.M. Hammond, T. Carell, *J. Org. Lett.*, 2006, **8**, 3639.
- [28] C. Bouillon, A. Meyer, S. Vidal, A. Jochum, Y. Chevelot, J.-P. Cloarec, J.-P. Praly, J.-J. Vasseur, F. Morvan, *J. Org. Chem.*, 2006, **71**, 4700.
- [29] T.S. Seo, Z. Li, H. Ruparel, J. Ju, *J. Org. Chem.*, 2003, **68**, 609.
- [30] P. Chitttepu, V.R. Sirivolu, F. Seela, *Bioorg. Med. Chem.*, 2008, **16**, 8427.
- [31] H. Isobe, T. Fujino, N. Yamazaki, M. Guillot-Nieckowski, E. Nakamura, *Org. Lett.*, 2008, **10**, 3729.
- [32] A. H. El-Sagheer, T. Brown, *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, **131**, 3958.
- [33] A.K. Oyelere, P.C. Chen, L.P. Yao, N. Boguslavsky, *J. Org. Chem.*, 2006, **71**, 9791.

Praca wpłynęła do Redakcji 8 stycznia 2011

**AKTYWNOŚĆ BIOLOGICZNA POCHODNYCH
2,7-NAFTYRYDYN**

**BIOLOGICAL ACTIVITY OF 2,7-NAPHTHYRIDINE
DERIVATIVES**

Anna Wójcicka, Edwin Wagner

*Katedra i Zakład Technologii Leków,
Akademia Medyczna im. Piastów Śląskich we Wrocławiu,
pl. Nankiera 1, 50-140 Wrocław
email: annaw@ktl.am.wroc.pl*

Abstract

Wykaz stosowanych skrótów

Wprowadzenie

1. Połączenia 2,7-naftyrydyny pochodzenia naturalnego

1.1. Alkaloidy wyizolowane z roślin

1.2. Alkaloidy wyizolowane z organizmów morskich

1.2.1. Lofokładyny

1.2.2. Pirydoakrydyny

2. Syntetyczne pochodne 2,7-naftyrydyny

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane

dr inż. Anna Wójcicka ukończyła biotechnologię na Wydziale Chemii Politechniki Wrocławskiej. Od 1999 roku jest asystentem w Katedrze i Zakładzie Technologii Leków Akademii Medycznej im. Piastów Śląskich we Wrocławiu. Stopień doktora nauk farmaceutycznych uzyskała w 2009 roku na Wydziale Farmaceutycznym AM we Wrocławiu. Zajmuje się syntezą nowych pochodnych 2,7-naftyrydyny o potencjalnej aktywności biologicznej.

dr hab. Edwin Wagner jest absolwentem Akademii Medycznej we Wrocławiu, gdzie uzyskał również stopień naukowy dr n. farmaceutycznych – 1967 r., a tytuł naukowy dr habilitowanego w 1984 r. W latach 1989–2009 był kierownikiem Katedry i Zakładu Technologii Leków A.M. we Wrocławiu. Główne kierunki badań naukowych: synteza i izomeryzacja pochodnych kwasu barbiturowego, synteza i hydratacja pochodnych benzodiazepin, synteza pochodnych izoksazolopirymidyny.

ABSTRACT

2,7-Naphthyridine is one of the six structural isomers of pyridopyridines. More than one hundred years ago, Gabriel and Colman discovered the isomer 2,7-naphthyridine, and named it "copyryne" [3]. From among of all naphthyridines, the synthesis and properties of the copyryne derivatives have not yet been thoroughly investigated. This paper reviews the synthetic and natural 2,7-naphthyridine derivatives which have been reported to possess various biological activity. A large number alkaloids containing the 2,7-naphthyridine scaffold have been isolated from plants and marine organisms [13–18]. The natural marine alkaloids can be classified into two groups. The bicyclic lophocladines were isolated from the red alga *Lophocladia sp.* [12]. The pyridoacridines represent a large and growing class the polycyclic alkaloids from sponges, ascidians or tunicates [15, 16]. Many of this natural compounds exhibited cytotoxic, antibacterial, antiviral, antifungal and sedative activity. The broad spectrum of biological activity of copyryne alkaloids is the main of reason for the preparation of new 2,7-naphthyridine derivatives also by the synthetic route. So far, about fifty different methods of synthesizing the 2,7-naphthyridine ring have been published. This study described synthesis only biologically active 2,7-naphthyridine analogues. Biological investigations have shown that copyryne derivatives have a wide spectrum of actions. Antitumor, antimicrobial, analgesic and anticonvulsion activities have been found. Most of 2,7-naphthyridine derivatives have been studied as antitumor agents. Many papers described synthesis and pharmacological properties the best active and highly selective PDE5 inhibitor (T-0156) [55]. So far, none of 2,7-naphthyridine derivatives has been applied as a drug.

Keywords: 2,7-naphthyridine derivatives, biological activity

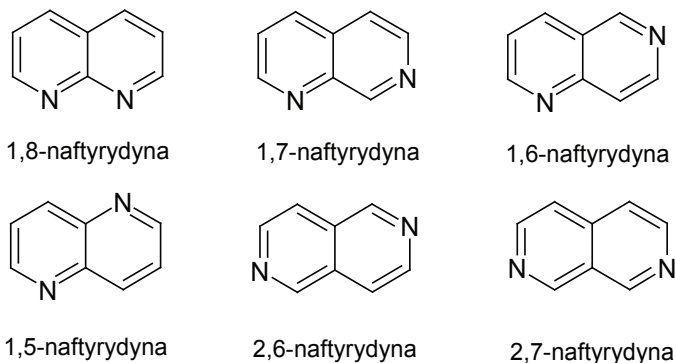
Słowa kluczowe: pochodne 2,7-naftyrydyny, aktywność biologiczna

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

DMF	– N,N-dimetyloformamid (ang. <i>N,N-dimethylformamide</i>)
Ac	– acetylo (ang. <i>acetyl</i>)
DNA	– kwas deoksyrybonukleinowy (ang. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
THF	– tetrahydrofuran (ang. <i>tetrahydrofuran</i>)
Me	– metyl (ang. <i>methyl</i>)
Et	– etyl (ang. <i>ethyl</i>)
Bu	– butyl (ang. <i>butyl</i>)
DEA	– acetal dietylowy (ang. <i>diethyl acetal</i>)
DEAD	– azodikarboksylan dietylu (ang. <i>diethyl azodicarboxylate</i>)
DME	– eter dimetylowy (ang. <i>dimethyl ether</i>)
Ph	– fenyl (ang. <i>phenyl</i>)
ASD	– dehydrogenaza semialdehydu kwasu asparginowego (ang. <i>aspartate-semialdehyde dehydrogenase</i>)
PDK-1	– fosfoinozytozależna kinaza 1 (ang. <i>phosphoinositide-dependent kinase 1</i>)
PDE5	– fosfodiesteraza typu 5 (ang. <i>phosphodiesterase type 5</i>)
DBU	– 1,8-diazabicyklo[5.4.0]undek-7-en
NK1	– receptor neurokininowy typu 1 (ang. <i>neurokinin 1</i>)
BRS 3	– receptor bombesynowy typu 3 (ang. <i>bombesin receptor subtype 3</i>)

WPROWADZENIE

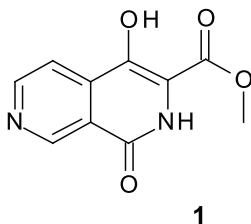
Skondensowany układ dwóch pierścieni pirydyny może występować w postaci sześciu izomerów:



Rysunek 1
Figure 1

Po raz pierwszy nazwa „naftyrydyna” pojawiła się w 1893 roku w pracy Arnolda Reisserta i początkowo odnosiła się głównie do izomeru 1,8 [1]. Izomer 1,5 nazywano „izonaftrydyną”. 1,6-Naftryrydyna bywała także mylnie określana 2,5-naftyrydyną natomiast izomer 2,7 zwyczajowo nazywano „kopiryną”. Dla połączeń naftyrydyny spotkać można w literaturze także określenia: „pirydropirydyny”, „benzodiazyny” lub „diazanaftaleny”.

Najwięcej publikacji poświęcono pochodnym 1,8-naftyrydyny, głównie ze względu na otrzymany przez Geoga Yohe Leshera kwas nalidyksowy, który w 1967 roku wprowadzono do leczenia, jako lek antybakteryjny [2]. Najmniej poznanym układem naftyrydyny jest izomer 2,7. Mimo, iż ponad 100 lat temu Gabriel i Colman zsyntetyzowali pierwszą jego pochodną: ester metylowy kwasu 4-hydrokso-1,2-dihydro-2,7-naftyrydino-3-karboksylowego (**1**) [3], następna synteza pochodnej 2,7-naftyrydyny nastąpiła dopiero po II Wojnie Światowej w 1947 roku [4]. W ostatnim dwudziestoleciu nastąpił znaczny wzrost zainteresowania połączeniami 2,7-naftyrydyny, głównie ze względu na odkrycie ich wielokierunkowego działania biologicznego. Przyczynił się do tego też fakt wyizolowania z roślin oraz organizmów morskich związków zawierających w swojej budowie układ 2,7-naftyrydyny, które wykazują różnorodną aktywność biologiczną.

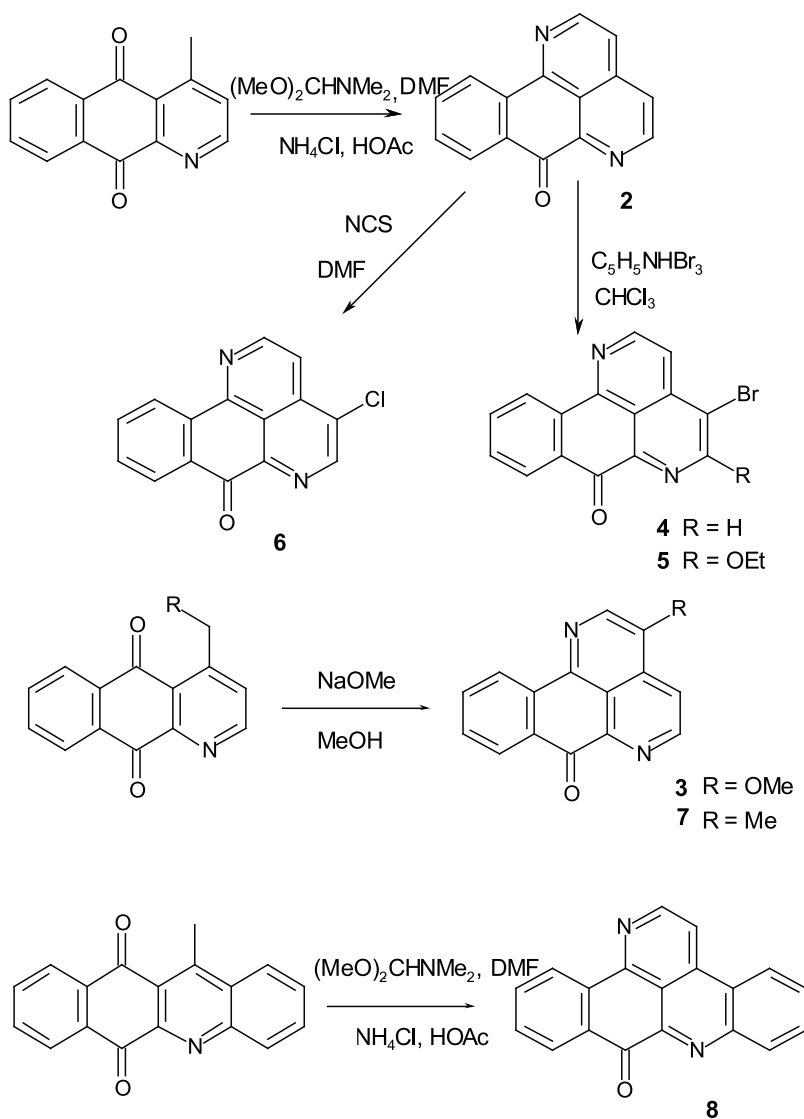


Rysunek 2
Figure 2

1. POŁĄCZENIA 2,7-NAFTYRYDINY POCHODZENIA NATURALNEGO

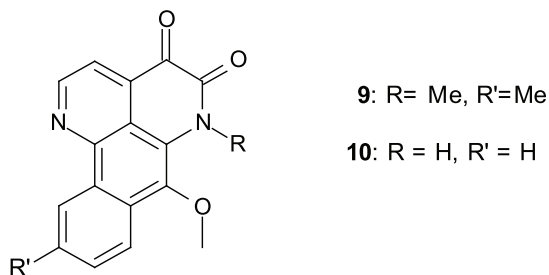
1.1. ALKALOIDY WYIZOLOWANE Z ROŚLIN

Sampangina (2) wyizolowana w 1986 roku z kory azjatyckiego drzewa *Cananga odorata* [5] wykazująca właściwości przeciwgrzybicze i przeciwmikobakteryjne, została uzyskana także na drodze syntezy chemicznej [6]. Z afrykańskiego drzewa *Cleistopholis patens* wyizolowano antygrzybiczą 3-metoksysampanginę (3) [7], co skłoniło badaczy do syntezy innych pochodnych tego alkaloidu kopiryny. Uzyskane syntetycznie pochodne 3–8 (Schemat 1) poddano testom aktywności *in vitro* wobec szczepów: *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus* i *Mycobacterium intracellulare*. Połączenia 3 i 6–8 wykazują działanie porównywalne lub lepsze od amfoterycyny B i ryfampicyny [8]. Sampangina (2) i jej 3-metoksypochodna 3 są aktywne *in vitro* wobec *Plasmodium falciparum*, natomiast sampangina jest również bardziej cytotoksyczna od 5-fluorouracylu [9]. Kluza i in. udowodnili, że sampangina indukuje apoptozę w ludzkich liniach komórkowych białaczki [10].



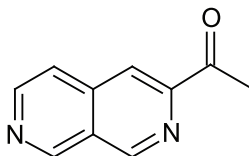
Schemat 1
Scheme 1

Z kory drzewa *Duguetia hadrantha* wyizolowano 4,5-dioekso-1-azaaporfinoidy **9–10** [9]. Hadrantyna A (**9**) wykazała aktywność antymalaryczną, natomiast hadrantyna B (**10**) cytotoksyczną.



Rysunek 3
 Figure 3

Z kozłka lekarskiego *Valeriana officinalis* wyizolowano 3-acetylo-2,7-naftyrydynę (**11**) o działaniu uspokajającym [11].



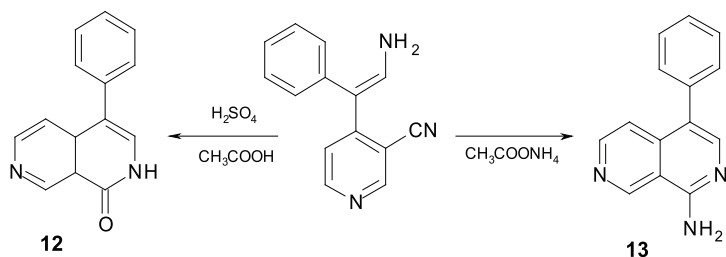
11

Rysunek 4
 Figure 4

1.2. ALKALOIDY WYIZOLOWANE Z ORGANIZMÓW MORSKICH

1.2.1 Lofokładyny

Z czerwonych alg wyizolowano pochodne 4-fenylo-2,7-naftyrydyny. Lofokładyna A (**12**) jest antagonistą receptorów δ -opiodowych. Lofokładyna B (**13**) wykazuje aktywność cytotoksyczną wobec komórek nowotworowych piersi i płuc, co jest związane ze zdolnością do depolimeryzacji mikrotubul [12]. Pochodne **12** i **13** otrzymano również na drodze syntezy chemicznej [13].



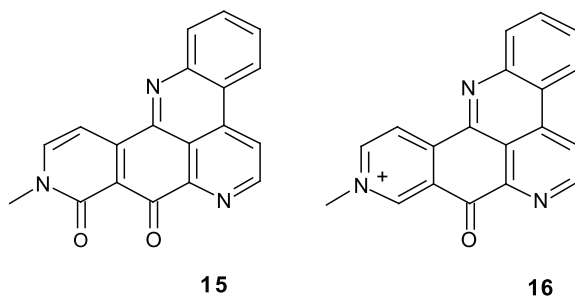
Schemat 2
Scheme 2

1.2.2. Pirydoakrydyny

W 1983 roku wyizolowano z gąbek *Amphimedon sp.* cytotoksyczny alkaloid amfimedynę (**14**) [14]. Był to pierwszy związek z grupy pirydoakrydyn, zawierających w swojej budowie szkielet 2,7-naftyrydyny. Od tamtego czasu wyizolowano z organizmów morskich kilkadziesiąt nowych połączeń pirydoakrydyny. Wiele pochodnych, zwłaszcza tych wykazujących znaczną aktywność biologiczną zostało także uzyskanych za pomocą syntezy chemicznej. Pirydoakrydynom zostało poświęcone wiele publikacji w tym prace przeglądowe Molińskiego [15] oraz Delfourne i Bastide [16].

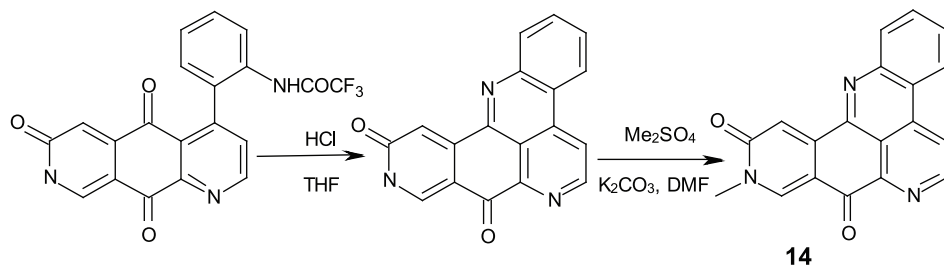
AMFIMEDYNY

W 1999 roku wyizolowano z gąbek *Xestospongia sp.* neoamfimedynę (**15**) [17] a następnie deoksyamfimedynę (**16**) [18], wykazujące podobnie jak amfimedyna (**14**) aktywność cytotoksyczną. Pochodna **15** okazała się być inhibitorem topoizomerazy II.



Rysunek 5
Figure 5

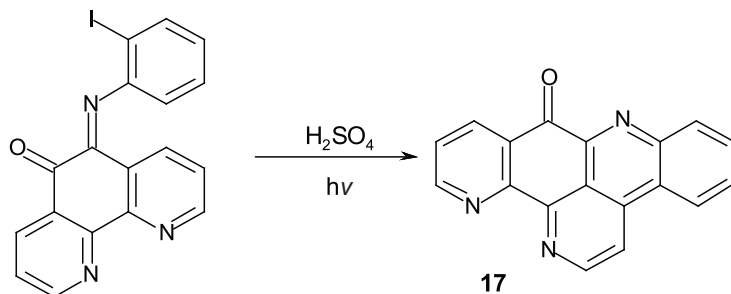
Pierwsza synteza amfimedyny **14** opisana została w 1988 roku [19]. Następnie opublikowano inne drogi syntezy połączeń tego alkaloidu [20, 21].



Schemat 3
Scheme 3

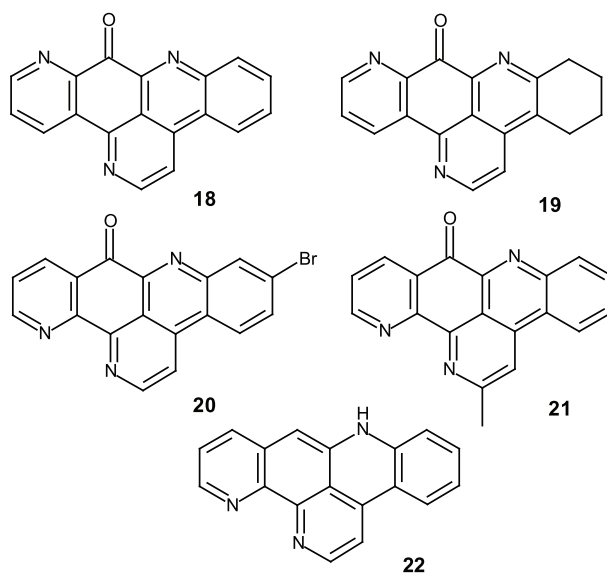
ASCIDIDEMINY

Cytotoksyczna ascididemina (**17**) została wyizolowana po raz pierwszy w 1988 roku z osłonicy *Didemnum sp.* [22]. Od tamtego czasu wyizolowano szereg pochodnych tego układu, a także opracowano różne metody syntezy połączeń ascidideminy. Większość z nich wykazuje aktywność przeciwnowotworową. Syntezę chemiczną ascidideminy opisał Moody [23, 24].



Schemat 4
Scheme 4

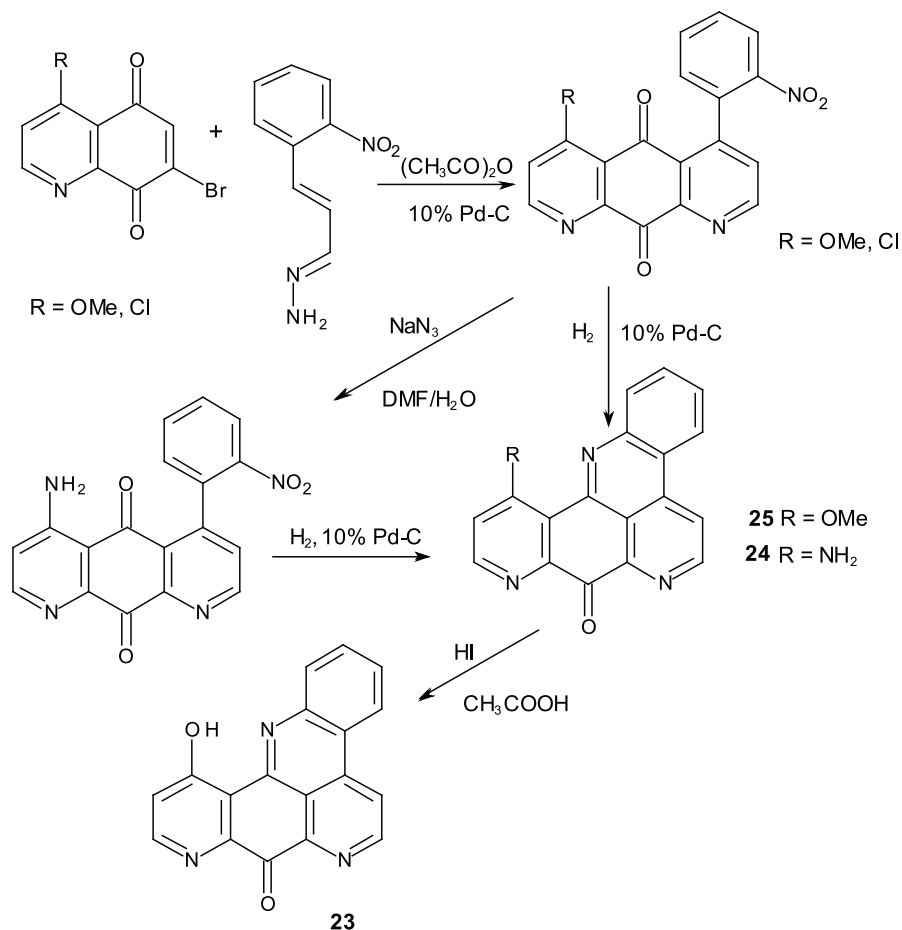
Ascididemina (**17**) wykazuje aktywność wobec *Trypanosoma b. brucei*, wywołującego śpiączkę afrykańską [25], a także wobec szczepów *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Cladosporium resinae* i *Bacillus subtilis* [26] oraz antygruźliczą wobec *Mycobacterium tuberculosis* [27]. Cytotoksyczność ascidideminy wiąże się z hamowaniem topoizomerazy II [28] oraz zdolnością do interkalacji DNA [29]. Spośród kilkudziesięciu analogów ascidideminy największą cytotoksycznością odznacza się izomer **18**, 1,2,3,4-tetrahydroascididemina (**19**), bromoleptoclidinon (**20**) i 6-metyloascididemina (**21**) [16]. 12-Deoksyascididemina (**22**) również jest aktywna wobec *T. b. brucei* [25].



Rysunek 6
Figure 6

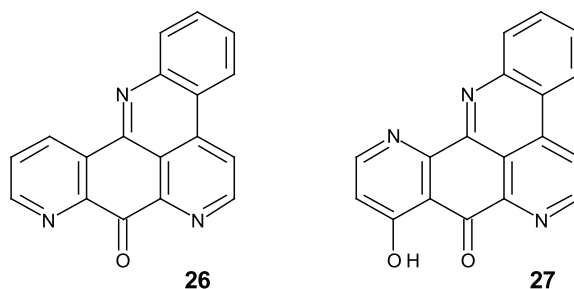
ANALOGI MERIDINY

W 1991 roku z żachw *Amphicarpa meridiana* wyizolowano alkaloid meridinę (23) [28]. Następnie z żachw *Cystodytes dellechiaiei* wyizolowano jej aminopochodną: cystodaminę (24) [30]. Kitahara i in. opisali syntezę pochodnych meridiny [31].



Schemat 5
Scheme 5

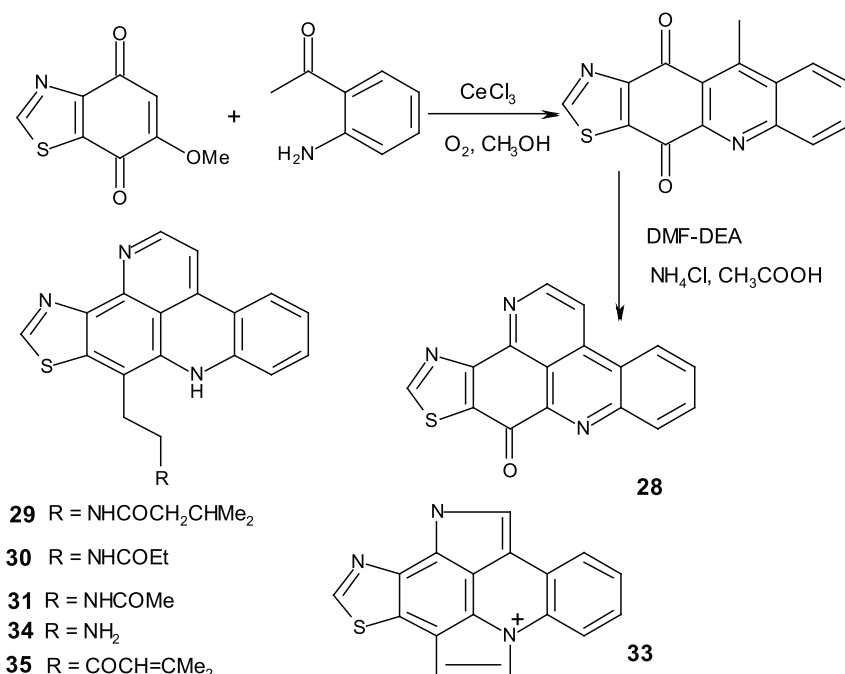
Zarówno pochodne meridyń (**23**) jak i jej regioizomeru wykazują właściwości cytotoksyczne [32, 33] np. cystodamina (**24**) przeciw ludzkim limfoblastom białaczki [30]. Największą aktywnością charakteryzują się połączenia **23–25** oraz dehydroksymeridyna (**26**). Spośród analogów regioizomeru meridyń najbardziej cytotoksyczna jest hydroksypochodna **27**.



Rysunek 7
Figure 7

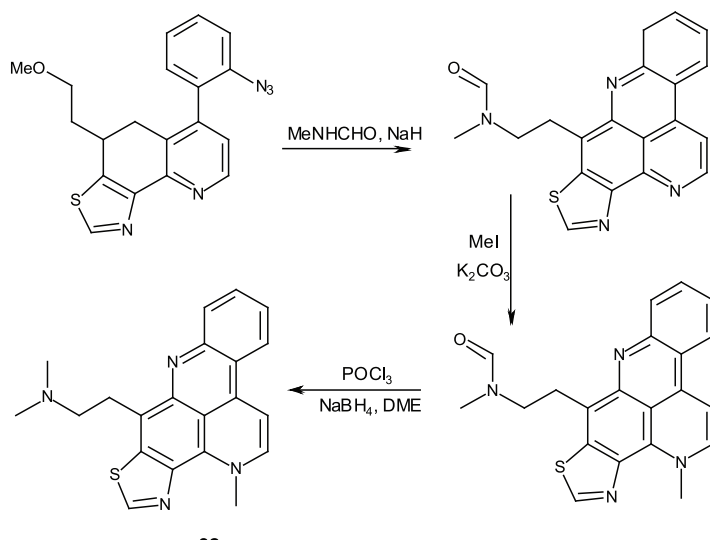
POCHODNE KUANONIAMINY

Alkaloidy zawierające w swoim szkielecie pierścień tiazolu po raz pierwszy wyizolowano z osłonicy *Chelynotus semperi* i nazwano kuanoniaminami A-D **28–31** [34]. Regioizomer dercitina (**32**) i jej analogi oraz stelletamina (**33**) wyizolowane zostały z gąbek *Stelletta sp.* [16, 35]. *N*-deacylopo pochodną (**34**) wyizolowano z gąbek *Oceanapia sp.* a dehydrokuanoniaminę (**35**) z żachw *Cystodytes sp.* [36, 37]. Syntezę kuanoniaminy A (**28**) przeprowadzono w 1997 roku [38].



Schemat 6
Scheme 6

Syntezę dercityny **32** przedstawiono w 1992 roku [39].



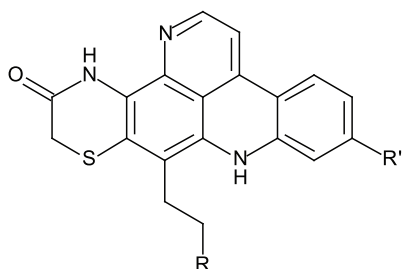
Schemat 7

Scheme 7

Największą cytotoxycznością spośród kuanoniamin odznaczają się kuanoniamina A (**28**) i D (**31**) oraz dehydrokuanoniamina (**35**) [15]. Dercityna (**32**) oprócz aktywności przeciwnowotworowej, wykazuje również aktywność wobec wirusa opryszczki (*herpes simplex*) i koronawirusa (*A-59 murine corona virus*) [15].

SZERMILAMINY

Cytotoksyczne właściwości wykazują również wyizolowane z żachw *Cystodytes sp.* szermilaminy A-D **36–39**. Szermilaminę B (**37**) otrzymano w reakcji fotocyklizacji [16, 40].



36 R = NHCOMe, R' = Br

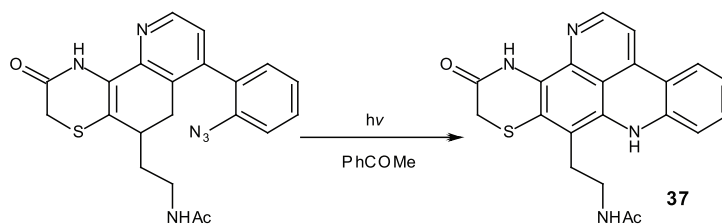
37 R = NHCOMe, R' = H

38 R = NHCOCH=C(Me)₂, R' = H

39 R = NMe₂, R' = H

Rysunek 8

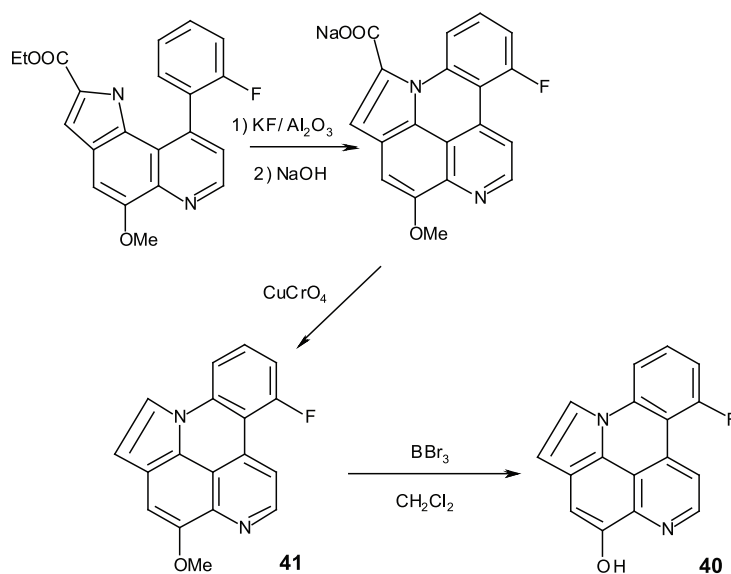
Figure 8



Schemat 8
Scheme 8

ARNOAMINY

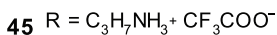
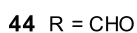
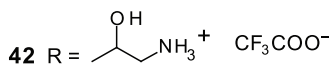
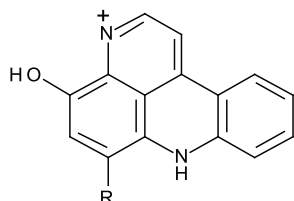
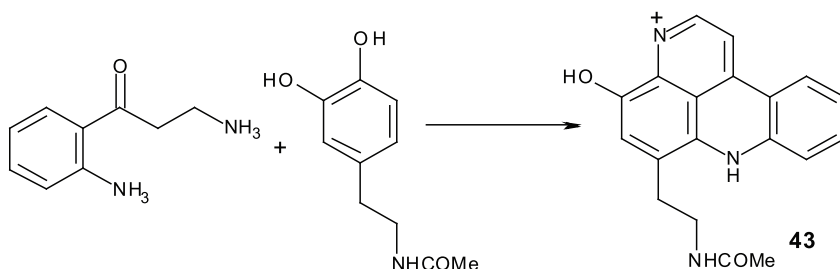
Alkaloidy zawierające pierścień pirolowy skondensowany z układem pirydoakrydyny wyizolowano z zachw *Cystodytes sp.* i nazwano arnoaminami [41]. Pochodne te wykazują aktywność przeciwnowotworową *in vitro* (hamują topoisomerazę II oraz mają właściwości interkalujące), zwłaszcza wobec komórek raka piersi. W 2000 roku przedstawiono syntezę arnoaminy A (**40**) i arnoaminy B (**41**) [16].



Schemat 9
Scheme 9

STYELSAMINY

Wyizolowane z indonezyjskich żachw *Eusynstylea latericius* styelsaminy **42–45** wykazują aktywność cytotoksyczną wobec ludzkich komórek nowotworowych okrężnicy [16, 42]. Syntetycznie otrzymano styelsaminę B (**43**) [43].

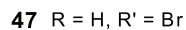
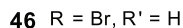
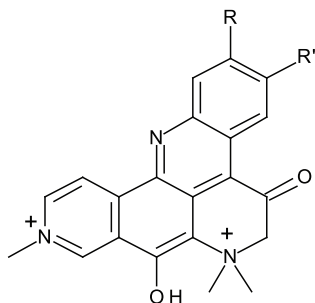


Schemat 10

Scheme 10

PETROSAMINY

Petrosamina (**46**) wyizolowana została z karaibskich gąbek *Petrosia sp.* [44]. Jej izomer petrosamina B (**47**) wyizolowana z australijskich gąbek *Oceanapia sp.* hamuje działanie enzymu ASD u *Helicobacter pylori* [45].

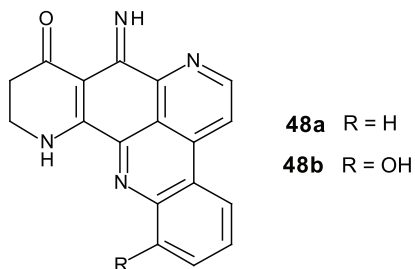


Rysunek 9

Figure 9

ECIONINY

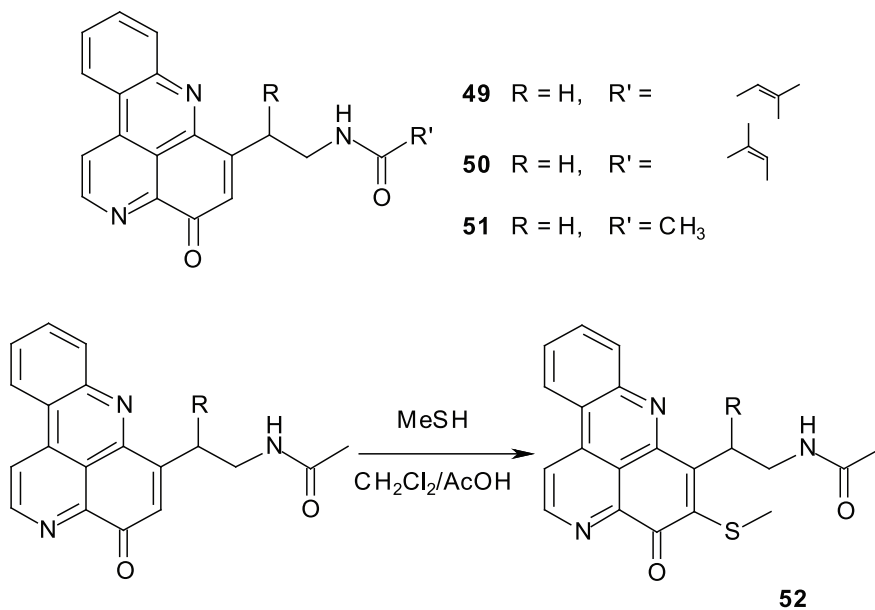
Nowe cytotoksyczne pirydoakrydyny wyizolowane z australijskich gąbek *Ecionema geodides* nazwano ecioninami A i B [46]. Zostały one poddane testom na aktywność przeciwnowotworową *in vitro* wobec ludzkich komórek nowotworowych pęcherza moczowego. Ecionina A (**48a**) wykazała aktywność wobec wszystkich badanych linii komórkowych [46].



Rysunek 10
Figure 10

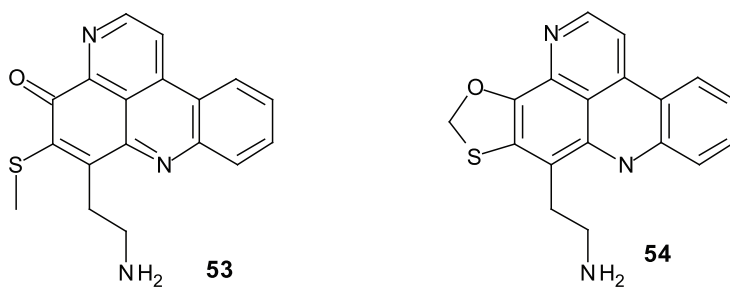
POCHODNE CYSTODYTYNY

Cytotoksyczne *cystodytyny A* (**49**) i *B* (**50**) wyizolowane z gąbek *Didemnum sp.* są też czynnikami stymulującymi uwalnianie jonów wapnia z retikulum sarkoplazmatycznego odpowiednio 36 i 13 razy silniej od kofeiny [15]. Ich pochodna, o wysokiej cytotoksyczności wobec komórek białaczki diplamina (**52**), wyizolowana z osłonicy *Diplosoma sp.* została później otrzymana w wyniku syntezy chemicznej z cystodytyny J (**51**) [40].



Schemat 11
Scheme 11

Analogiem diplaminy B (**53**) jest wyizolowana z ząchw *Lissoclinum cf. badium* lissoclinidyna B (**54**). Połączenia te stabilizują białko p53 i hamują aktywność ligazy ubiquityny, przez co indukują apoptozę [47].

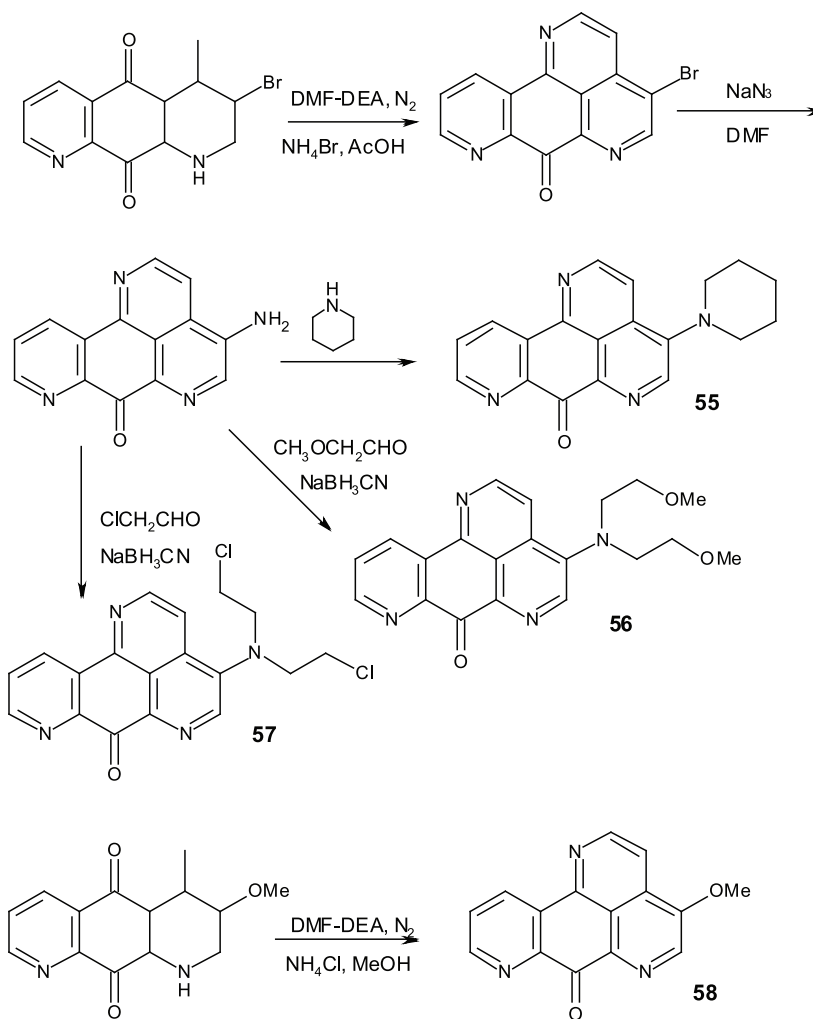


Rysunek 11
Figure 11

2. SYNTETYCZNE POCHODNE 2,7-NAFTYRYDINY

POCHODNE FENANTROLINONU

Wiele pochodnych fenantrolin-7-onu wykazuje aktywność przeciwnowotworową. Najwyższą cytotoksycznością odznaczają się połączenia **55–58**, zwłaszcza wobec linii komórek nowotworowych piersi, płuc i pęcherza moczowego [48].

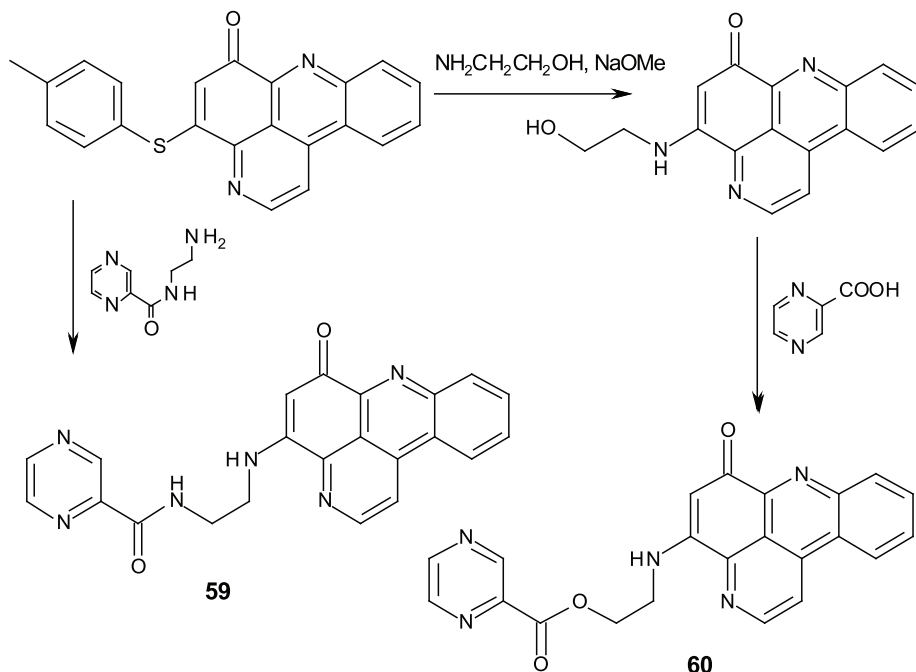


Schemat 12

Scheme 12

POCHODNE PIRYDOAKRYDYNONU

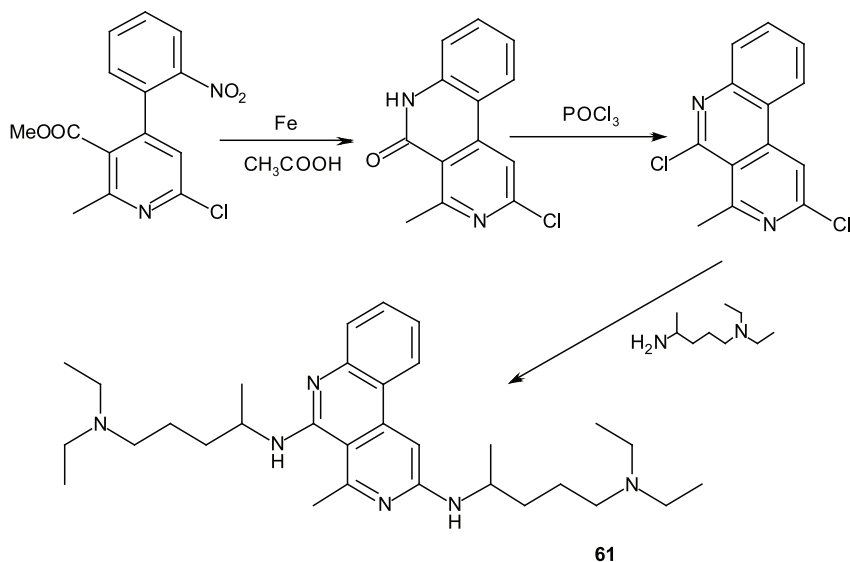
Spośród wielu pochodnych pirydo[2,3,4-*kl*]akrydyn-6-onu, przebadanych w kierunku działania przeciwgruźliczego, największą aktywność wobec *Mycobacterium tuberculosis* wykazują związki **59** i **60**. Jednocześnie odznaczają się one stosunkowo niedużą toksycznością [27].



Schemat 13
Scheme 13

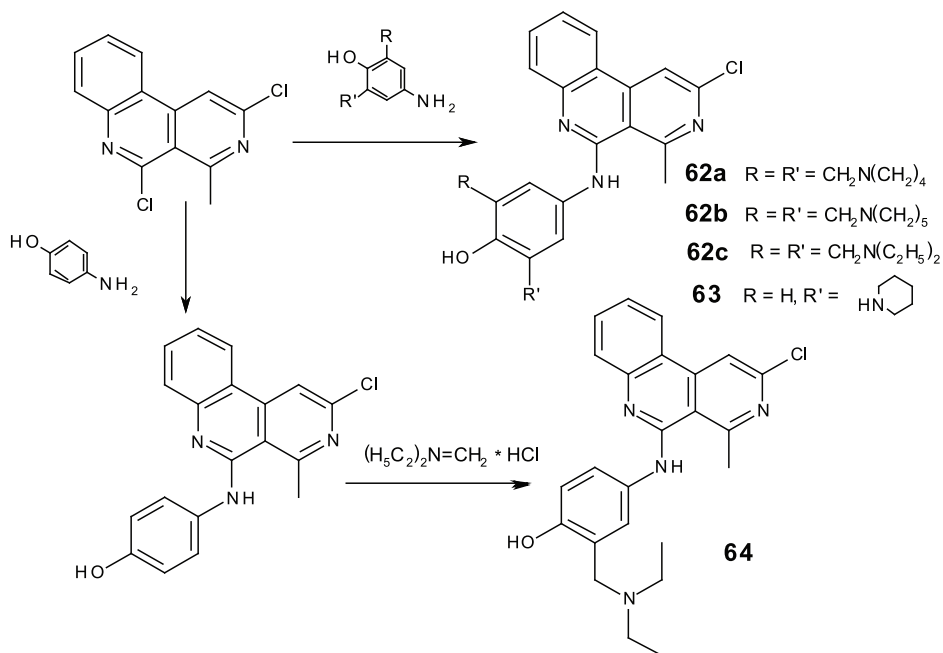
BENZO[*c*][2,7]NAFTYRYDYNY

W 2006 roku opisano syntezę 2- i/lub 5-aminopochodnych benzo[*c*][2,7]nafytyrydyny o potencjalnej aktywności przeciwmalarycznej. Połączenia zostały przebadane *in vitro* przeciw szczepom *Plasmodium falciparum*. Najwyższą aktywność (porównywalną z chlorochiną) wykazał związek **61** [49].



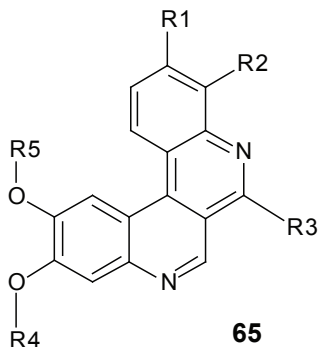
Schemat 14
Scheme 14

Rok później opisano syntezę nowych 5-aryloaminopochodnych **62–64**, z których najlepszą aktywnością wobec *Plasmodium falciparum* odznaczały się związki **62a** i **62b** [50].



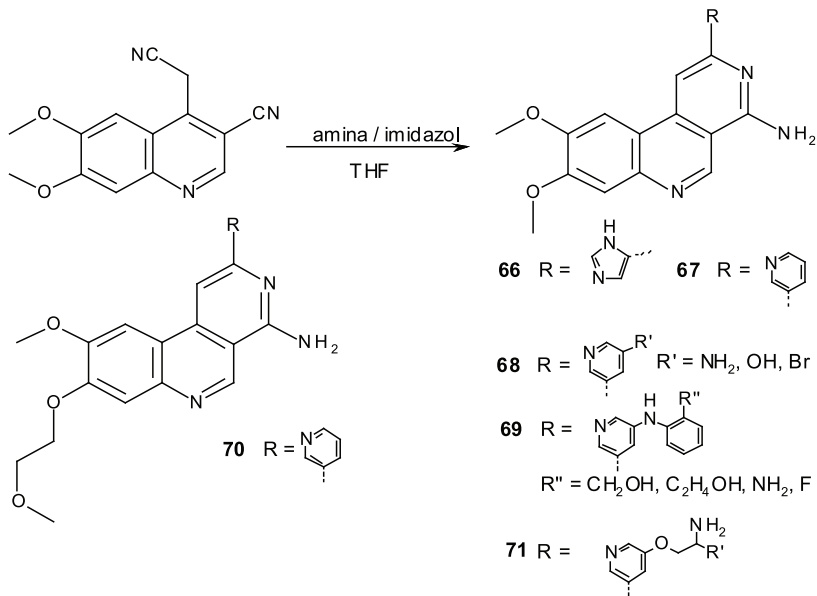
Schemat 15
Scheme 15

Gopalsamy i in. opisali syntezę pochodnych dibenzo[*cf*][2,7]naftyrydyny **65**, które okazały się być silnymi i selektywnymi inhibitorami PDK 1, dzięki czemu hamują proliferację komórek nowotworowych, a także mogą powodować ich apoptozę [51].



Rysunek 12
Figure 12

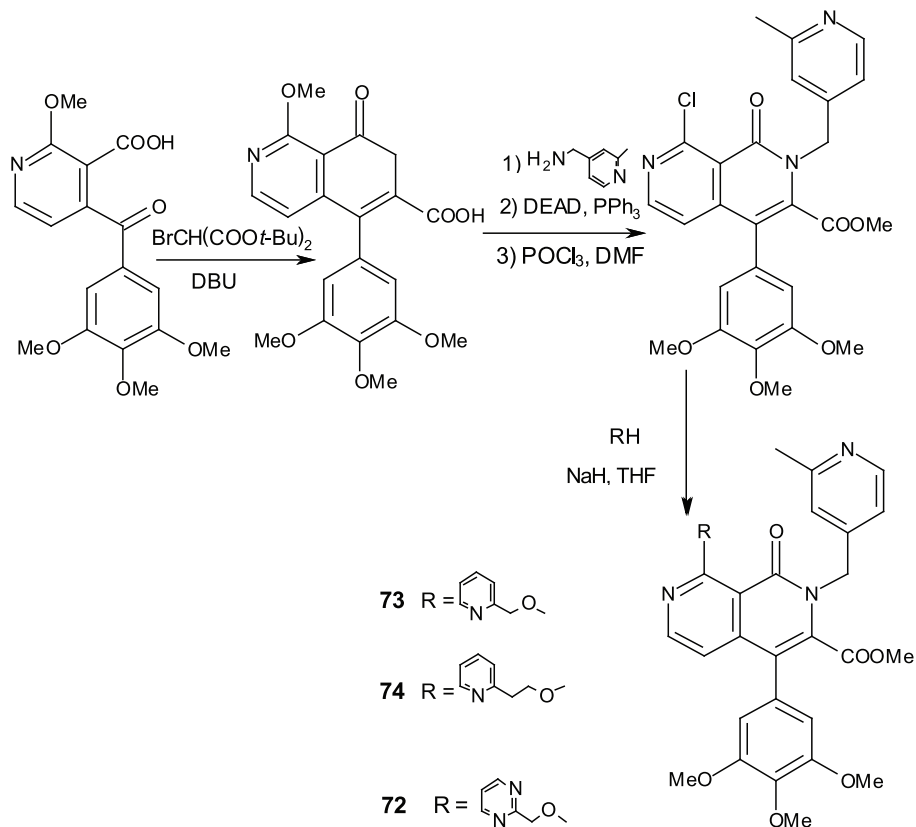
Opierając się na tych badaniach Kim i in. [52] otrzymali pochodne **66–70** a Nittoli i in. [53] pochodne **71** benzo[*c*][2,7]naftyrydyny, przeznaczone do testów w kierunku hamowania działania PDK-1.



Schemat 16
Scheme 16

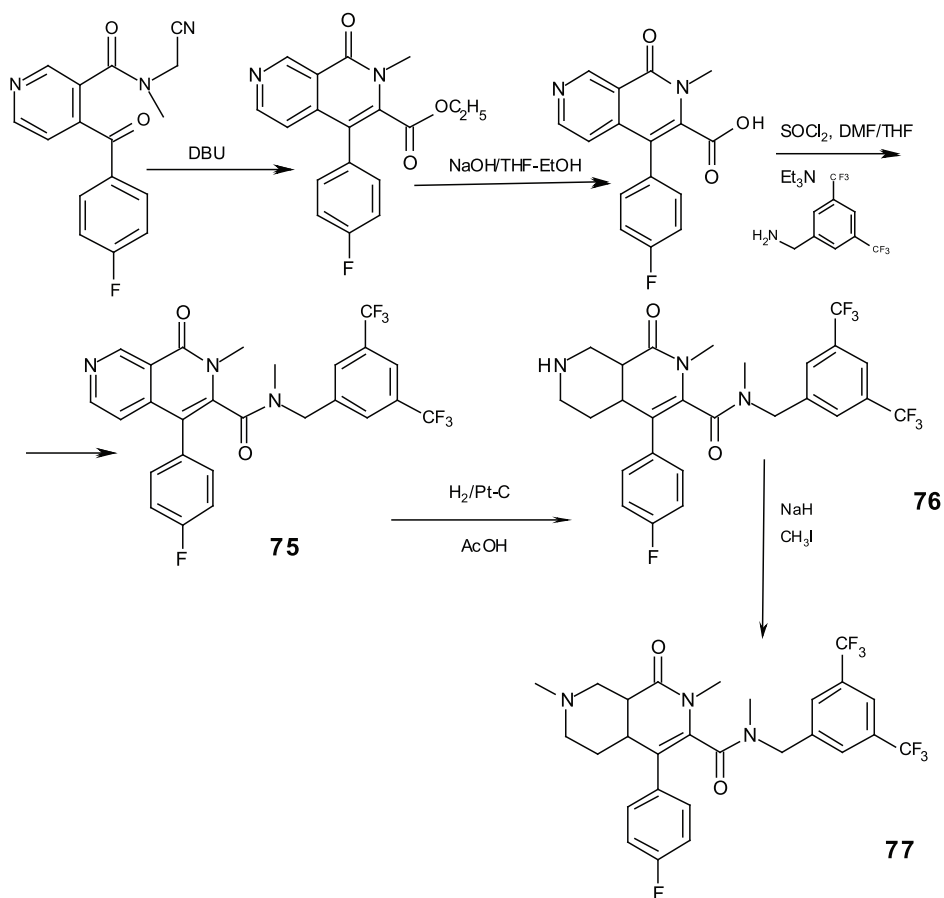
POCHODNE KWASU 2,7-NAFTYRYDYN-3-KARBOKSYLOWEGO

Kikkawa i in. zsyntetyzowali chlorowodorek estru metylowego 2-(2-metylo-pirydyn-4-ylo)metylo-4-(3,4,5-trimetoksyfenylo)-8-(pirymidyn-2-ylo)metoksy-1-okso-1,2-dihydro-2,7-naftyrydino-3-karboksylowego (T-0156) (**72**), który okazał się być silnym i selektywnym inhibitorem PDE5 [54]. W badaniach *in vitro* i *in vivo* działa silniej od stosowanego w leczeniu zaburzeń erekcji Sildenafilu [55]. Następnie opisano syntezę analogów T-0156 **72** o potencjalnej aktywności wobec PDE5, z których najsilniejsze a zarazem selektywne okazały się pochodne **73–74** [56].



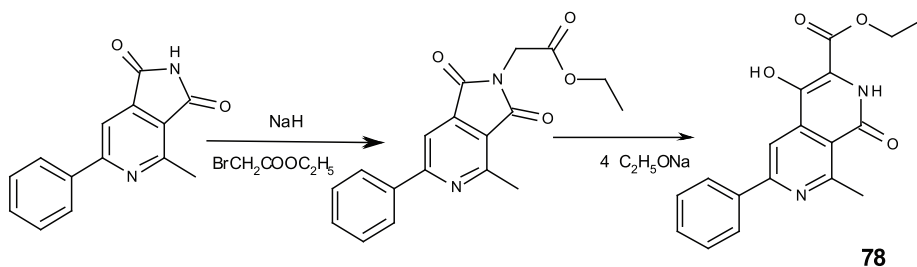
Schemat 17
Scheme 17

Amid kwasu 4-(p-fluorofenyleno)-2-metylo-1-okso-1,2-dihydro-2,7-naftyrydino-3-karboksylowego (**75**) oraz jego pochodne **76–77** są antagonistami receptora NK₁. Związki te mogą być wykorzystane w leczeniu stanów zapalnych, bólu, astmy, wymiotów czy reumatyzmu [57].



Schemat 18
Scheme 18

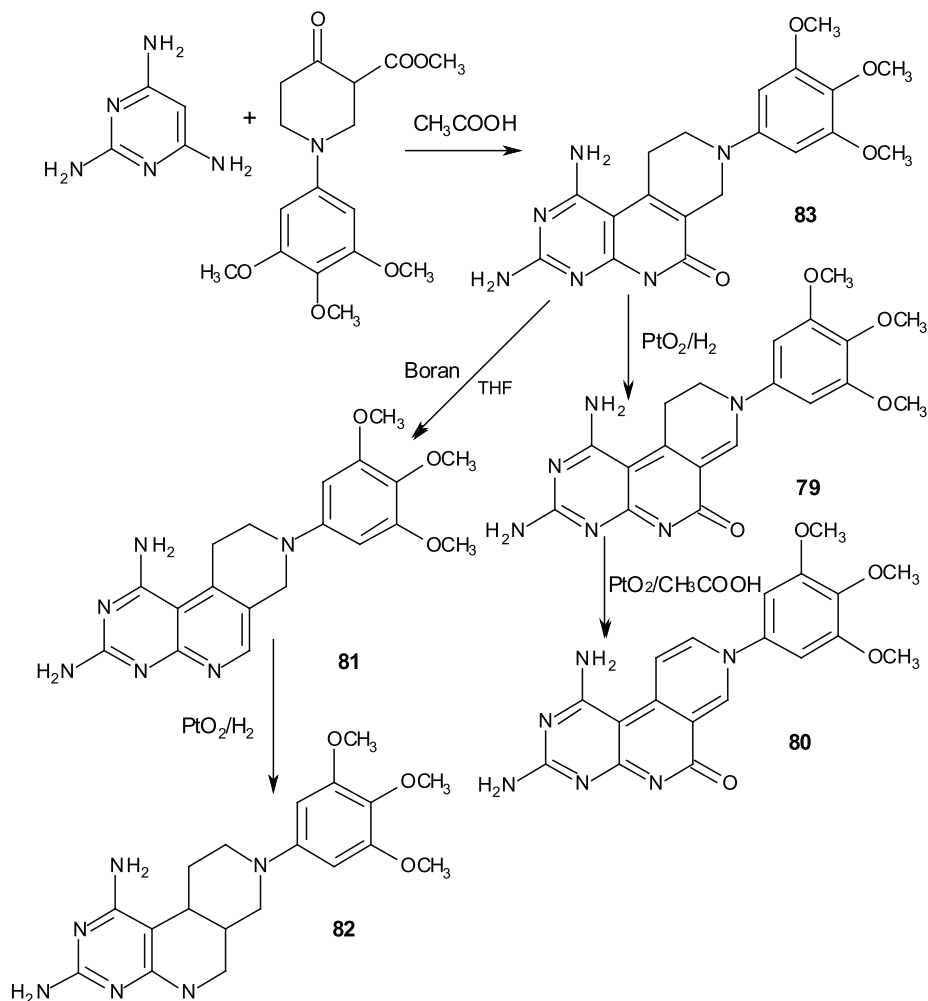
W 2009 roku opisaliśmy syntezę estru etylowego kwasu 6-fenyl-4-hydroksy-8-metylo-1-okso-1,2-dihydro-2,7-naftyrydino-3-karboksyowego (**78**) hamującego *in vitro* wzrost komórek nowotworowych jajnika [58].



Schemat 19
Scheme 19

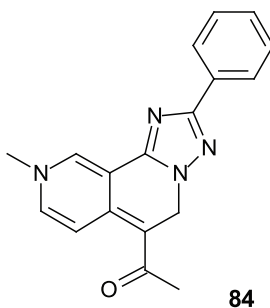
INNE POCHODNE 2,7-NAFTYRYDYNY

Pochodne pirymidyno[4,5-*c*][2,7]naftyrydyny **79–83** hamują reduktazę dihydrofolianową, wykazując właściwości przeciwnowotworowe i przeciwbakteryjne [59]. Najaktywniejsze jest połączenie **82**.



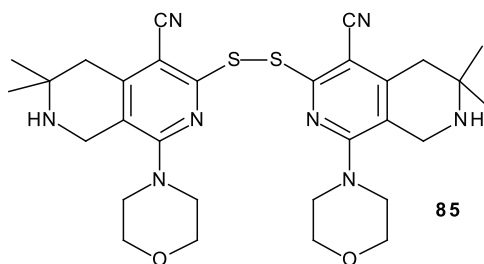
Schemat 20
Scheme 20

2-Fenyl-6-karboksymetylo-9-metylo-5,9-dihydro-[1,2,4]triazolo[5,1-*a*][2,7]naftyrydyna (**84**) jest selektywnym agonistą receptora adenyzynowego A_3 , przez co indukuje apoptozę komórek nowotworowych [60].



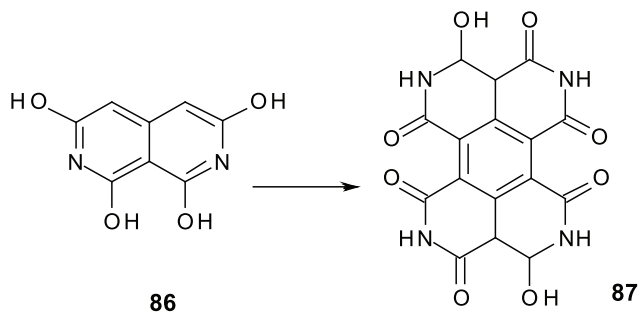
Rysunek 13
Figure 13

W 2002 roku zaprezentowano syntezę disulfidu 2,7-naftyrydyny (**85**) o działaniu przeciwdrgawkowym [61].



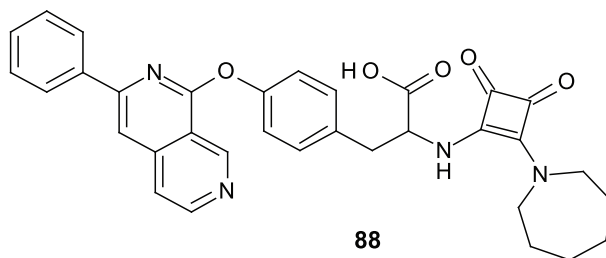
Rysunek 14
Figure 14

1,3,6,8-Tetrahydroksynaftyrydynę (**86**) – inhibitor syntetazy lumazynowej w procesie syntezy ryboflawiny u *Schizosaccharomyces pombe* przekształcono w etra-azaperylenoheksaon (**87**) o zwiększonej aktywności przeciwbakteryjnej [62].



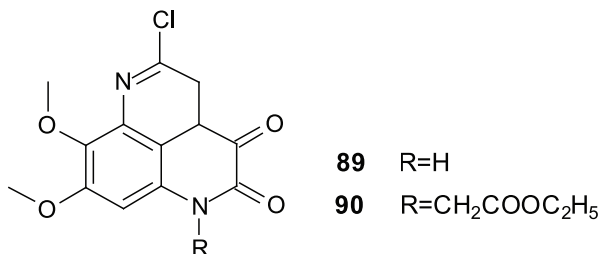
Schemat 21
Scheme 21

Otrzymany syntetycznie 2-heksahydroazepino-1-{2-[p-(3-fenyl-2,7-naftyrydyn-1-yloksy)-fenylo]-1-karboksyetyloamino}cyklobut-1-en-3,4-dion (**88**) osłabia zdolność wiązania się integrzyn z ich ligandami [63].



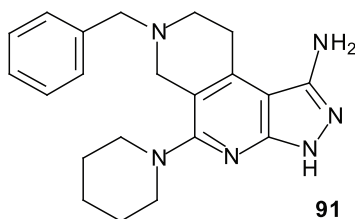
Rysunek 15
Figure 15

Pochodne 2,3-diketopirydo[4,3,2-*de*]chinoliny wykazują aktywność cytotoksyczną; związek **89** wobec komórek raka płuc, nerek, prostaty, piersi i czerniaka, natomiast związek **90** wobec komórek raka płuc i piersi [64].



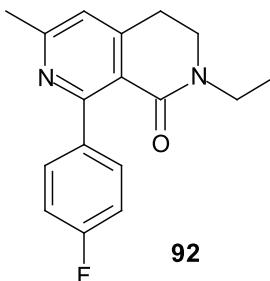
Rysunek 16
Figure 16

Guo i in. opracowali syntezę 7-bezylo-5-(piperydyn-1-ylo)-6,7,8,9-tetrahydro-3H-pirazolo[3,4-c][2,7]naftyrydyn-1-ylaminy (**91**), która jest agonistą BRS3 i może być wykorzystana w leczeniu otyłości [65].



Rysunek 17
Figure 17

2-Etylo-8-(4-fluorofenylo)-6-metylo-3,4-dihydro-2H-[2,7]naftyrydyn-1-on (SK-126) (**92**) wykazuje właściwości przeciwwzapalne [66].



Rysunek 18
Figure 18

PODSUMOWANIE

Szkielet 2,7-naftyrydyny występuje w alkaloidach wyizolowanych z roślin i organizmów morskich. Wiele z tych naturalnie występujących związków wykazuje różnorodne działanie biologiczne. Ze względu na szerokie spektrum aktywności biologicznej wzrasta zainteresowanie naukowców pochodnymi 2,7-naftyrydyny. Podejmowane są próby zarówno wyizolowania nowych alkaloidów, jak również otrzymywania połączeń 2,7-naftyrydyny na drodze syntezy chemicznej. Duże nadzieje wiąże się z ich potencjalną aktywnością przeciwnowotworową. Zaawansowane są badania farmakologiczne T-0156, który okazał się być silniejszym i bardziej selektywnym związkiem od stosowanego w leczeniu Sildenafilu [55]. Do tej pory pochodne układu 2,7-naftyrydyny nie zostały wprowadzone do leczenia, jednakże wzrost liczby publikacji i patentów dotyczących syntezy i właściwości tych połączeń daje nadzieje na uzyskanie nowych, aktywnych farmakologicznie związków.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] W.W. Paudler, T.J. Kress, *Adv. Heterocyclic Chem.*, 1970, **11**, 123.
- [2] G.Y. Leshner, E.J. Froelich, M.D. Gruett, J.H. Bailery, R.P. Brundage, *J. Med. Pharm. Chem.*, 1962, **91**, 1063.
- [3] S. Gabriel, J. Colman, *Chem. Ber.*, 1902, **35**, 1358.
- [4] J.W. Huff, *J. Biol. Chem.*, 1947, **164**, 151.
- [5] J.U. Rao, G.S. Giri, T. Hanumaiah, K.V.J. Rao, *J. Nat. Prod.*, 1986, **49**, 346.
- [6] F. Bracher, *Liebigs Ann. Chem.*, 1989, **1**, 87.
- [7] S.C. Liu, B. Oguntimein, C.D. Hufford, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1990, **34**, 529.
- [8] J.R. Peterson, J.K. Zjawiony S. Liu, C.D. Hufford, A.M. Clark, R.D. Rogers, *J. Med. Chem.*, 1992, **35**, 4069.
- [9] I. Muhammad, D.C. Dunbar, S. Takamatsu, L.A. Walker, A.M. Clark, *J. Nat. Prod.*, 2001, **64**, 559.

- [10] J. Kluza, R. Mazinghien, K. Degardin, A. Lansiaux, C. Bailly, *Eur. J. Pharm.*, 2005, **525**, 32.
- [11] M. Janot, J. Guilhem, O. Coutz, E. Venera, E. Clonga, *Ann. Pharm. Fr.*, 1979, **37**, 413.
- [12] H. Gross, D.E. Goeger, P. Hills, S.L. Mooberry, D.L. Balantine, T.F. Murray, F.A. Valeriotte, W.H. Gerwick, *J. Nat. Prod.*, 2006, **69**, 640.
- [13] M. Lotter, J. Schilling, E. Reimann, F. Bracher, *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.*, 2006, **339**, 677.
- [14] F. J. Schmitz, S.K. Agarwal, P.G. Schmidt, S.P. Gunasekera, J.N. Schooley, *J. Am. Chem. Soc.*, 1983, **105**, 4835.
- [15] T.F. Moliński, *Chem. Rev.*, 1993, **93**, 1825.
- [16] E. Delfourne, J. Bastide, *Med. Res. Rev.*, 2003, **23**, 234.
- [17] E.S. Guzman, B. Carte, N. Troupe, D.J. Faulkner, M.K. Harper, G.P. Concepcion, G.C. Mangalindan, S.S. Matsumoto, L.R. Barrows, C.M. Ireland, *J. Org. Chem.*, 1999, **64**, 1400.
- [18] D. Tasdemir, K.M. Marshall, G.C. Mangalindan, L.R. Barrows, M.K. Harper, C.M. Ireland, *J. Org. Chem.*, 2001, **66**, 3246.
- [19] A.M. Echavarren, J.K. Stille, *J. Am. Chem. Soc.*, 1988, **110**, 405.
- [20] A. Kubo, S. Nakahara, *Heterocycles*, 1988, **27**, 2095.
- [21] R.H. Prager, C. Tsopelas, *Heterocycles*, 1989, **29**, 847.
- [22] J. Kobayashi, J. Cheng, H. Nakamura, Y. Ohizumi, *Tetrahedron Lett.*, 1988, **29**, 1177.
- [23] C.J. Moody, C.W. Rees, R. Thomas, *Tetrahedron Lett.*, 1990, **31**, 4375.
- [24] C.J. Moody, C.W. Rees, R. Thomas, *Tetrahedron*, 1992, **48**, 3589.
- [25] Y. Feng, A. Rohan, R.A. Davis, M.L. Sykes, V.M. Avery, A.R. Carroll, D. Camp, R.J. Quinn, *Tetrahedron Lett.*, 2010, **51**, 2477.
- [26] N. Bontemps, D. Bry, S. Lopez-Legentil, A. Simon-Levert, C. Long, B. Banaigs, *J. Nat. Prod.*, 2010, **73**, 1044.
- [27] D.R. Appleton, A.N. Pearce, B.R. Copp, *Tetrahedron*, 2010, **66**, 4977.
- [28] F.J. Schmitz, E.S. DeGuzman, M.B. Hossain, D. van der Helm, *J. Org. Chem.*, 1991, **56**, 804.
- [29] I. Bonnard, N. Bontemps, S. Lahmy, B. Banaigs, G. Combaut, C. Francisco, P. Colson, C. Houssier, C. Bailly, M.J. Waring, *Anti-cancer Drug Design*, 1995, **10**, 333.
- [30] N. Bontemps, I. Bonnard, B. Banaigs, G. Combaut, C. Francisco, *Tetrahedron Lett.*, 1994, **35**, 7023.
- [31] Y. Kitahara, F. Tamura, M. Nishimura, A. Kubo, *Tetrahedron*, 1998, **54**, 8421.
- [32] J.A. de la Fuentez, M.J. Martín, M.M. Blanco, E. Pascual-Alfonso, C. Avendaño, J.C. Menéndez, *Bioorg. Med. Chem.*, 2001, **9**, 1807.
- [33] R.E. Longley, O.J. McConnell, E. Essich, D. Harmody, *J. Nat. Prod.*, 1993, **56**, 915.
- [34] A.R. Carroll, P.J. Scheuer, *J. Org. Chem.*, 1990, **55**, 4426.
- [35] G.P. Gunawardana, U. Premachandran, N.S. Burres, D.N. Whittern, R. Henry, S. Spanton, J.B. McAlpine, *J. Org. Chem.*, 1992, **57**, 1523.
- [36] C. Eder, P. Schupp, P. Proksch, V. Wray, K. Steube, C.E. Muller, W. Frobenius, M. Herderich, *J. Nat. Prod.*, 1998, **61**, 301.
- [37] L.A. McDonald, G.S. Elredge, L.R. Barrows, C.M. Ireland, *J. Med. Chem.*, 1994, **37**, 3819.
- [38] Y. Kitahara, S. Nakahara, T. Yonezawa, M. Nagatsu, Y. Shibano, A. Kubo, *Tetrahedron*, 1997, **53**, 17029.
- [39] M.J. Bishop, M.A. Ciufolini, *J. Am. Chem. Soc.*, 1992, **114**, 1008.
- [40] M.A. Ciufolini, Y.C. Shen, *Tetrahedron Lett.*, 1995, **36**, 4709.
- [41] A. Pulbrukarn, B.S. Davidson, *J. Org. Chem.*, 1998, **63**, 1657.
- [42] B.R. Copp, J. Jompa, A. Tahir, C.M. Ireland, *J. Org. Chem.*, 1998, **63**, 8024.
- [43] D. Skyler, C.H. Heathcock, *Org. Lett.*, 2001, **3**, 4323.
- [44] T.F. Moliński, E. Fahy, D.J. Faulkner, G.D. Van Duyne, J. Clardy, *J. Org. Chem.*, 1988, **53**, 1340.
- [45] A.R. Carroll, A. Ngo, R.J. Quinn, J. Redburn, J.N.A. Hooper, *J. Nat. Prod.*, 2005, **68**, 804.

- [46] E.C. Barnes, N.A.B.M. Said, E.D. Williams, J.N.A. Hooper, R.A. Davis, *Tetrahedron*, 2010, **66**, 283.
- [47] J.A. Clement, M. Li, S.M. Hecht, D.G.I. Kingston, *Bioorg. Med. Chem.*, 2008, **16**, 10022.
- [48] E. Delfourne, R. Kiss, L. Le Corre, F. Dujols, J. Bastide, F. Collignon, B. Lesur, A. Frydman, F. Darro, *Bioorg. Med. Chem.*, 2004, **12**, 3987.
- [49] K. Gorlitzer, Ch. Bonnekessel, P.G. Jones, A. Paluszczak, R.W. Hartmann, *Pharmazie*, 2006, **61**, 975.
- [50] K. Gorlitzer, C.H. Enge, P.G. Jones, H. Jomaa, J. Wiesner, *Pharmazie*, 2007, **62**, 89.
- [51] A. Gopalsamy, M. Shi, D.H. Boschelli, R. Williamson, A. Olland, *J. Med. Chem.*, 2007, **50**, 5547.
- [52] K.H. Kim, *Bioorg. Med. Chem.*, 2009, **19**, 5225.
- [53] T. Nattoli, G.R. Dushin, C.I. Cheung, M.B. Floyd, H. Fraser, A. Olland, Y. Hu, G. Grosu, X. Han, K. Arndt, B. Guo, A. Wissner, *Eur. J. Med. Chem.*, 2010, **45**, 1379.
- [54] K. Kikkawa, T. Noto, K. Yano, H. Inoue, H. Mochida, M. Takagi, *Jpn. J. Pharmacol.*, 2001, **85**, 282P.
- [55] H. Mochida, M. Takagi, H. Inoue, T. Noto, K. Yano, K. Fujishige, T. Sasaki, K. Yuasa, J. Kotera, K. Omori, *Eur. J. Pharm.*, 2002, **456**, 91.
- [56] T. Ukita, Y. Nakamura, A. Kubo, Y. Yamamoto, Y. Moritani, K. Saruta, T. Higashijima, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2003, **13**, 2341.
- [57] Y. Ikeura, T. Tanaka, Y. Kiyota, S. Morimoto, M. Ogino, T. Ishimaru, I. Kamo, T. Doi, H. Natsugari, *Chem. Pharm. Bull.*, 1997, **45**, 1642.
- [58] E. Wagner, A. Wójcicka, I. Bryndal, T. Lis, *Polish J. Chem.*, 2009, **83**, 207.
- [59] A. Gangjee, J. Shi, S.F. Queener, *J. Med. Chem.*, 1997, **40**, 1930.
- [60] Y. Yao, Y. Sei, M.P. Abbracchio, J.-L. Jiang, Y.-C. Kim, K.A. Jacobson, *Bioch. Bioph. Res. Commun.*, 1997, **232**, 317.
- [61] E.G. Paronikyan, A.S. Noravyan, I.A. Dzhagatspanyan, I.M. Nazaryan, R.G. Paronikyan, *Pharm. Chem. J.*, 2002, **36**, 465.
- [62] Y. Zhang, B. Illarionov, A. Bacher, M. Fischer, G.I. Georg, Q. Ye, D. Velde, P. E. Fanwick, Y. Song, M. Cushman, *J. Org. Chem.*, 2007, **72**, 2769.
- [63] J. Clifford, C. McKay, J.R. Porter, *PCT. Int. Appl. WO 2002042264*, UK, C.A., **136**, 401746, 2002.
- [64] Q. Ding, J.W. Lown, *J. Org. Chem.*, 1999, **64**, 7965.
- [65] Ch. Guo, P.R. Guzzo, M. Hadden, B.J. Sargent, L. Yet, Y. Kan, O. Palyha, T.M. Kelly, X. Guan, *Bioorg. Med. Chem.*, 2010, **20**, 2785.
- [66] K. Kang, H. Kim, K.I. Kim, Y. Yang, D.Y. Yoon, J.H. Kim, J.H. Ryu, E.J. Noh, S.D. Jeon, J.S. Lim, *Bioch. Pharm.*, 2008, **75**, 1054.

Praca wpłynęła do Redakcji 17 grudnia 2010

**NITROKSYL (HNO/NO⁻) – CZĄSTECZKA
O POTENCJALNYM ZNACZENIU
FARMAKOLOGICZNYM**

**NITROXYL (HNO/NO⁻) – THE MOLECULE OF
PHARMACOLOGICAL SIGNIFICANCE**

**Aleksandra Augustyniak¹, Janusz Skolimowski²,
Renata Kontek¹, Alina Błaszczyk^{1*}**

¹ *Katedra Genetyki Ogólnej, Biologii Molekularnej i Biotechnologii Roślin,
Uniwersytet Łódzki,*

ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź

² *Katedra Chemii Organicznej, Uniwersytet Łódzki,*

ul. Tamka 12, 91-403 Łódź

**e-mail: ablasz@biol.uni.lodz.pl*

Abstract

Wstęp

1. Nitroksyl jako związek z grupy tlenków azotu
2. Powstawanie nitroksylu w układach biologicznych
3. Donory nitroksylu
4. Detekcja nitroksylu
5. Właściwości biologiczne nitroksylu
6. Znaczenie farmakologiczne nitroksylu

Podsumowanie

mgr Aleksandra Augustyniak, doktorantka w Pracowni Cytogenetyki, Katedry Genetyki Ogólnej, Biologii Molekularnej i Biotechnologii Roślin Uniwersytetu Łódzkiego. Dyplom magistra uzyskała w 2010 r. i obecnie kontynuuje naukę na studiach doktoranckich. W swojej pracy naukowej zajmuje się badaniem właściwości biologicznych nitroksylu. Celem pracy badawczej jest analiza cytotoksycznych, genotoksycznych i mutagennych właściwości tej cząsteczki generowanej przez sól Angeli'ego.

dr Janusz Skolimowski, starszy wykładowca w Katedrze Chemii Organicznej Uniwersytetu Łódzkiego. Dorobek naukowy obejmuje liczne publikacje w czasopismach międzynarodowych (45), komunikaty na konferencjach krajowych i zagranicznych (75), patenty (6), współautorstwo 2 rozdziałów w monografii. Zainteresowania naukowe dotyczą rodników nitroksylowych, pochodnych hydrocyklicznych fosforu, naturalnych i syntetycznych antyoksydantów, leków przeciwnowotworowych, związków acetylenowych oraz nowych biomateriałów mających zastosowanie w biomedycynie. Wielokrotnie odbywał staże naukowe na uniwersytetach amerykańskich, francuskich i japońskich. Uzyskał nagrody naukowe Ministra Edukacji Narodowej, Rektora Uniwersytetu Łódzkiego oraz Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego. Specjalność naukowa: chemia organiczna

dr Renata Kontek, adiunkt w Pracowni Cytogenetyki, Katedry Genetyki Ogólnej, Biologii Molekularnej i Biotechnologii Roślin Uniwersytetu Łódzkiego. Prowadzone badania dotyczą właściwości biologicznych leków przeciwnowotworowych stosowanych klinicznie i nowo zsyntetyzowanych związków o potencjalnym znaczeniu farmakologicznym a także powszechnie wykorzystywanych antyoksydantów, stosowanych w połączeniu z badanymi cytostatykami. Specjalność naukowa: genetyka, cytogenetyka.

dr hab. Alina Błaszczyk, prof. nadzw. Uniwersytetu Łódzkiego w Pracowni Cytogenetyki, Katedry Genetyki Ogólnej, Biologii Molekularnej i Biotechnologii Roślin Uniwersytetu Łódzkiego. W swojej pracy naukowej przez wiele lat zajmowała się badaniem w warunkach *in vivo* i *in vitro* mutagenności stosowanych powszechnie pestycydów fosforoorganicznych, czego efektem była praca doktorska pt. „Wpływ insektycydów na powstawanie aberracji chromosomowych i mutacji genowych” (1987). Tematem badań w następnych latach była analiza wpływu antyoksydantów na genotoksyczne efekty działania leku przeciwnowotworowego – chlorometyny, a także analiza osobniczej wrażliwości na działanie tego związku. W ostatnich latach zainteresowania naukowe skupiały się na analizie właściwości biologicznych etoksyquinu – antyoksydantu stosowanego w paszach i karmach dla zwierząt. Wyniki tych badań były tematem rozprawy habilitacyjnej zatytułowanej „Właściwości biologiczne 1,2-dihydro-6-etoksy-2,2,4-trimetylocholinoliny oraz nowych potencjalnych antyoksydantów” (2008). Specjalność naukowa: genetyka, cytogenetyka.

ABSTRACT

Nitrogen compounds, as an essential component of many reactions occurring in living organisms, become the object of an extensive research. These compounds became the focus of interest after the properties of nitric oxide, currently the best known nitrogen oxide, had thoroughly been studied [1–3]. Recently, particular attention has been paid to nitroxyl (HNO/NO⁻), which is the product of one-electron reduction of NO[•] [4]. Formation of nitroxyl *in vivo* is still controversial. It seems that this compound could be formed by the reaction of S-nitrosothiols with other thiol proteins (e.g. GSH), directly through the nitric oxide synthetase (NOS), through the oxidation of hydroxylamine by the peroxidase activity of heme proteins or as a result of reduction of nitric oxide NO[•] [5, 6]. Nitroxyl is a liable compound due to dimerization, so it is necessary to use its donors in experiments. Angeli's salt which forms HNO at physiological pH is the most commonly used donor [7]. Moreover, Piloty's acid, cyanamide, diazonium diolates or a group of acyloxy nitroso compounds are also used. There are some difficulties with detection of nitroxyl in biological systems. So far, nitroxyl was indirectly identified by detection of N₂O, a product of HNO dimerization. Presently, nitroxyl is an object of intensive studies aiming at finding techniques of its direct detection. Recently two such techniques have been designed: one using the reaction of HNO with triarylphosphines, and the other with BOT1 (staining agent) complexed with copper ions, which gives fluorescent signals revealing HNO in living cells [8, 9]. Nitroxyl turned out to have great pharmacological potential [10, 11]. It was demonstrated that this compound affected the activity of many proteins reacting with their thiol groups [12, 13]. Moreover, HNO/NO⁻ influences the contractility of blood vessels and therefore has inotropic and lusitropic effects on myocardium [14]. Nitroxyl seems to be very promising in treating cancerous diseases as it inhibits the activity of an enzyme involved in the process which is the most important for cancer cells – glycolysis [15].

Keywords: nitroxyl, Angeli's salt, nitroxyl donors, nitric oxide

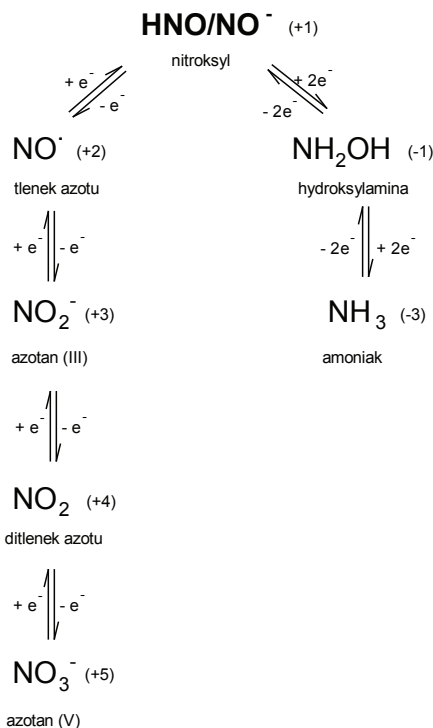
Słowa kluczowe: nitroksyl, sól Angeli'ego, donory nitroksylu, tlenek azotu

WSTĘP

Związki powstające z połączenia atomów tlenu i azotu stanowią ważny składnik wielu reakcji zachodzących w komórkach, zarówno w warunkach fizjologicznych jak i patologicznych. Na tlenki azotu zwrócono uwagę dzięki badaniom nad nitrogliceryną, którą przez wiele lat stosowano w kardiologii w celu likwidowania bólów wieńcowych nie znając jej mechanizmu działania [16, 17]. Dopiero pod koniec lat 70. stwierdzono, że rozszerzenie naczyń krwionośnych i ustąpienie objawów bólowych następuje na skutek metabolicznej przemiany nitrogliceryny z wytworzeniem tlenku azotu. Badania doprowadziły do odkrycia że śródbłonkowy czynnik rozluźniający powodujący rozkurcz mięśniówki gładkiej naczyń krwionośnych (ang. *endothelium-derived relaxing factor*, EDRF), którego wytwarzanie w organizmie ludzkim zostało odkryte pod koniec lat 80., jest tlenkiem azotu [1–3]. Zainicjowane wówczas intensywne badania pokazały, że bierze on udział w przekazywaniu sygnałów komórkowych i uczestniczy w wielu fizjologicznych procesach [18, 19]. Jedną z najważniejszych funkcji tej cząsteczki jest rozkurczające działanie na naczynia krwionośne (Tab. 1) [20]. Liczne odkrycia naukowe związane z fizjologiczną rolą tlenku azotu spowodowały, że w 1992 roku został on ogłoszony „cząsteczką roku” przez „Science”, prestiżowy, amerykański tygodnik naukowy [21]. W 1998 roku trzech amerykańscy naukowcy Robert F. Furchgott, Louis Ignarro i Ferid Murad za wyjaśnienie roli tlenku azotu jako środka działającego na mięśnie gładkie układu krwionośnego uhonorowani zostali Nagrodą Nobla. W latach późniejszych przedmiotem wielu badań były także inne produkty utleniania tlenku azotu, takie jak: nadtlenoazotyn (ONOO^-), dwutlenek azotu (NO_2), tritlenek azotu (N_2O_3). W ostatnich latach zwrócono uwagę na kolejny związek azotowy – nitroksyl (HNO/NO^-), który powiązany jest z tlenkiem azotu (NO^*) poprzez jego jednoelektronową redukcję i protonację. Cząsteczce tej przypisuje się ważne biologicznie funkcje, takie jak działanie antykarcinogenne oraz, podobnie jak w przypadku tlenku azotu NO^* , relaksacyjne oddziaływanie na naczynia krwionośne [22]. Porównawcze badania nad cytotoxycznością HNO/NO^- i tlenku azotu NO^* , a także wpływem glutationu (GSH) na cytotoxyczność HNO/NO^- wykazały jednak, że te dwie cząsteczki (tlenek azotu i nitroksyl) mogą, oprócz podobnego efektu końcowego wywieranego na naczynia krwionośne, wykazywać w systemach biologicznych również odmienne działania [23, 24]. Odkrycia te dały impuls do podejmowania badań dotyczących HNO/NO^- – niedocenianej wcześniej formy tlenku azotu. Badania te dotyczą obecnie przede wszystkim mechanizmów powstawania HNO w organizmie człowieka i identyfikacji markerów pozwalających na wykrywanie tej cząsteczki w systemach biologicznych, a także syntezy nowych jej donorów, których właściwości umożliwiłyby ich zastosowanie w praktyce klinicznej.

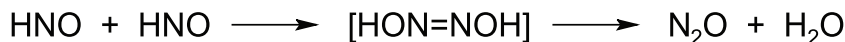
1. NITROKSYL JAKO ZWIĄZEK Z GRUPY TLENKÓW AZOTU

Terminem nitroksyl określana jest cząsteczka HNO (znana jest także jako wodorek nitrozylu), a także jej zdeprotonowana forma NO⁻. Są to najprostsze cząsteczki z azotem na +1 stopniu utlenienia, produkty jednoelektronowej redukcji tlenku azotu (+2) (Schemat 1).



Schemat 1. Schemat redoks dla tlenków azotu
Scheme 1. Redox scheme for the nitric oxides

Nitroksyl jest cząsteczką wysoce reaktywną, co powoduje, że badania nad jego biologicznymi i fizycznymi właściwościami nie są łatwe. Ulega on bowiem szybkiej, nieodwracalnej dimeryzacji (Schemat 2), w wyniku czego powstaje pośrednio labilny kwas, który ulega dehydratacji uwalniając wodę i podtlenek azotu.



Schemat 2. Reakcja dimeryzacji nitroksylu
Scheme 2. Dimerization of nitroksyl

Powstawanie podtlenku azotu umożliwia pośrednie wykrywanie obecności nitroksylu w systemach biologicznych po zastosowaniu separatywnej chromatografii gazowej lub spektrometrii gazowej [25]. Właściwości chemiczne nitroksylu w porównaniu z właściwościami tlenku azotu (+2) zestawiono w Tabeli 1. Pierwsze

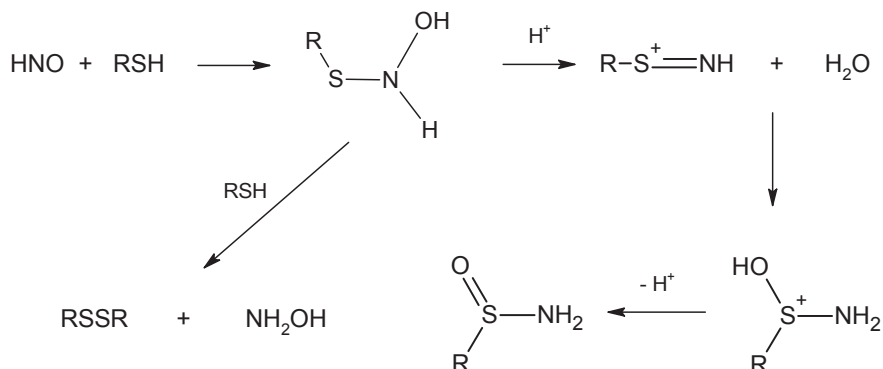
doniesienia o kwasowości HNO mówiły, że wartość pKa wynosi 4,7, co wskazywało na to, że jest to związek kwasowy a jego główną postacią w warunkach fizjologicznych jest anion NO^- [26]. Późniejsze badania wykazały jednak, że wartość pKa wynosi 11,4 [25, 27] – w fizjologicznym zakresie pH dominującą formą nitroksylu jest więc sprotonowana forma $\text{NO}^- - \text{HNO}$ [28].

Tabela. 1. Najważniejsze właściwości i aktywność biologiczna nitroksylu (HNO/NO^-) w porównaniu z tlenkiem azotu, NO^\bullet
Table1. The most important properties and biological activity of nitroxyl (HNO/NO^-) in comparison to nitric oxide, NO^\bullet

HNO/NO-	NO•
Właściwości chemiczne i biochemiczne	
<ul style="list-style-type: none"> - wysoka reaktywność - czas życia wynosi mniej niż 0,1 s - w reakcji z grupami hemowymi preferuje grupy żelazowe (Fe^{3+}) a nie żelazawe (Fe^{2+}) - po reakcji HNO z O_2 powstają oksydanty inne niż ONOO⁻, nie reaguje z $\cdot\text{O}_2^-$ - posiada silne właściwości tiofilowe - indukuje wzrost poziomu cAMP - induktor antyoksydacyjnej oksygenazy hemowej-1 - powstawanie: nie tylko przy udziale syntazy tlenu azotu (NOS), ale także w innych reakcjach 	<ul style="list-style-type: none"> - brak bezpośredniej reaktywności - czas życia wynosi od 10 ms do 1s - w reakcji z grupami hemowymi preferuje grupy żelazawe (Fe^{2+}) - reaguje z $\cdot\text{O}_2^-$ i O_2 generując NO_2, N_2O_3 lub ONOO⁻ - nie reaguje bezpośrednio z grupami tiolowymi - indukuje wzrost poziomu cGMP - induktor antyoksydacyjnej oksygenazy hemowej-1 - powstawanie: głównie w wyniku działania syntazy tlenu azotu
Najważniejsze efekty fizjologiczne	
<ul style="list-style-type: none"> - wpływa na kurczliwość naczyń - zmniejsza tętniczne ciśnienie krwi - działanie inotropowe i lusitropowe - hamuje agregację płytek krwi - chroni przed niedokrwiennym uszkodzeniem mięśnia sercowego - induktor apoptozy i nekrozy 	<ul style="list-style-type: none"> - wpływa na kurczliwość naczyń - zmniejsza tętniczne ciśnienie krwi - efekt izotropowy negatywny lub słaby - hamuje agregację płytek krwi - chroni przed uszkodzeniem mięśnia sercowego, gdy jest wcześniej obecny - inhibitor apoptozy przy niskich stężeniach - działa hamująco na układ współczulny - bierze udział w wytwarzaniu pamięci długotrwałej - regulator odpowiedzi immunologicznej

Nitroksyl jest związkiem wysoce reaktywnym i może działać jako związek elektrofilowy. Nie reaguje jednak ze wszystkimi związkami nukleofilowymi, ale działa wobec nich wybiórczo. Bardzo łatwo reaguje z tiolami, aminami i fosfinami dając, odpowiednio: disulfidy lub sulfonamidy, związki diazenowe i aza-yliidy, ale nie reaguje z nukleofilową wodą i alkoholami. W reakcji z tiolami elektrofilowy atom azotu w cząsteczce nitroksylu jest atakowany przez nukleofilowy atom siarki, co prowadzi przypuszczalnie do powstawania N-hydroksysulfenamidu (Rys. 1) [29, 30]. Reakcja tego związku z nadmiarem tioli może z kolei prowadzić do powstawania

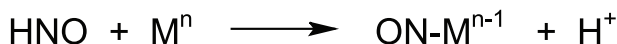
odpowiedniego disiarczku i hydroksylaminy. W innej reakcji N-hydroksylsulfenamid może ulec izomeryzacji do sulfonamidu. Taką reakcję obserwowano podczas enzymatycznej redukcji S-nitrozo-glutationu [31, 32].



Rysunek 1. Reakcja elektrofilowego HNO z tiolami

Figure 1. Reaction of electrophile HNO with thiols

Oprócz reakcji z tiolami nitroksyl może reagować z jonami żelaza hemu Fe³⁺, co powoduje, że w wyniku reakcji nitrozylowania powstaje połączenie nitrozył-żelazo Fe²⁺. Takie reakcje mogą również zachodzić z innymi metalami, np. z miedzią i magnezem.



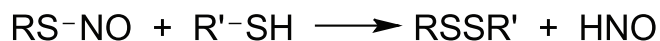
Schemat 3. Reakcje nitroksylu z metalami (M)

Scheme 3. Reactions of nitroxy with metals (M)

Cząsteczka nitroksylu ma zdolność do reagowania z tlenem. Reakcja ta przebiega wolno, a jej wynikiem są reaktywne formy azotu (RFA). Początkowo przypuszczano, że jedną z nich jest nadtlenoazotyn (ONOO⁻), przeprowadzone badania nie potwierdziły jednak tej tezy [33]. Reaktywność nitroksylu zależna jest od jego stanu spinowego. Cząsteczka tripletowa (³NO⁻), powstająca w wyniku fotolizy soli Angelięgo w warunkach tlenowych, reaguje z tlenem w stanie podstawowym dając nadtlenoazotyn [34]. Z soli ulegającej dekompozycji w warunkach fizjologicznych uwalniane są singletowe cząsteczki nitroksylu (¹HNO) [35], które mają zdolność do tworzenia reaktywnych cząstek o naturze innej niż nadtlenoazotyn [36]. Związek ten jest mediatorem w jedno- i dwuelektronowej reakcji oksydacji, natomiast produkt reakcji tlenu z nitroksylem efektywnie uczestniczy tylko w reakcji oksydacji dwuelektronowej. Nadtlenoazotyn jest zdolny do nitrowania niskocząsteczkowych fenoli (głównie tyrozyny, w mniejszym stopniu tryptofanu, histydyny czy metioniny) [37], podczas gdy sól Angelięgo jest raczej czynnikiem hydroksylującym [33].

2. POWSTAWANIE NITROKSYLU W UKŁADACH BIOLOGICZNYCH

Dotychczasowy brak większego zainteresowania tą formą tlenu azotu wynika prawdopodobnie z faktu, że nie było dowodów na powstawanie nitroksylu (HNO/NO^-) *in vivo* z powodu braku bezpośrednich metod jego detekcji w systemach biologicznych. Możliwości generowania cząsteczki nitroksylu dyskutowali Fukuto i in. [5], według których jednym ze źródeł nitroksylu w komórkach mogą być S-nitrozotiole powstające z reakcji białek lub peptydów tiolowych z endogennie generowanymi tlenkami azotu. S-nitrozowanie białek tiolowych (transnitrozylacja) jest ważnym elementem transdukcji sygnału w komórce i jest „przełącznikiem” zmieniającym aktywność białek enzymatycznych. Wong i in. [29] obserwowali generowanie HNO w wyniku reakcji S-nitrozotiole z innymi cząsteczkami tiolowymi, np. z glutationem, GSH (Schemat 4), w której związek tiolowy atakuje atom siarki cząsteczki S-nitrozotiole.

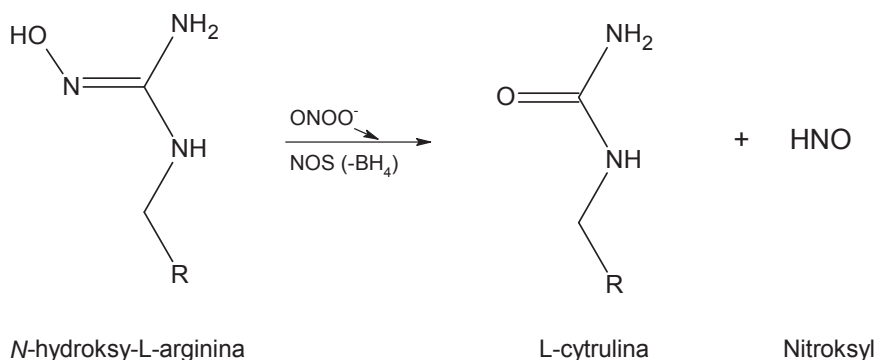


Schemat 4. Reakcja S-nitrozotiole z cząsteczką tiolową prowadząca do powstania disulfidu i nitroksylu
 Scheme 4. Reaction of S-nitrosothiol with the molecule of thiol resulting in disulphide and nitroxyl formation

Endogenne powstawanie HNO w wyniku dekompozycji S-nitrozotiole, takich jak: S-nitrozoglutation, S-nitrozokaspaza 3, S-nitrozometalotioneina wykazali dość wiadcześnie Stoyanowsky i in. [38]. Autorzy stwierdzili, że w procesie denitrozowania S-nitrozotiole ważną rolę ogrywa tioredoksyna, a także kwas dihydroliponowy, katalizujące ten proces, zarówno w systemach chemicznych jak i biologicznych. Wyniki eksperymentów wskazują więc na to, że komórkowe S-nitrozotiole mogą stanowić istotne źródło powstawania nitroksylu w komórkach.

Niektóre badania wskazują na to, że HNO może być generowany wskutek oksydacyjnej degradacji N-hydroksy-L-argininy (wykrywanej w osoczu w znaczącym stężeniu – powyżej 20 μM) [10, 39, 40] lub w wyniku bezpośredniej aktywności syntazy tlenu azotu – NOS (Rys. 2) [6, 41].

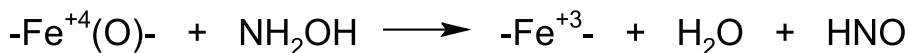
Enzym ten zawiera jako grupę prostetyczną tetrahydrobiopterynę (BH_4), aktywującą przyłączenie do hemu tlenu poprzez przekazanie jednego elektronu, który później odzyskany umożliwia uwolnienie zsyntetyzowanej cząsteczki NO^\bullet . Adak i in. [42] wykorzystując neuronalną syntazę tlenu azotu (nNOS) pozbawioną tetrahydrobiopteryny analizowali znaczenie udziału hemu i tetrahydrobiopteryny dla syntezy tlenu azotu. Autorzy stwierdzili, że kofaktor ten nie jest niezbędny w procesie syntezy tlenu azotu, chociaż wzmacnia aktywność enzymu. Ustalili również, że nNOS pozbawiona tetrahydrobiopteryny może prowadzić do powstawania nitroksylu (HNO), a wyłączną i najważniejszą rolę BH_4 jest umożliwienie nNOS generowania NO^\bullet zamiast HNO.



Rysunek 2. Biosynteza nitroksylu z *N*-hydroksy-L-argininy poprzez jej utlenianie nadtlenoazotem (ONOO⁻) lub przy udziale syntazy tlenu azotu (NOS) pozbawionej tetrahydrobiopteryny (BH₄) (wg Irvine i in., [41], zmienione)

Figure 2. Biosynthesis of HNO from *N*-hydroxy-L-arginine by its oxidation with peroxynitrite (ONOO⁻) or with tetrahydrobiopterin(BH₄)-free nitric oxide syntase (NOS) (according to Irvine et al., [41])

Kolejnym sposobem endogennego powstawania nitroksylu jest utlenienie hydroksylaminy dzięki peroksydazowej aktywności białek hemowych (Schemat 5) [43].



białko z grupą hemową

Schemat 5. Utlenienie hydroksylaminy prowadzące do powstania nitroksylu (wg Switczera i in. [43], zmienione)

Scheme 5. Generation of nitroxyl by oxidation of hydroxylamine (according to Switzer et. al. [43], changed)

Prosta redukcja tlenu azotu (NO^{*}) również może endogennie generować nitroksyl. Taka redukcja może mieć miejsce w mitochondriach [44, 45], poprzez reakcję z ubichinonem [46], cytochromem c [47], dysmutazą nadtlenu manganu [48] czy oksydazą ksantynową [49]. Badania Zhao i in. [45] wykazały, że redukcja NO do N₂O jest katalizowana przez oksydazę cytochromu c w warunkach beztlenowych, przy pH 7,2 i w temperaturze pokojowej. Reakcja ta jest hamowana poprzez cyjanki, które tworzą Fe³⁺_{cyta3}CN. Produktem pośrednim podczas powstawania N₂O jest mononitrozyl (Fe³⁺_{cyta3}NO). Jednoelektronowa redukcja NO przy Fe³⁺_{cyta3} może prowadzić do powstania N₂O poprzez cząsteczkę nitroksylu – HNO. Z kolei z badań Sharpe'a i Cooper'a [47] wynika, że reakcja tlenu azotu (NO^{*}) z ferri- i ferrocycytochromem c ma istotny wpływ na zmniejszenie zużycia przez NO^{*} tlenu pochodzącego z mitochondriów, a przez to na mitochondrialny metabolizm tlenu azotu (NO^{*}). Ferrocycytochrom c redukuje NO^{*} do nitroksylu w formie niesprotonowanej – NO⁻, z kolei dostający się egzogennie (poprzez donory) anion nitroksylowy jest utleniany z wykorzystaniem ferricytochromu c. Wydaje się więc prawdopodobne, że produkcji NO⁻ *in vivo* sprzyja wysokie stężenie tlenu azotu (NO^{*}) i zredukowana

pula cytochromu c. Taka sytuacja ma miejsce podczas miejscowego niedokrwienia (ischemii). Niedobór tlenu sprawia wtedy, że oksydaza cytochromowa nie może utlenić tego cytochromu, co prowadzi do wzrostu poziomu NO•.

3. DONORY NITROKSYLU

Ze względu na niestabilność i szybką dimeryzację nitroksylu w roztworach wodnych, w badaniach zarówno chemicznych jak i biologicznych właściwości nitroksylu, konieczne jest stosowanie związków mających zdolność generowania HNO/NO⁻ (Tab. 2). Najczęściej używany jest triokso-diazotan sodu (Na₂N₂O₃, CAS 13826-64-7). Cząsteczka ta, nazywana solą Angelięgo, została zsyntetyzowana po raz pierwszy ponad 100 lat temu przez włoskiego chemika Angelo Angelięgo, który zaproponował wykorzystanie jej jako donora HNO. Przez wiele następných lat fizjologiczne właściwości nitroksylu nie były znane, jednakże obecnie dostępne dane na temat farmakologicznych efektów nitroksylu pochodzą z badań prowadzonych głównie z wykorzystaniem soli Angelięgo jako źródła HNO/NO⁻. Generowanie nitroksylu przez ten związek jest zależne od pH środowiska (Tab. 2). Podczas dekompozycji soli Angelięgo ma miejsce najpierw protonacja dianionu, a następnie tautomeryzacja i heterolityczne przecięcie wiązania między atomami azotu: N–N [24, 50–56].

Tabela 2. Związki będące donorami nitroksylu (HNO/NO⁻)
Table 2. Nitroxyl (HNO/NO⁻) donors

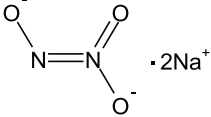
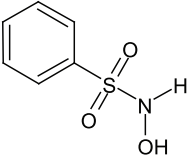
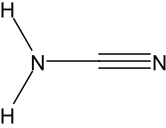
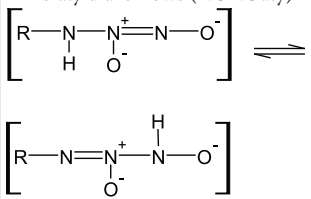
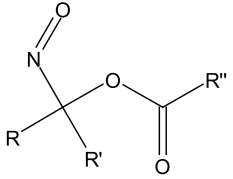
Donory HNO	Schemat reakcji powstawania HNO	Warunki generowania nitroksylu
Sól Angelięgo, Na ₂ N ₂ O ₃ 	$N_2O_3^{2-} + H^+ \rightarrow HNO + NO_2^-$	– pH 4–8 – w pH > 8 sól jest stabilna – w pH < 4 generowany jest NO
Kwas Pilotyęgo, (C ₆ H ₅)S(O ₂)NHOH 	$R-S(O)_2NHOH + HO^- \rightarrow R-S(O)O^- + HNO + H_2O$	– pH wyższe niż fizjologiczne – stabilny przy niskim pH – w fizjologicznym pH jest donorem głównie NO•
Cyjanamid, NH ₂ CN 	$NH_2CN \rightarrow (HONHCN) \rightarrow HNO + CN^- + H^+$	– pH fizjologiczne

Tabela 2. Związki będące donorami nitroksylu (HNO/NO⁻)Table 2. Nitroxyl (HNO/NO⁻) donors

Donory HNO	Schemat reakcji powstawania HNO	Warunki generowania nitroksylu
Diolaty diazoniowe (NONOaty) 	$[RNH-N(O)=NO]^- \rightarrow$ $[RH=N(O)-NHO]^- \rightarrow$ $HNO + RNNO^-$	– diolaty oparte na aminach I-rzędowych: <u>pH fizjologiczne</u> – diolaty z izopropylaminą (IPA/NO): <u>pH 5–13</u> (w niższym pH generują NO [•])
Związki nitrozowe z grupą acyloksy 	$NOCRR'OCOR'' \rightarrow$ $HNO + RCOR' + R''COOH$	– <u>pH fizjologiczne</u>

Dobrze scharakteryzowanym donorem HNO jest kwas benzenosulfohydroksamowy (kwas Piloty'ego, (C₆H₆)S(O₂)NHOH, CAS 599-71-3). W przeciwieństwie do soli Angeli'ego kwas ten jest stabilny przy niskich wartościach pH, a powstawanie z niego nitroksylu ma miejsce w warunkach zasadowych, w związku z czym raczej nie wykorzystuje się go w badaniach biologicznych. Dekompozycja kwasu Piloty'ego polega na deprotonacji a następnie heterolitycznym przecięciu wiązania między atomem siarki i azotu: S–N. W warunkach fizjologicznych kwas Piloty'ego ulega łatwo jednoelektronowemu procesowi utleniania, co sprawia, że zamiast nitroksylu powstaje tlenek azotu, NO[•].

Do generujących nitroksyl związków mających znaczenie farmakologiczne należy natomiast cyjanamid stosowany w leczeniu choroby alkoholowej (H₂NCN, CAS 420-04-2). Po zastosowaniu znakowanego ¹³C-cyjanamidu stwierdzono, że produktem jego bioaktywacji jest cyjanid (HCN), bowiem przy udziale katalazy ulega utlenieniu do niestabilnego *N*-hydroksycyjanamidu, który spontanicznie rozkłada się do HCN i HNO (Tab. 2) [57]. Zastosowanie cyjanamidu w leczeniu choroby alkoholowej związane jest ze zdolnością HNO do hamowania aktywności dehydrogenazy aldehydowej (ALDH), enzymu biorącego udział w metabolizmie etanolu. Podejmowano próby zsyntetyzowania stabilnej cząsteczki *N*-hydroksycyjanamidu (zwanej także *N*-cyjanohydroksyaminą), co pozwoliłoby na ominięcie koniecznej bioaktywacji cyjanamidu przez katalazę. Jedną z prób stabilizacji cząsteczki *N*-hydroksycyjanamidu była *N,O*-bis-acylacja, która doprowadziła do syntezy *N,O*-dibenzoil-*N*-hydroksycyjanamidu (DBHC) z bromku cyjanogenu i *N,O*-dibenzoilhydroksylaminy (DBHA). W obecności esterazy DBHA jest przekształcany poprzez niestabilne związki pośrednie do HNO i kwasu benzoesowego. Ponieważ dehydro-

genaza aldehydowa posiada aktywność esterazy mogłaby ona sama katalizować wyzwalenie HNO z DBHA. Niekorzystną cechą z punktu widzenia klinicznego zastosowania DBHC jest jednak powstawanie oprócz nitroksylu cyjanidu. Próby zsyntetyzowania *N*-podstawionych pochodnych hydroksylaminy grupami innymi niż cyjanid, mogłyby doprowadzić do uzyskania donorów HNO/NO⁻, które miałyby szansę szerszego zastosowania w praktyce klinicznej.

Do innych związków, które generują nitroksyl w warunkach fizjologicznych należą α -acyloksy-C-nitrozo związki, syntetyzowane w laboratorium prof. Kinga [58]. α -Acyloksy-C-nitrozo związki powstają w reakcji utleniania oksymów w obecności kwasów karboksylowych. Hydroliza tych donorów HNO prowadzi do powstania nietrwałego produktu pośredniego a następnie uwalniania nitroksylu i odpowiedniego ketonu (Tab. 2). Szybkość uwalniania HNO zależy od pH i struktury grupy acylowej acyloksynitrozo związku, co może być ważną właściwością mającą wpływ na możliwości farmakologicznego zastosowania tych cząsteczek.

Dużą grupą związków generujących HNO/NO⁻ są diazeniodiole o ogólnej budowie X[N(O)NO]⁻, w której X jest grupą silnie nukleofilową taką jak grupa aminylowa (R₁R₂N) lub oksylowa (O⁻) [59]. Są to związki o biologicznej aktywności podobnej do tej jaką wykazuje sól Angelięgo, jest ona bowiem diazeniodiolem z atomem tlenu wymienionym na inną grupę pełniącą funkcję aminy. Początkowo związki te znane były jako generujące tlenek azotu (NO[•]) – były to diazeniodiole zsyntetyzowane w reakcji drugorzędowych amin z tlenkiem azotu. Z kolei diazeniodiole zsyntetyzowane z pierwszorzędowych amin mogą być wykorzystywane do generowania nitroksylu. Diazeniodiol powstały z izopropylowej aminy, zwany IPA-NO, jest donorem nitroksylu w zakresie pH 5–13 [60, 61] i wykazuje aktywność biologiczną podobną do soli Angelięgo. Podobnie jak sól Angelięgo, IPA-NO przy niskim pH wyzwala tlenek azotu – NO[•].

4. DETEKCJA NITROKSYLU

Właściwości chemiczne nitroksylu, m.in. uleganie szybkiej dimeryzacji, wpływają na trudności w detekcji tej cząsteczki w układach biologicznych. Do tej pory nitroksyl był pośrednio wykrywany poprzez detekcję podtlenku azotu N₂O, produktu dimeryzacji HNO. Prowadzone ostatnio badania skupiają się na próbach opracowania metod bezpośredniej detekcji tej cząsteczki.

Jedna z opisanych niedawno metod wykrywania obecności HNO wykorzystuje tiofilowe właściwości HNO. Donzelli i in. [62] wykazali, że w biologicznych warunkach w obecności donorów nitroksylu glutation (GSH) jest przekształcany w sulfinaamid [GS(O)NH₂] i utlenioną formę glutationu (GSSG). Wydaje się, że sulfinaamid jest unikalnym produktem reakcji nitroksylu z tiolami, ponieważ nie obserwowano jego powstawania w obecności innych tlenków azotu takich jak NO, N₂O₃, NO₂, ONOO⁻ [29, 62].

Samuni i in. [63] opisali sposób detekcji nitroksylu metodą spektrometrii EPR z wykorzystaniem nitronylo-nitroksydów (stabilnych rodników nitroksylowych), np. *N*-tlenku 2-(4-karboksyfenylo)-4,4,5,5-tetrametyloimidazolin-1-oksylu (C-PTIO). Autorzy stwierdzili, że związek taki jest łatwo redukowany przez HNO do nitronylo-hydroksylaminy, która zamieniana jest na imino-nitroksyd lub imino-hydroksylaminę. Ilość tej ostatniej wzrasta wraz ze wzrostem ilości soli Angelięgo w stosunku do nitronylo-nitroksylu. Ponieważ reakcja NO^{*} z nitronylo-nitroksydem również prowadzi do powstawania imino nitroksylu, to zastosowanie nitronylo-nitroksylu do rozróżniania obecności NO^{*} i HNO jest możliwe tylko wtedy, gdy NO^{*} jest stosowany w stężeniach dużo niższych niż całkowita produkcja HNO.

W 2009 roku zespół prof. Kinga z Wake Forest University opisał nieznane dotąd właściwości nitroksylu, które mogą stać się podstawą nowej, bezpośredniej metody wykrywania tej cząsteczki [8]. Autorzy eksperymentalnie wykazali, że nitroksyl reaguje z triarylofosforami (fosfinami III-rzędu) dając odpowiedni triarylooksofosfor (tlenek fosfiny) i aza-ylid (R₃P=NH). W obecności związku elektrofilowego, aza-ylid podlega reakcji Staudingera, w wyniku której powstaje stabilna amidowa pochodna HNO z atomem azotu pochodzącym z cząsteczki nitroksylu. Metoda detekcji nitroksylu wykorzystująca reakcje zachodzące pomiędzy HNO a związkami fosforoorganicznymi stanowi nowy sposób wykrywania tej cząsteczki w układach biologicznych.

Rosenthal i Lippard [9] opisali z kolei metodę syntezy, właściwości fotofizyczne i zastosowanie w badaniach biologicznych barwnika BOT1 zsyntetyzowanego przy wykorzystaniu 8-(chlorometyl)-4,4-difluoro-1,3,5,7-tetrametyl-4-bora3a,4a-diaza-s-indacenu (TM-BODIPY-CH₂Cl) oraz *N,N*-bis(2-pirydylometylo)-*N*-propalgilaminę. Barwnik ten w roztworach wodnych może tworzyć kompleksy z jonami miedzi Cu²⁺ (Cu²⁺[BOT1]). Autorzy wykonali badania z użyciem komórek HeLa poddanych działaniu soli Angelięgo w stężeniu 200 μM. Po 10 min inkubacji komórek z badanym związkiem obserwowano w mikroskopie fluorescencyjnym specyficzną dla nitroksylu czerwoną fluorescencję analizowanych komórek. Eksperymenty te wykazały więc, że kompleks Cu²⁺[BOT1] przechodzi przez błony komórkowe i może być stosowany do wykrywania obecności HNO w żywych komórkach. Dodatkowo w warunkach fizjologicznych fluorescencja pojawia się tylko w przypadku obecności HNO a nie NO^{*}, co jest ważne z punktu widzenia dalszych badań nad cząsteczką nitroksylu [9].

5. WŁAŚCIWOŚCI BIOLOGICZNE NITROKSYLU

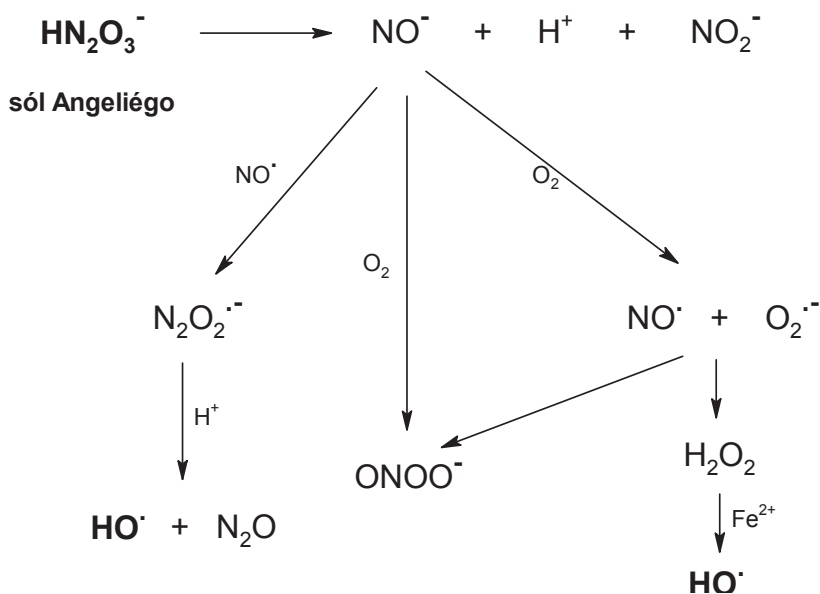
Biologiczne właściwości nitroksylu są słabo poznane. Wykonywanie eksperymentów z wykorzystaniem donorów HNO przysparza bowiem badaczom sporo problemów w związku z jego nietrwałością i trudnościami w detekcji. Badania wymagają zastosowania wielu prób kontrolnych, które dają pewność, że zaobserwowane zmiany pochodzą z działalności nitroksylu. W przypadku najczęściej

używanej w badaniach biologicznych soli Angelięgo (HNO/NO^-) jedną z nich jest kontrola z solą, która uległa dekompozycji, ponieważ błędne wnioski można wyciągnąć w związku z aktywnością NO_2^- powstającym równocześnie z HNO. W eksperymentach biologicznych duże znaczenie ma również wartość pH, od którego zależy generowanie HNO/NO^- przez różne związki. W przypadku soli Angelięgo nitroksyl generowany jest w zakresie pH od 4 do 8, a ponieważ sól jest stabilna w środowisku zasadowym (pH = 12) rozpuszcza się ją w 10 mM NaOH. Rozcieńczając próbkę w celu uzyskania właściwego stężenia stosowanego w danym eksperymencie należy pamiętać o tym, aby użyć świeżego roztworu soli i wykorzystywać go bezpośrednio po przygotowaniu. Wielokrotne zamrażanie i rozmrażanie związku po jego rozpuszczeniu może doprowadzić do jego dekompozycji. Podobnych trudności dostarczają badania na innych donorach nitroksylu.

W badaniach mających na celu ocenę biologicznych właściwości HNO/NO^- analizowano do tej pory przede wszystkim jego cytotoksyczność w doświadczeniach *in vitro*. Jednymi z pierwszych badań były eksperymenty Winka i in. [23], które wykazały, że HNO ma działanie cytotoksyczne, przy czym jego toksyczność jest znacznie wyższa w warunkach tlenowych niż przy niedoborze tlenu. Badania wykonywano na komórkach V79 (fibroblasty płuc chomika chińskiego) z wykorzystaniem testu klonogenego, polegającego na ocenie wpływu HNO/NO^- generowanego przez sól Angelięgo (1–5 mM) na przeżywalność i proliferację komórek oraz zdolność do tworzenia przez nie kolonii. Wraz ze wzrostem stężenia związku obserwowano spadek przeżywalności komórek, a także indukcję złamań podwójnej nici DNA. Zarówno cytotoksyczność, mierzona przeżywalnością komórek, jak i indukcja uszkodzeń DNA była zahamowana w obecności ferrycjanidu i Tempolu (4-hydroksy-2,2,6,6-tetrametylo-piperydino-1-oksylu). Indukowanie podwójnych złamań DNA przez sól Angelięgo było w tamtym czasie dla Autorów badań zaskakujące, ponieważ takie uszkodzenia nie są powodowane ani przez ONOO^- , ani przez H_2O_2 , w związku z czym cząsteczki te nie mogły być odpowiedzialne za obserwowane uszkodzenia DNA [23].

Cytotoksyczność HNO badano także w teście dehydrogenazy mleczanowej (test LDH) przeprowadzonym z wykorzystaniem ludzkich komórek raka piersi MCF-7 [64]. Komórki poddawano działaniu soli Angelięgo (5 mM) przez 4,5 godziny. Dehydrogenaza mleczanowa (LDH) jest cytozolowym enzymem, który w warunkach fizjologicznych nie jest uwalniany do środowiska. Mechaniczne uszkodzenie błony plazmatycznej oraz śmierć komórki spowodowana działaniem czynników szkodliwych powoduje uwolnienie LDH z komórek do środowiska zewnętrznego. Test LDH opiera się na reakcjach enzymatycznych, w wyniku których powstaje barwny produkt, oznaczany za pomocą spektrofotometru, a oznaczenie aktywności LDH w supernatancie jest miarą toksyczności badanej substancji względem hodowanych komórek. Autorzy badań stwierdzili, że ponad czterogodzinna inkubacja komórek z solą Angelięgo nie powoduje silnego efektu cytotoksycznego ale wzrasta on, gdy komórki analizowane są po 8 godzinach od początku inkubacji – może to

być związane z wchodzeniem komórek na drogę programowanej śmierci komórkowej (apoptozy). Efekt cytotoksyczny soli Angelięgo był natomiast silny w obecności H₂O₂ i jonów metali przejściowych już po inkubacji 4,5 godzinnej. Obserwowano wówczas powstawanie pęknięć pojedynczej nici DNA (DNA plazmidu pBR322) oraz wzrost poziomu 8-oxo-2'-deoxyguanozyny (8-oxo-dG) w DNA z grasicy cięcej [64]. Indukcja przez nitroksyl jednoniciowych pęknięć w DNA oraz oksydacji zasad purynowych związana jest prawdopodobnie z powstawaniem rodników hydroksylowych i innych potencjalnych oksydantów. Wiązanie pomiędzy atomami azotu i wodoru jest w tej cząsteczce stosunkowo słabe (50 kcal/mol), co sprawia, że nitroksyl jest dobrym donorem atomu wodoru podczas reakcji z innymi cząsteczkami. Reakcja jonu NO⁻ z tlenem prowadzi do wytworzenia nadtlenoazotynu lub tlenku azotu, a ten ostatni może być źródłem nadtlenku wodoru i rodnika hydroksylowego (Rys. 3). O tym, czy powstanie nadtlenoazotyn czy tlenek azotu decyduje stan spinowy cząsteczki nitroksylu (cząsteczka tripletowa ³NO⁻ daje nadtlenoazotyn, natomiast singletowy ¹HNO – inne pochodne). NO⁻ szybko wchodzi w reakcję z tlenkiem azotu NO[•] tworząc NO₂⁻ i NO₃⁻. W warunkach *in vivo* stężenie NO⁻ nie jest wystarczająco wysokie, aby mogło dojść do utworzenia NO₃⁻, może za to powstawać NO₂⁻. Ta ostatnia cząstka może być źródłem tlenku azotu N₂O i groźnego oksydanta – rodnika hydroksylowego HO[•] [65].



Rysunek 3. Reakcje prowadzące do powstania rodnika hydroksylowego (wg Ohshima i in., [65])
 Figure 3. Generation of hydroxyl radical (according to Ohshima et al., [65])

Uszkodzenia DNA spowodowane działaniem nitroksylu analizowano również w tymocytach myszy [66]. Badano cytotoksyczny efekt takich uszkodzeń stosując metodę cytometrii przepływowej umożliwiającej, dzięki różnicom w intensywności fluorescencji, ilościowe rozróżnienie żywych komórek nieapoptotycznych, komórek apoptotycznych i komórek nekrotycznych. Badania prowadzono z zastosowaniem polimerazy poli(ADP-rybozy) (PARP) biorącej udział w naprawie DNA oraz jej inhibitorów w celu sprawdzenia czy aktywność enzymu ma wpływ na rodzaj śmierci komórkowej powodowanej przez HNO (apoptozy bądź nekrozy). Komórki inkubowano z solą Angelięgo przez 3 godziny (0,1–0,25 mM). Stężenia soli Angelięgo 0,15 mM, 0,2 mM oraz 0,25 mM były silnie toksyczne dla badanych komórek – cytotoksyczność wynosiła aż 70–90%. [66]. Autorzy stwierdzili, że nitroksyl może w obecności aktywnego enzymu PARP powodować zarówno nekrotyczną śmierć komórkową jak i śmierć apoptotyczną (stosunek liczby komórek nekrotycznych do apoptotycznych wyniósł 2,5 : 1). Obserwowano aktywację kaspaz (kluczowych enzymów apoptozy) oraz indukcję apoptotycznej fragmentacji DNA. Zastosowanie inhibitorów enzymu PARP powodowało wchodzenie większej liczby komórek na drogę apoptozy (stosunek liczby komórek nekrotycznych do apoptotycznych wyniósł 1:1), obserwowano także większą liczbę komórek żywych. Całkowite zahamowanie aktywności PARP nie chroniło jednak całkowicie komórek przed cytotoksycznym działaniem nitroksylu, co świadczy o tym, że główne mechanizmy cytotoksycznego działania HNO/NO⁻ nie są zależne od aktywności tego enzymu [66].

Cytotoksyczność nitroksylu jest uzależniona od pH środowiska [67, 68]. W fibroblastach człowieka i komórkach neuroblastomy (SK-N-SH) analizowano cytotoksyczne efekty nitroksylu, generowanego przez sól Angelięgo w pH = 6,2 i w pH = 7,4. Po 30-minutowej inkubacji komórek z solą Angelięgo i 4-godzinnej postinkubacji w podłożu hodowlanym nie zawierającym tego związku efekt cytotoksyczny obserwowano dla komórek traktowanych związkiem przy pH = 6,2. Stosując pH = 7,4 efekt cytotoksyczny obserwowano dopiero po dalszej wielogodzinnej inkubacji, co prawdopodobnie związane było wchodzeniem komórek na drogę apoptozy [67–70]. Ta różnica w cytotoksyczności jest według Autorów spowodowana zwiększonym generowaniem rodnika hydroksylowego w bardziej kwaśnym środowisku. Fakt ten ma potencjalnie duże znaczenie terapeutyczne w leczeniu chorób nowotworowych, ponieważ komórki guzów intensywnie metabolizują glukozę do kwasu mlekowego, co wraz z hydrolizą ATP w warunkach hipoksji prowadzi do zakwaszenia mikrośrodowiska komórek rakowych [71].

Poza właściwościami cytotoksycznymi badania wskazują także na mutagenne działanie nitroksylu [72], co zaobserwowano w doświadczeniach wykorzystujących dwa szczepy drożdży: RS112 (szczep diploidalny) oraz Y433 (szczep haploidalny) i zastosowaniu metody pozwalającej ocenić częstotliwość rewersji zaburzonego genu *his3* na drodze homologicznej intrachromosomalnej rekombinacji (DEL assay) [73] oraz metody analizy oporności szczepu na toksyczne działanie kanawaniny, analogu argininy (CAN assay) [74]. Nitroksyl generowany przez sól Angelięgo (0,8 mM,

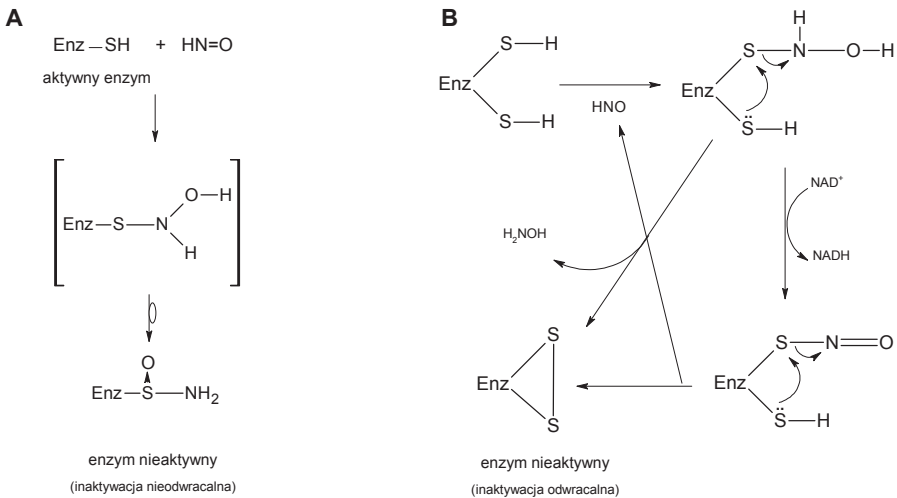
3 godz. traktowanie) powodował delecje DNA i rekombinacje, co według Autorów badań związane było z pęknięciami nici DNA a nie z uszkodzeniami pojedynczych zasad (nie obserwowano indukcji mutacji punktowych).

Badania nad właściwościami nitroksylu wskazują także, że może on pełnić funkcję antyoksydacyjną. Cząsteczka HNO/NO⁻ jest zdolna do hamowania peroksydacji lipidów, co doświadczalnie zostało potwierdzone z wykorzystaniem modelu badawczego *Saccharomyces cerevisiae* przez Lopez i in. [75]. Właściwości antyoksydacyjne nitroksylu wynikają z tego, że może on funkcjonować jako jednoelektronowy reduktor i źródło NO[•] wykazującego właściwości przeciwutleniające w środowisku lipidowym. Stężenie nitroksylu i charakter środowiska decydują o zachowaniu HNO i jego działaniu pro- lub antyoksydacyjnym. Wyniki Lopez i in. [75] wskazują jednakże, iż nitroksyl może również sam, niezależnie od powstawania tlenu azotu wykazywać działanie antyoksydacyjne. Autorzy badań porównali antyoksydacyjne efekty soli Angelięgo i DEANO (kompleks dietylaminy i tlenu azotu wykorzystywany do kontrolowanego wyzwalaania tlenu azotu w roztworach – wyzwala 2 cząsteczki NO[•] w podobnym tempie jak sól Angelięgo wyzwala HNO). W przypadku DEANO obserwowano efekty antyoksydacyjne, jednakże były one bardzo zmienne przy niskich stężeniach NO[•], natomiast w stężeniach wysokich obserwowano efekt prooksydacyjny. Z drugiej strony wyniki uzyskane dla HNO/NO⁻ pochodzącego z soli Angelięgo były zawsze stałe i wskazywały na efekty antyoksydacyjne tej cząsteczki. W obecności glutationu, związku tiolowego będącego „zmiataczem” HNO, antyoksydacyjne efekty tego związku były mniejsze. Badania Lopez i in. [75] wskazują więc, że antyoksydacyjne właściwości nitroksylu nie są spowodowane konwersją HNO do NO[•].

6. ZNACZENIE FARMAKOLOGICZNE NITROKSYLU

Pierwsze doniesienia o wykorzystaniu klinicznym cząsteczki HNO dotyczą zastosowania jednego z jej donorów – cyjanamidu jako środka w terapii osób uzależnionych od alkoholu [57]. Lek ten do tej pory używany jest w Europie, Kanadzie (pod nazwami handlowymi Dipsan[®], Apstem[®] i Temposil[®]) oraz w Japonii (Cyanamide Yoshitomi[®]). Cyjanamid po podaniu doustnym szybko przenika bariery układu pokarmowego i zaczyna działać poprzez hamowanie aktywności mitochondrialnego enzymu – dehydrogenazy aldehydowej (ALDH; EC 1.2.1.3.). Enzym ten odpowiada za katalizowanie reakcji utleniania aldehydów powstałych w organizmie po spożyciu alkoholu. Wywołuje reakcję pomiędzy karbimidem a alkoholem, która naśladuje lepiej poznaną reakcję alkoholu z disulfiraniem, lekiem stosowanym wcześniej w terapii awersyjnej alkoholizmu (Anticol[®], Esperal[®], Antabus[®]). Spożycie alkoholu po zażyciu cyjanamidu wywołuje nieprzyjemne skutki będące wynikiem zatrucia przez kumulujący się w organizmie aldehyd octowy (nieaktywna dehydrogenaza aldehydowa nie przekształca go w kwas octowy). W ten sposób cyjanamid poprzez skutki jego zażycia zniechęca do dalszego spożywania alkoholu. Zdolność

do hamowania aktywności dehydrogenazy aldehydowej stwierdzono w eksperymentach z wykorzystaniem drożdżowego enzymu ALDH i soli Angeli'ego jako donoru HNO/NO^- . Hamowanie aktywności dehydrogenazy zależy od czasu traktowania oraz stężenia związku. Stężenie, przy którym następuje zahamowanie połowy aktywności enzymu (IC_{50}) wynosi poniżej $2 \mu\text{M}$ [76]. Dehydrogenaza występująca w komórkach drożdży, jak i ta z komórek ssaków, zawierają w swoim centrum aktywnym grupy sulfhydrylowe a cysteina z tych grup jest celem dla cząsteczki nitroksylu. Oksydacja tych grup tiolowych skutkuje powstaniem wiązań disiarczkowych wewnątrz podjednostki enzymu i zahamowaniem aktywności. Reakcja nitroksylu z centrum aktywnym enzymu prowadzi do powstania jego dwóch nieaktywnych form. Przy wartości $\text{pH} = 7$ i niższej powstaje forma z nieodwracalnie zahamowaną zdolnością katalityczną (Rys. 4A). W $\text{pH} = 8,5$ oraz wyższym tworzona jest forma enzymu z możliwością przywrócenia jej działalności enzymatycznej (Rys. 4B).



Rysunek 4. Mechanizmy nieodwracalnej (A) i odwracalnej (B) inaktywacji ALDH przez nitroksyl (według DeMaster i in., [76])

Figure 4. Mechanisms of the irreversible and reversible inactivation of ALDH by nitroxy (according to DeMaster et al., [76])

Podobny mechanizm ma miejsce w przypadku nieodwracalnego zahamowania aktywności glikolitycznej enzymu dehydrogenazy 3-fosfoglicerolowej (GAPDH, EC 1.2.1.12). Dzięki tej własności nitroksyl może stać się ważnym narzędziem w walce z chorobami nowotworowymi. Brak aktywności GAPDH ogranicza zachodzenie niezbędnego dla komórek nowotworowych procesu glikolizy [75]. GAPDH posiada w swym centrum aktywnym grupy tiolowe z cysteiną, które atakowane są przez cząsteczki nitroksylu. Zmiana konformacyjna prowadzi do zahamowania aktywności enzymatycznej dehydrogenazy. Dodatkowo, eksperymenty wskazały na wybiórczość działania nitroksylu - HNO wchodził w reakcję z enzymem, pomimo wysokiego stężenia glutationu (GSH) w komórkach [15]. Aktywność antykarcyngenowa

nitroksylu związana jest również z hamowaniem angiogenezy i proliferacji komórek nowotworowych, co zaobserwowano w badaniach na komórkach raka piersi i neuroblastomy [68, 77]. Stwierdzono również, że traktowanie komórek raka piersi solą Angelięgo powoduje zahamowanie aktywności polimerazy PARP. Enzym ten jest ważnym składnikiem systemu naprawy uszkodzeń komórkowych (odpowiada za odwracalne post-translacyjne modyfikacje białek u Eucaryota). Wykorzystanie w praktyce zdolności HNO do hamowania aktywności PARP może skutecznie wspomóc terapie antykancerogenne oparte na wywoływaniu uszkodzeń w DNA komórek nowotworowych [24].

Jednym z najważniejszych i stosunkowo niedawno stwierdzonych fizjologicznych efektów działania nitroksylu (HNO/NO⁻) jest jego wpływ na relaksację naczyń krwionośnych (Tab. 1). Nie jest dokładnie znany mechanizm tego działania, ale przypuszcza się, że może odbywać się to w dwojaki sposób [10, 78]. Po pierwsze, może to być rezultatem konwersji nitroksylu do tlenku azotu NO^{*}, posiadającego zdolność do aktywacji (400-krotny wzrost aktywności) rozpuszczalnej cyklazy guanylowej (rCG), która katalizuje przekształcenie GTP (guanozynomonofosforan) w GMP (cykliczny guanozynomonofosforan). cGMP aktywuje mechanizmy prowadzące do rozszerzenia naczyń krwionośnych. Zdolność do aktywowania rCG przez tlenek azotu została stwierdzona przez Diekrsa i Burstyna w 1996 roku [79]. Przeprowadzone w 2009 roku badania Zeller i in. [80] również potwierdziły fakt aktywacji rCG przez nitroksyl generowany z soli Angelięgo. Naukowcy udowodnili, że podstawą tego zjawiska jest przekształcenie cząsteczki nitroksylu w tlenek azotu NO^{*}. Aktywacja enzymu przy udziale samego donora HNO była niewielka, ale gwałtownie rosła po dodaniu dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), przy udziale której następowało przekształcanie HNO w NO^{*}, można więc było wnioskować, że osiągnięta aktywacja rCG jest efektem działania tlenku azotu [80].

Wpływ nitroksylu na układ sercowo-naczyniowy może być także skutkiem jego bezpośredniej aktywności. Cząsteczka HNO ma zdolność do uwalniania peptydu związanego z genem kalcytoniny (CGRP) z neuronów NANC (nieadrenergiczne, niecholinergiczne neurony uwalniające ze swoich zakończeń NO^{*}) [14]. Białko CGRP, poprzez przyłączenie się do receptora CRLR (receptor o budowie zbliżonej do receptora dla kalcytoniny), prowadzi do aktywacji cyklazy adenylowej, wskutek czego dochodzi do podwyższenia poziomu komórkowego cAMP (cyklicznego adenozyneomonofosforanu). Ten wzrost stężenia cAMP powoduje aktywację kinazy proteinowej A (PKA), która odpowiada za fosforylację białek kanałów wapniowych, czego rezultatem jest rozszerzenie naczyń krwionośnych [30, 81]. Bezpośrednią aktywność HNO w odniesieniu do układu sercowo-naczyniowego obserwowano w eksperymentach na psach, które pokazały, że zastosowanie donorów nitroksylu zwiększa siłę mięśnia sercowego (działanie inotropowe) i poprawia jego funkcję rozkurczową (działanie lusitropowe) [14]. Możliwość zastosowania donorów nitroksylu jako leków stosowanych w niewydolności układu sercowo-naczyniowego sprawa, że badań nad nowymi cząsteczkami generującymi HNO/NO⁻ podejmuje się

coraz więcej zespołów naukowych. Przykładem nowej intensywnie badanej obecnie cząsteczki jest octan 1-nitrozocykloheksylu, który generuje nitroksyl w zakresie pH 4-8 i wykazuje działanie inotropowe [82]. Innym związkiem będącym już na etapie badań klinicznych jest w tej chwili cząsteczka o nieujawnionej jeszcze strukturze – CXL-1020, która w przyszłości ma być stosowana jako lek przy niewydolności serca [83].

Oprócz oddziaływania na naczynia krwionośne i pracę mięśnia sercowego nitroksyl ma także wpływ na agregację płytek krwi [84]. Bermejo i in. [84] stwierdzili, że HNO efektywnie działa jako inhibitor agregacji płytek krwi człowieka w sposób zależny od czasu i stężenia. Obserwowano bowiem po zastosowaniu soli Angelięgo spadek poziomu epitopów glikoprotein aktywujących płytki krwi (CD62P, CD63, PAC-1) oraz znaczące zwiększenie stężenia cGMP.

PODSUMOWANIE

Omówione w niniejszej pracy właściwości HNO/NO⁻ wskazują, że wiele cech tej cząsteczki i aktywność biologiczna są różne od tych, które wykazuje tlenek azotu NO[•] (Tab. 1). Mimo tego, że w tej chwili szlaki sygnałowe nitroksylu nie są jeszcze dokładnie poznane, wiadomo jednak, że wpływa on na różne procesy fizjologiczne, takie jak: metabolizm alkoholu, relaksacja naczyń, kurczliwość mięśnia sercowego i zahamowanie glikolizy. Wszystko to sprawia, że możliwe jest jego zastosowanie w leczeniu alkoholizmu, chorób serca oraz nowotworów. Badania, które są obecnie prowadzone dążą więc do szczegółowego poznania właściwości nitroksylu i jego aktywności w układach biologicznych, a także opracowania prostej, bezpośredniej metody wykrywania obecności tej cząsteczki w komórkach. Możliwość zastosowania nitroksylu w diagnostyce klinicznej wymusza w tej chwili także poszukiwanie nowych, bardziej stabilnych niż najczęściej stosowana w badaniach eksperymentalnych sól Angelięgo, związków generujących HNO/NO⁻ w warunkach fizjologicznych.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] R.F. Furchgott, J.V. Zawadzki, *Nature*, 1980, **288**, 373.
- [2] R.F. Furchgott, *Biosci. Rep.*, 1999, **19**, 235.
- [3] L.J. Ignarro, G.M. Buga, R.E. Byrns, K.S. Wood, G. Chaudhuri, *Circulation*, 1987, **76**, 51.
- [4] J.M. Fukuto, M.D. Bartberger, A.S. Dutton, N. Paolucci, D.A. Wink, K.N. Houk, *Chem. Res. Toxicol.*, 2005, **18**, 790.
- [5] J.M. Fukuto, A.S. Dutton, K.N. Houk, *Chembiochem*, 2005, **6**, 612.
- [6] K.M. Rusche, M.M. Spiering, M.A. Marletta, *Biochemistry*, 1998, **37**, 15503.
- [7] J.M. Fukuto, M.I. Jackson, N. Kaludercic, N. Paolucci, *Methods Enzymol.*, 2003, **140**, 411.
- [8] J.A. Reisz, E.B. Klorig, M.W. Wright, S.B. King, *Organic Lett.*, 2009, **11**, 2719.
- [9] J. Rosenthal, S.J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, **132**, 5536.
- [10] J.M. Fukuto, K. Chiang, R. Hsieh, P. Wong, G. Chaudhuri, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1992, **263**, 546.

- [11] J.M. Fukuto, C.H. Switzer, K.M. Miranda, D.A. Wink, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 2005, **45**, 335.
- [12] T.W. Miller, M.M. Cherney, A.J. Lee, N.E. Francoleon, P.J. Farmer, S.B. King, A.J. Hobbs, K.M. Miranda, J.N. Burstyn, J.M. Fukuto, *J. Biol. Chem.*, 2009, **284**, 21788.
- [13] J.A. Reisz, E. Bechtold, S.B. King, *Dalton Trans.*, 2010, **39**, 5203.
- [14] N. Paolucci, W.F. Saavedra, K.M. Miranda, C. Martignani, T. Isoda, J.M. Hare, M.G. Espey, J.M. Fukuto, M. Feelisch, D.A. Wink, D.A. Kass, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 2001, **98**, 10463.
- [15] B.E. Lopez, C.E. Rodriguez, M. Pribadi, N.M. Cook, M. Shinyashiki, J.M. Fukuto, *Arch. Biochem. Biophys.*, 2005, **442**, 140.
- [16] L.J. Ignarro, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 2002, **99**, 7816..
- [17] L.J. Ignarro, *J. Physiol. Pharm.*, 2002, **53**, 503.
- [18] J.B. Mannick, C.M. Schonhoff, *Free Rad. Res.*, 2004, **38**, 1.
- [19] H.T. Chung, H.O. Pae, B.M. Choi, T.R. Billiar, Y.M. Kim, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 2001, **282**, 1075.
- [20] G.A. Blaise, D. Gauvin, M. Gangal, S. Authier, *Toxicology*, 2005, **208**, 177.
- [21] D.E. Koshland, *Science*, 1992, **258**, 1861.
- [22] M.L. Bullen, A.A. Miller, K.L. Andrews, J.C. Irvine, R.H. Ritchie, C.G. Sobey, B.K. Kemp-Harper, *Antioxid. Redox Signal*, 2010, doi:10.1089/ars.2010.3327.
- [23] D.A. Wink, M. Feelisch, J. Fukuto, D. Chistodoulou, D. Jourd'heuil, M.B. Grisham, Y. Vodovotz, J.A. Cook, M. Krishna, W.G. DeGraff, S. Kim, J. Gamson, J.B. Mitchell, *Arch. Biochem. Biophys.*, 1998, **351**, 66.
- [24] D.A. Wink, K.M. Miranda, T. Katori, D. Mancardi, D.D. Thomas, L. Ridnour, M.G. Espey, M. Feelisch, C.A. Colton, J.M. Fukuto, P. Pagliaro, D.A. Kass, N. Paolucci, *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.*, 2003, **285**, H2264.
- [25] V. Shafirovich, S.V. Lyamar, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 2002, **99**, 7340.
- [26] M. Gratzel, Taniguchi, S. A. Henglein, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.*, 1970, **74**, 1003.
- [27] M.D. Bartberger, W. Liu, E. Ford, K.M. Miranda, C. Switzer, J.M. Fukuto, P.J. Farmer, D.A. Wink, K.N. Houk, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 2002, **99**, 10958..
- [28] J.M. Fukuto, M.I. Jackson, N. Kaludercic, N. Paolucci, *Methods Enzymol.*, 2008, **440**, 411.
- [29] P.S.Y. Wong, J. Hyun, J.M. Fukuto, F.N. Shirota, E.G. DeMaster, D.W. Shoeman, H.T. Nagasawa, *Biochemistry*, 1998, **37**, 18129.
- [30] J.M. Fukuto, C.L. Bianco, T.A. Chavez, *Free Rad. Biol. Med.*, 2009, **47**, 1318.
- [31] N. Paolucci, M.I. Jackson, B.E. Lopez, K. Miranda, C.G. Tocchetti, D.A. Wink, A.J. Hobbs, J.M. Fukuto, *Pharmacol. Therap.*, 2007, **113**, 442.
- [32] P.J. Farmer, F. Sulc, *J. Inorg. Biochem.*, 2005, **99**, 166.
- [33] K.M. Miranda, K. Yamada, M.G. Espey, D.D. Thomas, W. DeGraff, J.B. Mitchell, M.C. Krishna, C.A. Colton, D.A. Wink, *Arch. Biochem. Biophys.*, 2002, **401**, 134.
- [34] C.E. Donald, M.N. Hughes, J.M. Thompson, F.T. Bonner, *Inorg. Chem.*, 1986, **25**, 2676.
- [35] T. Ishiwata, H. Akimoto, I. Tanaka, *Chem. Phys. Lett.*, 1974, **27**, 260.
- [36] K.M. Miranda, M.G. Espey, K. Yamada, M. Krishna, N. Ludwick, S. Kim, D. Jourd'heuil, M.B. Grisham, M. Feelisch, J.M. Fukuto, D.A. Wink, *J. Biol. Chem.*, 2001, **276**, 1720.
- [37] P. Pacher, J.S. Beckman, L. Liaudet, *Physiol. Rev.*, 2007, **87**, 315.
- [38] D.A. Stoyanovsky, Y.Y. Tyurina, V.A. Tyurin, D. Anand, D.N. Mandavia, D. Gius, J. Ivanova, B. Pitt, T.R. Billiar, V.E. Kagan, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 15815.
- [39] J. Yoo, J.M. Fukuto, *Biochem. Pharmacol.*, 1995, **50**, 1995.
- [40] J.Y. Cho, A. Dutton, T. Miller, K.N. Houk, J.M. Fukuto, *Arch. Biochem. Biophys.*, 2003, **417**, 65.
- [41] J.C. Irvine, R.H. Ritchie, J.L. Favaloro, K.L. Andrews, R.E. Widdop, *Trends Pharmacol. Sci.*, 2008, **29**, 601.

- [42] S. Adak, Q. Wang, D.J. Stuehr, *J. Biol. Chem.*, 2000, **275**, 33554.
- [43] C.H. Switzer, W. Flores-Santana, D. Mancardi, S. Donzelli, D. Basudhar, L.A. Ridnour, K.M. Miranda, J.M. Fukuto, N. Paolocci, D.A. Wink, *Biochim. Biophys. Acta*, 2009, **1787**, 835.
- [44] R.B. Clarkson, S.W. Norby, A. Smirnov, S. Boyer, N. Vahidi, R.W. Nims, D.A. Wink, *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, **1243**, 496.
- [45] X.J. Zhao, V. Sampath, W.S. Caughey, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1995, **212**, 1054.
- [46] J.J. Poderoso, C. Lisdero, F. Schopfer, N. Riobo, M.C. Carreras, E. Cadenas, A. Boveris, *J. Biol. Chem.*, 1999, **274**, 37709.
- [47] M.A. Sharpe, C.E. Cooper, *Biochem. J.*, 1998, **332**, 9.
- [48] V. Niketic, S. Stojanovic, A. Nikolic, M. Spasic, A.M. Michelson, *Free Rad. Biol. Med.*, 1999, **27**, 992.
- [49] M. Saleem, H. Ohshima, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 2004, **315**, 455.
- [50] C.M. Maragos, D. Morley, D.A. Wink, T.M. Dunams, J.E. Saavedra, A. Hoffman, A.A. Bove, L. Isaac, J.A. Hrabie, L.K. Keefer, *J. Med. Chem.*, 1991, **34**, 3242.
- [51] N. Paolocci, T. Katori, H.C. Champion, M.E. St John, K.M. Miranda, J.M. Fukuto, D.A. Wink, D.A. Kass, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 2003, **100**, 5537.
- [52] M. Feelisch, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 2003, **100**, 4978.
- [53] V.G. Lee, M.L. Johnson, J. Baust, V.E. Laubach, S.C. Watkins, T.R. Billiar, *Shock*, 2001, **16**, 355.
- [54] M.R. Siegfried, J. Erhardt, T. Rider, X.L. Ma, A.M. Lefer, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1992, **260**, 668.
- [55] R.B. Mason, R.M. Pluta, S. Walbridge, D.A. Wink, E.H. Oldfield, R.J. Boock, *J. Neurosurg.*, 2000, **93**, 99.
- [56] P. Kubes, M. Suzuki, D.N. Granger, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1991, **88**, 4651.
- [57] E.G. DeMaster, E. Kaplan, F.N. Shirota, H.T. Nagasawa, *Biochem. Biophys. Research Comm.*, 1982, **107**, 1333.
- [58] X. Sha, T.S. Isbell, R.P. Patel, C.S. Day, S.B. King, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 9687.
- [59] J.A. Hrabie, L.K. Keefer, *Chem. Rev.*, 2002, **102**, 1135.
- [60] K.M. Miranda, H.T. Nagasawa, J.P. Toscano, *Curr. Top. Med. Chem.*, 2005, **5**, 649.
- [61] A.S. Dutton, C.P. Suhrada, K.M. Miranda, D.A. Wink, J.M. Fukuto, K.N. Houk, *Inorg. Chem.*, 2006, **45**, 2448.
- [62] S. Donzelli, M.G. Espey, D.D. Thomas, D. Mancardi, C.G. Tocchetti, L.A. Ridnour, N. Paolocci, S.B. King, K.M. Miranda, G. Lazzarino, J.M. Fukuto, D.A. Wink, *Free Rad. Biol. Med.*, 2006, **40**, 1056.
- [63] U. Samuni, Y. Samuni, S. Goldstein, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, **132**, 8428.
- [64] L. Chazotte-Aubert, S. Oikawa, I. Gilibert, F. Bianchini, S. Kawanishi, H. Ohshima, *J. Biol. Chem.*, 1999, **274**, 20909.
- [65] H. Ohshima, I. Gilibert, F. Bianchini, *Free Rad. Biol. Med.*, 1999, **26**, 1305.
- [66] P. Bai, E. Bakondi, E. Szabo, P. Gergely, C. Szabo, L. Virag, *Free Rad. Biol. Med.*, 2001, **31**, 1616.
- [67] J. Ivanova, G. Salama, R.M. Clancy, N.F. Schor, K.D. Nylander, D.A. Stoyanovsky, *J. Biol. Chem.*, 2003, **278**, 42761.
- [68] D.A. Stoyanovsky, N.F. Schor, K.D. Nylander, G. Salama, *J. Med. Chem.*, 2004, **47**, 210.
- [69] G.B. Pierce, R.E. Parchment, A.L. Lewellyn, *Differentiation*, 1991, **46**, 181.
- [70] D.M. Hockenbery, Z.N. Oltvai, X.M. Yin, C.L. Milliman, S.J. Korsmeyer, *Cell*, 1993, **75**, 241.
- [71] M. Stubbs, P.M.J. McSheehy, J.R. Griffiths, C.L. Bashford, *Mol. Med. Today*, 2000, **6**, 15.
- [72] Z. Sobol, N.M. Cook, R.H. Schiestl, *Mutat. Res.*, 2008, **638**, 83.
- [73] R.J. Brennan, R.H. Schiestl, *Methods Mol. Biol.*, 2004, **262**, 111.
- [74] C.E. Rodriguez, Z. Sobol, R.H. Schiestl, *Toxicol. in Vitro*, 2008, **22**, 296.
- [75] B.E. Lopez, M. Shinyashiki, T.H. Han, J.M. Fukuto, *Free Rad. Biol. Med.*, 2007, **42**, 482.
- [76] E.G. DeMaster, B. Redfern, H.T. Nagasawa, *Biochem. Pharmacol.*, 1998, **55**, 2007.

- [77] A.J. Norris, M.R. Sartippour, M. Lu, T. Park, J.Y. Rao, M.I. Jackson, J.M. Fukuto, M.N. Brooks, *Int. J. Cancer*, 2008, **122**, 1905.
- [78] J.M. Fukuto, A.J. Hobbs, L.J. Ignarro, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1993, **196**, 707.
- [79] E.A. Dierks, J.N. Burstyn, *Biochem. Pharmacol.*, 1996, **51**, 1593.
- [80] A. Zeller, M.V. Wenzl, M. Beretta, H. Stessel, M. Russwurm, D. Koesling, K. Schmidt, B. Mayer, *Mol. Pharmacol.*, 2009, **76**, 1115.
- [81] C.G. Tocchetti, W. Wang, J.P. Froehlich, S. Huke, M.A. Aon, G.M. Wilson, G. Di Benedetto, B. O'Rourke, W.D. Gao, D.A. Wink, J.P. Toscano, M. Zaccolo, D.M. Bers, H.H. Valdivia, H.P. Cheng, D.A. Kass, N. Paolucci, *Circ. Res.*, 2007, **100**, 96.
- [82] A. El-Armouche, A. Wahab, K. Wittkopper, T. Schulze, F. Bottcher, L. Pohlmann, S.B. King, J.F. DuMond, C. Gerloff, R.H. Boger, T. Eschenhagen, L. Carrier, S. Donzelli, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2010, **402**, 340.
- [83] M.J. Wang, R. Mazhari, I. Ihsar, A. Wang, M.S. Sabbah, H.N. Sabbah, *J. Cardiac Failure*, 2009, **15**, 241.
- [84] E. Bermejo, D.A. Saenz, F. Alberto, R.E. Rosenstein, S.E. Bari, M.A. Lazzari, *Thromb. Haemostasis*, 2005, **94**, 578.

Praca wpłynęła do Redakcji 11 stycznia 2011

BIOLOGICZNA AKTYWNOŚĆ SIARKOWODORU BIOLOGICAL ACTIVITY OF HYDROGEN SULFIDE

Joanna Malinowska*, Karolina Babicz, Beata Olas

*Katedra Biochemii Ogólnej, Uniwersytet Łódzki,
ul. Pomorska 141/143, 90-236 Łódź
tel/fax: (0-42) 635-44-82
e-mail: malinowskaj@hotmail.com

Abstract

Wstęp

1. Powstawanie siarkowodoru
2. Regulacja stresu oksydacyjnego przez siarkowodór
3. Wpływ siarkowodoru na relaksację komórek mięśni gładkich naczyń krwionośnych (VSMC)
4. Proliferacja komórek mięśni gładkich ściany naczyń; rola siarkowodoru
5. Wpływ siarkowodoru na agregację płytek krwi

Piśmiennictwo cytowane



mgr Joanna Malinowska w 2009 roku ukończyła studia na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego. Od 2009 roku jest doktorantką w Katedrze Biochemii Ogólnej UŁ. Celem jej pracy jest zbadanie wpływu homocysteiny i jej tiolaktonu na funkcje biologiczne płytek krwi i aktywność hemostatyczną wybranych białek osocza, w tym fibrynogenu.



Karolina Babicz jest studentką V roku na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego. Obecnie pisze pracę magisterską w Katedrze Biochemii Ogólnej. Celem jej pracy jest zbadanie wpływu homocysteiny, tiolaktonu homocysteiny i wyciągu z aronii na aktywność hemostatyczną fibrynogenu.

dr hab. Beata Olas od 1997 roku jest zatrudniona w Katedrze Biochemii Ogólnej Uniwersytetu Łódzkiego, gdzie pracuje obecnie na stanowisku prof. nadzw. UŁ. Prace doktorską pt. „Badanie mechanizmu działania cisplatyny na metabolizm i proces aktywacji płytek krwi” obroniła w roku 1997. Kilkumiesięczny staż podoktorski, związany z badaniem mechanizmów działania resweratrolu i jego pochodnych, odbyła w Instytucie Biochemii (Uniwersytet w Bergen, Norwegia). W roku 2005 zakończyła przewód habilitacyjny – tytuł rozprawy habilitacyjnej „Właściwości biologiczne i mechanizm działania resweratrolu – naturalnego związku fenolowego w płytkach krwi”. Jej obecne zainteresowania naukowe obejmują m.in. poznanie roli wybranych związków tiolowych, w tym homocysteiny i jej pochodnych, np. tiolaktonu homocysteiny w zaburzeniach procesu hemostazy, które to mogą być powodem licznych chorób układu krążenia.

ABSTRACT

Hydrogen sulfide (H_2S) is a well known toxic gas that is synthesized from amino acids: cysteine (Cys) and homocysteine (Hcys) by two enzymes: cystathionine- β -synthase and cystathionine- γ -lyase (Fig. 1) [3]. Hydrogen sulfide, like nitric oxide (NO) and carbon monoxide (CO) is a signaling molecule in different systems [4]. Moreover, hydrogen sulfide has other various biological properties [8]. It induces hypotension in vivo and vasodilation in vitro by opening KATP channels in vascular smooth muscle cells [2, 5, 15]. Deficiency of H_2S may contribute to atherogenesis in some patients with hyperhomocysteinemia, in whom the metabolism of homocysteine to cysteine and H_2S is compromised by vitamin B_6 deficiency. Reduced H_2S production in brain was observed in patients with Alzheimer's disease. On the other hand, excess of H_2S may lead to mental homoretardation in patients with Down's syndrome and may be involved in the pathogenesis of hypotension associated with septic shock [6]. This review summarizes the endogenous metabolism, physiological and pathological function of hydrogen sulfide.

Keywords: hydrogen sulfide, homocysteine, hyperhomocysteinemia, oxidative stress, cardiovascular system

Słowa kluczowe: siarkowodór, homocysteina, hiperhomocysteinemia, stres oksydacyjny, układ sercowo-naczyniowy

WSTĘP

Od lat wiadomo, że siarkowodór (H_2S) jest gazem toksycznym, ale jednocześnie jest leczniczym składnikiem wód źródłanych. Siarkowodór występujący w organizmach żywych może być pochodzenia egzogenego, ale także może powstawać jako produkt uboczny w przemianach aminokwasów siarkowych. Po raz pierwszy rzetelnych dowodów potwierdzających obecność endogenego H_2S w tkankach ssaków dostarczyły przeprowadzone w 1989 roku badania autopsyjne tkanki mózgowej szczurów i tkanek ludzkich. Przełomem w badaniach nad tym gazem okazały się jednak prace badawcze Abe i Kimura z roku 1996 [1]. Ich odkrycie, że H_2S jest syntetyzowany w hipokampie na drodze zależnej od enzymów wywołało lawinowy wzrost zainteresowania nad tym fizjologicznie aktywnym mediatorem gazowym [2].

W warunkach normalnych H_2S jest bezbarwnym gazem o charakterystycznym zapachu zgniłych jaj, znanym przede wszystkim ze swoich właściwości toksycznych. W roztworach wodnych i pH zbliżonym do 7,4 – około 1/3 H_2S występuje w formie niezdysonowanej, a około 2/3 dysonuje na jony H^+ i HS^- , a następnie na S^{2-} . Podobnie jak tlenek azotu (NO) i tlenek węgla (CO) zwany powszechnie „czadem”, H_2S jest związkiem lipofilnym, swobodnie dyfundującym przez błony komórkowe, jednak z powodu jego częściowej dysonacji, błony komórkowe są dla niego słabiej przepuszczalne w porównaniu z NO czy CO [3].

Fizjologiczne stężenie H_2S w płynach ustrojowych i większości tkanek wynosi około 50 μM , przy czym w mózgu może być niemal 3-krotnie wyższe niż w surowicy [4]. W wysokich stężeniach H_2S jest zdolny do tworzenia kompleksów z Fe^{3+} mitochondrialnej oksydazy cytochromowej, czego konsekwencją jest zahamowanie komórkowego metabolizmu oksydacyjnego. H_2S może również hamować aktywność anhidrazy węglanowej i aminotransferazy tyrozynowej [5]. Zmiany endogenego stężenia siarkowodoru stwierdzono w wielu stanach chorobowych. Zwiększenie stężenia H_2S zaobserwowano m.in. w zespole Downa, zapaleniu okrężnicy, cukrzycy, w sepsie, natomiast obniżenie stężenia H_2S wykazano w chorobie Alzheimera, nadciśnieniu tętniczym czy marskości wątroby [6]. Dokładne właściwości fizyko-chemiczne oraz metody oznaczania siarkowodoru w materiale biologicznym zostały opisane przez Chwatko [7].

W ostatnich latach stwierdzono, że siarkowodór w stężeniach zbliżonych do fizjologicznych wykazuje wiele biologicznych działań [8]. Z tego też względu, część działań uznawanych, w wyniku uprzednio przeprowadzonych eksperymentów za toksyczne, może obecnie mieć znaczenie fizjologiczne [6]. Dzisiaj już wiemy, że siarkowodór, podobnie jak tlenek azotu czy tlenek węgla jest kolejnym nieorganicznym gazem pełniącym rolę mediatora w układzie sercowo-naczyniowym [4]. W układzie nerwowym aktywuje on też receptory kwasu *N*-metylo-*D*-asparaginowego. Ponadto, siarkowodór może spełniać rolę regulatora stresu oksydacyjnego towarzyszącego wielu stanom patologicznym. W niniejszym artykule przeglądowym opisano biolo-

giczną aktywność siarkowodoru, która nie jest w pełni poznana i jest zagadnieniem budzącym wiele kontrowersji.

1. POWSTAWANIE SIARKOWODORU

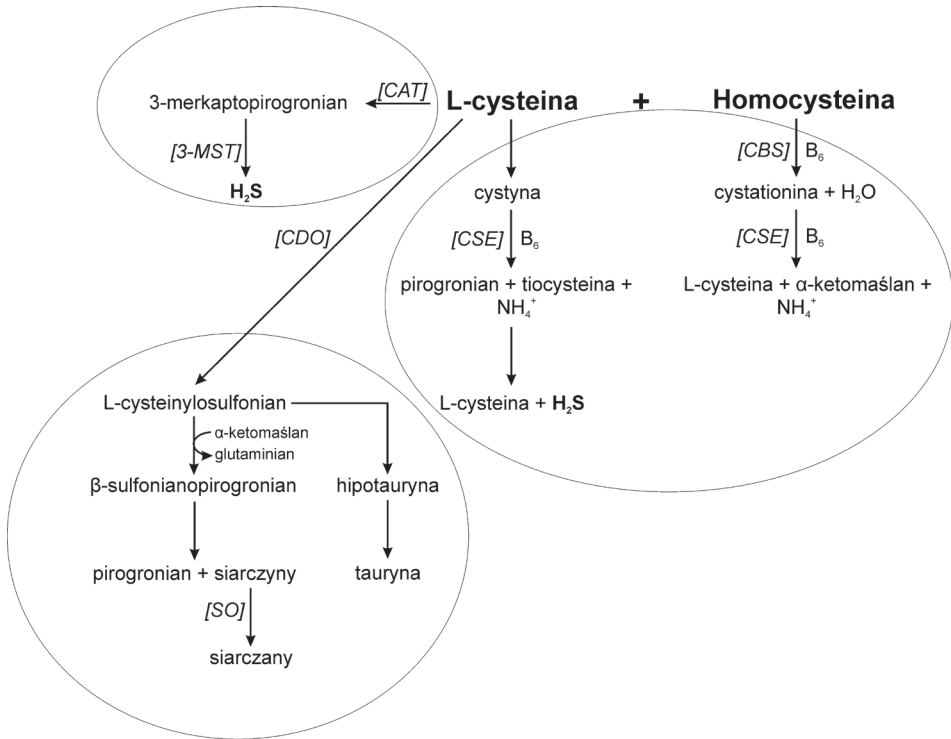
Siarkowodor może powstawać jako produkt uboczny w przemianach aminokwasów siarkowych: homocysteiny (Hcys) i cysteiny (Cys). Hcys jest pośrednim aminokwasem, syntetyzowanym podczas przemian metioniny do cysteiny, we wszystkich rodzajach komórek, które występują w organizmie człowieka i zwierząt. Metabolizm tego aminokwasu może zachodzić w dwojaki sposób – na drodze remetylacji do metioniny lub transsulfuracji do cysteiny. Remetylacja Hcys do metioniny jest szczególnie ważną drogą metabolizmu Hcys, dlatego, że tylko ta może zachodzić w komórkach śródbłonna naczyń krwionośnych. Reakcja remetylacji jest reakcją odwracalną, katalizowaną przez syntazę metioninową lub metylotransferazę beta-ina-homocysteina i reduktazę metylenotetrahydrofolianową. Szczególną rolę w tym sposobie metabolizowania Hcys odgrywa kwas foliowy, który jest tu dawcą grupy metylowej [9]. Innym dawcą grupy metylowej może być także betaina, natomiast witamina B₁₂ i witamina PP są niezbędnymi kofaktorami do przemian pochodnych tetrahydrofolianu [10]. Kwas foliowy w ścianie tętnic oprócz tego, że jest donorem grupy metylowej dla reakcji remetylacji Hcys, pełni także istotną rolę w tzw. reakcji czółenka folianowego. W reakcji tej tetrahydrofolian (THF) jest dawcą wodoru i elektronów – niezbędnymi do redukcji dihydrobiopteryny (BH2) do tetrahydrobiopteryny (BH4). BH4 pełni rolę miejscowego przeciwutleniacza i jest kofaktorem śródbłonkowej syntazy tlenu azotu (eNOS), która wytwarza NO rozszerzający naczynia krwionośne. Ważny jest fakt, iż reakcja czółenka folianowego ma „pierwszeństwo” przed reakcją remetylacji Hcys do wykorzystania folianu do własnych potrzeb. Dlatego też, zbyt mała ilość kwasu foliowego sprawia, że jest on „zabierany” od reakcji remetylacji i zostaje wykorzystany do przekształcenia BH2 w BH4. Jeśli folianu jest za mało, aby mogły zostać przeprowadzone obie reakcje (remetylacja Hcys i redukcja BH2 do BH4) wówczas wzrasta wewnątrzkomórkowe stężenie Hcys w wyniku zaniedbania reakcji remetylacji [11].

Reakcja transsulfuracji Hcys do cysteiny w odróżnieniu od reakcji remetylacji jest reakcją nieodwracalną, zachodzącą jedynie w nerce, trzustce i jelicie cienkim, katalizowaną przez β -syntazę cystationiny (CBS). Hcys ulega kondensacji z seryną tworząc cystationinę. Cystationina zostaje przekształcona przez γ -liazę cystationiny (CSE) do α -ketomasłanu i cysteiny [12]. W warunkach fizjologicznych cysteina wykorzystywana jest jako substrat do produkcji, m.in. endogennego siarkowodoru. Znane są dwa główne szlaki metabolizmu cysteiny. W pierwszym cyklu przemian dochodzi do oksydacyjnego przekształcenia cysteiny do siarczynu cysteiny, w reakcji katalizowanej przez enzym dioksygenazę cysteinową (CDO). Powstały siarczyn cysteiny może być następnie metabolizowany na drodze dekarboksylacji do tauryny lub przekształcany do pirogronianu i siarczynów. W dalszym etapie powstałe siar-

czyny utleniane są do siarczanów przez oksydazę siarczynową (SO) [3]. Z kolei drugi szlak przemian jest związany z nieoksydacyjnym usunięciem atomu siarki z cysteiny, co prowadzi do powstania H_2S . W jego tworzeniu uczestniczą dwa enzymy zaangażowane w wyżej opisany szlak transsulfuracji homocysteiny – CBS i CSE [6]. Zarówno CBS i CSE używają 5-fosforanu pirydoksalu jako kofaktora, jednak enzymy te cechuje odmienny mechanizm działania. CSE katalizuje przekształcenie disiarczku cysteiny (cystyny) do pirogronianu, amoniaku oraz tiocysteiny, która następnie ulega nieenzymatycznemu rozpadowi do cysteiny i H_2S . Mechanizm powstawania H_2S przy udziale CBS związany jest najprawdopodobniej z reakcją kondensacji cysteiny z Hcys, w wyniku której otrzymujemy cystationinę. Procesowi syntezy cystationiny towarzyszy uwalnianie H_2S [3, 6, 13]. Ostatnie badania wskazują również na potencjalny udział siarkotransferazy 3-markaptopirogronianowej (3-MST) w powstawaniu endogennego H_2S . Enzym ten do produkcji H_2S wykorzystuje 3-merkaptopirogronian – metabolit przemiany cysteiny i α -ketoglutaranu. Reakcja ta katalizowana jest przez aminotransferazę cysteinową (CAT) [2, 13]. W warunkach dostatecznego stężenia cysteiny, H_2S może powstawać zarówno w przedstawionym powyżej pierwszym szlaku metabolicznym, jak i w procesach katalizowanych przez CBS, jak i CSE. CBS ulega wysokiej ekspresji w wątrobie szczura, nerkach myszy [2], hipokampie oraz mózdzku i jest głównym enzymem zaangażowanym w powstawanie H_2S w mózgu i tkance nerwowej. CSE dominuje w wytwarzaniu H_2S w układzie sercowo-naczyniowym [6, 13]. 3-MST ulega ekspresji w nabłonku kanalików proksymalnych nerek, hepatocytach, tkance serca, mózgu i wydaje się być zaangażowany w powstawanie H_2S w miokardium [2, 13].

W warunkach *in vivo*, endogenne stężenie H_2S jest regulowane przez liczne szlaki metaboliczne. Najważniejszymi szlakami jest proces utleniania w mitochondriach oraz cytozolowa metylacja. H_2S może być również wychwytywany przez methemoglobinę lub cząsteczki zawierające metal bądź disiarczek np. utlenowany glutation (GSSG). H_2S wydalany jest przede wszystkim przez nerki w formie wolnej lub skoniugowanej [2, 5, 6].

Badania wykazały, że w warunkach niedoboru lub braku cysteiny, substratem do syntezy H_2S staje się Hcys [3, 6]. Podczas hiperhomocysteinemii, Hcys rywalizuje z cysteiną o miejsce wiązania do CSE. Związanie Hcys do CSE skutkuje zahamowaniem aktywności enzymatycznej enzymu i w konsekwencji prowadzi do redukcji endogennej produkcji H_2S w organizmie. Zmniejszenie endogennej produkcji H_2S może nastąpić również w wyniku modyfikacji CSE przez tiolakton homocysteiny. Mechanizm tej reakcji nie jest jednak w pełni wyjaśniony i wymaga dalszych badań [13]. Szlak endogennej syntezy siarkowodoru przedstawiono na Rysunku 1.



Rysunek 1. Szlaki syntezy endogenego siarkowodoru [3], 3-MST – siarkotransferaza 3-merkaptopirogronianowa, CAT – aminotransferaza cysteinowa, CBS – β -syntaza cystationiny, CDO – dioksygenaza cysteinowa, CSE – γ -liaza cystationiny, SO – oksydaza siarczynowa

Figure 1. Pathways of synthesis of endogenous hydrogen sulfide [3], 3-MST – 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase, CAT – cysteine aminotransferase, CBS – cystathionine β -synthase, CDO – cysteine dioxygenase, CSE – cystathionine γ -lyase, H_2S – hydrogen sulfide, SO – sulphite oxidase

Warto zaznaczyć, że siarkowódór w organizmach żywych może być także pochodzenia egzogenego. Może być on wchłaniany, przede wszystkim przez drogi oddechowe lub skórę ze środowiska, a następnie przedostawać się do układu krążenia.

2. REGULACJA STRESU OKSYDACYJNEGO PRZEZ SIARKOWODÓR

Badania zakrojone na szeroką skalę dowodzą, że stres oksydacyjny odgrywa kluczową rolę w patogenezie różnych chorób, m. in. chorób układu krążenia, a przede wszystkim w rozwoju miażdżycy tętnic [14]. Ochronna rola H_2S w regulacji stresu oksydacyjnego pozostaje ciągle niewyjaśniona. Przeprowadzone badania wskazują, że H_2S jako związek wysoce reaktywny, wykazuje zdolność łatwego reagowania z reaktywnymi formami tlenu (RFT) czy azotu (RFA). Jak dowiedziono, H_2S

reaguje m.in. z anionorodnikiem ponadtlenkowym ($O_2^{\cdot-}$) [13], nadtlenkiem wodoru (H_2O_2), nadtlenoazotynem ($ONOO^-$) i podchlorynem, których powstawanie jest promowane podczas hiperhomocysteinemii. Protekcyjne działanie H_2S , polegające na oddziaływaniu z tymi wysoce reaktywnymi składnikami, może obniżyć ilość RFT i RFA w komórce, a tym samym chronić białka przed modyfikacjami oksydacyjnymi, a przez to zwiększać żywotność komórki [3, 14]. Należy jednak nadmienić, że np. siarczyny, będące produktem reakcji H_2S z $O_2^{\cdot-}$, w zależności od stężenia mogą wykazywać zarówno działanie toksyczne, jak i antyoksydacyjne. H_2S posiada również zdolność reagowania z NO, konsekwencją czego jest powstawanie nitrozotioili (S-NO), przy czym w odróżnieniu od innych nitrozotioili (R-S-NO) będących rezerwuarem NO i często naśladujących jego aktywność, nitrozotiole powstałe z H_2S i NO są nieaktywne. Sugeruje to że, H_2S może redukować nadmiar NO generowanego w stanach zapalnych, ale również limitować jego biodostępność w stężeniach fizjologicznych [3]. Ponadto wykazano, że niskie stężenie NaHS (30–50 μ M) wzmacnia ochronną rolę *N*-acetylocysteiny, zredukowanego glutatationu, dysmutazy ponadtlenkowej, katalazy (EC 1.11.1.6), jodonianu dwufenylowego czy witaminy C przed powstawaniem RFT indukowanym Hcys [19]. H_2S wzmacnia także syntezę glutatationu poprzez stymulowanie transportu cysteiny do komórek [3].

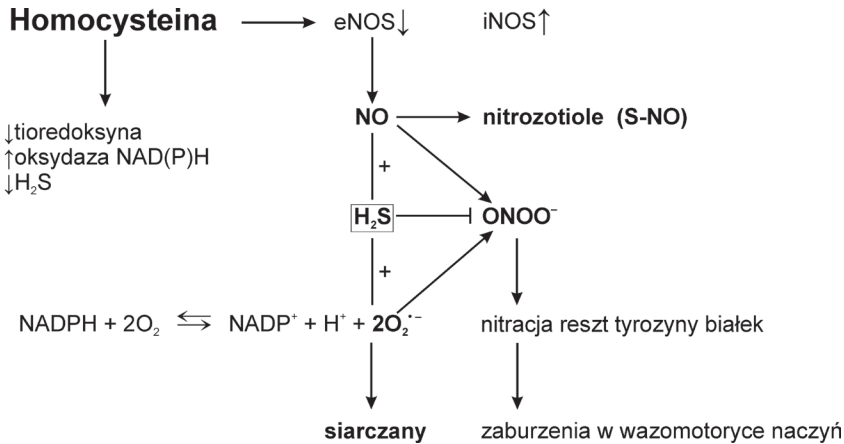
3. WPŁYW SIARKOWODORU NA RELAKSACJĘ KOMÓREK MIĘŚNI GŁADKICH NACZYŃ KRWIONOŚNYCH (VSMC)

Siarkowodór, podobnie jak NO, wykazuje silne właściwości wazorelaksacyjne. Wykazano, że jednorazowe, dożylnie podanie dużej dawki roztworu NaHS, będącego donorem H_2S , szczurom w stanie znieczulenia ogólnego indukuje przejściowy, zależny od dawki spadek ciśnienia tętniczego o około 12–30 mmHg [3–6]. Badania przeprowadzone również na szczurach w warunkach *in vitro*, potwierdziły wazorelaksacyjne działanie H_2S na tętnicę piersiową oraz żyłę wrotną, obkurczone epinefryną [3]. W toku kolejnych doświadczeń przypuszczano, że usunięcie śródbłonna, jak i odnerwienie naczyń nie wpływa na wazorelaksacyjną aktywność H_2S , a relaksacja komórek aorty szczura była wynikiem bezpośredniego oddziaływania H_2S na komórki mięśniówki naczyń. Obecnie wiadomo, że zdolność naczyń do rozszerzania indukowana H_2S , ulega jednak osłabieniu po usunięciu śródbłonna lub po podaniu estru *N*-*L*-argininometylowego (L-NAME), będącego nieselektywnym inhibitorem syntazy tlenu azotu. Pomimo braku dowodów potwierdzających obecność specyficznych receptorów tiolowych, przypuszcza się, że H_2S jest zdolny do interakcji z NO. H_2S wykazuje zarówno zdolność do wzmacniania, jak i redukcji relaksacyjnego działania NO w aorcie szczurów, podczas gdy NO przyczynia się do wzmocnienia wazorelaksacji indukowanej H_2S . Ponadto, obecność nienaruszonego śródbłonna może służyć jako bufor utrzymujący H_2S w ścianie naczyń, przez co relaksacja naczyniowa jest nasiloną i długotrwałą [2, 5]. Osłabienie relaksacji nienaruszonych naczyń, indukowanej H_2S obserwowano również w badaniach z zastoso-

waniem apamin i charybdotoksyn, blokujących hiperpolaryzacyjny czynnik pochodzący ze śródbłonka (EDHF), co może wskazywać na uwalnianie EDHF z komórek śródbłonka przez H_2S . Jednak zależność właściwości biologicznych śródbłonka od wpływu H_2S nie jest w pełni poznana i niesie ze sobą wiele kontrowersji [5]. Zgromadzone dane pozwalają wnioskować, że H_2S wywiera swoje funkcje poprzez oddziaływanie na różne kanały, a głównym czynnikiem determinującym efekt wazorelaksacyjny indukowany H_2S w komórkach mięśniówki naczyń jest wzrost aktywności kanałów potasowych regulowanych ATP (K_{ATP}) [15]. Argumentami przemawiającymi za tym mechanizmem jest:

- naśladowanie hipotensyjnego działania H_2S *in vivo* przez pinacidil – związek otwierający K_{ATP} ;
- zahamowanie hipotensyjnego działania H_2S *in vivo* i wazorelaksacyjnego *in vitro*, przez antagonistę K_{ATP} – glibenklamid [2, 5, 15];
- zniesienie efektu relaksacyjnego aorty szczura *in vitro* po inkubacji naczyń z wysokim stężeniem jonów K^+ ;
- wzrost przepływu jonów K^+ w kanałach K_{ATP} i hyperpolaryzacja komórek mięśniówki naczyń indukowana H_2S udowodnione poprzez wykorzystanie techniki *patch clamp* [15].

Jednak ostatnie wyniki badań sugerują, że rola H_2S w układzie sercowo-naczyniowym może nie być bezpośrednio związana z działaniem wazorelaksacyjnym, ale raczej z udziałem w regulacji lokalnych stężeń i aktywności NO. Teorię tą popierają obserwacje, że stężenie H_2S potrzebne do wywołania relaksacji naczyń (200 μM) jest większe od stężenia fizjologicznego [2]. Udział siarkowodoru w regulacji biodostępności tlenku azotu podczas hiperhomocysteinemii przedstawiono na Rysunku 2.



Rysunek 2. Udział siarkowodoru w regulacji biodostępności tlenku azotu podczas hiperhomocysteinemii [13, zmodyfikowano], eNOS – śródbłonkowa syntaza tlenku azotu, iNOS – indukowalna syntaza tlenku azotu, NO – tlenek azotu

Figure 2. The contribution of hydrogen sulfide in the regulation of nitric oxide bioavailability during hyperhomocysteinemia [13, modified], eNOS – endothelial nitric oxide synthase, iNOS – inducible nitric oxide synthase, NO – nitric oxide

4. PROLIFERACJA KOMÓREK MIĘŚNI GŁADKICH ŚCIANY NACZYŃ; ROLA SIARKOWODORU

W związku z faktem, że naczyniowa relaksacja w znacznej mierze jest zależna od właściwej proporcji między komórkami śródbłónka, a komórkami mięśniówki naczyń, zachwianie tego stosunku w kierunku komórek mięśni gładkich, obserwowane m.in. podczas hiperhomocysteinemii, skutkuje zaburzeniami w odkształcalności naczyń, czyli zdolności do ich rozciągania i powrotu do wyjściowego kształtu. Wyniki badań wskazują na zdolność H_2S do hamowania proliferacji komórek mięśniówki naczyń, wywołanej endoteliną. Sugeruje się, że mechanizm działania tego gazowego mediatora związany jest z inhibicją aktywności kinaz białkowych indukowanych mitogenami (MAPK). Ponadto zaobserwowano, że podawanie NaHS zapobiega przebudowie mięśniówki u szczurów przyjmujących przewlekle inhibitor syntazy tlenu azotu [6]. Badania z zastosowaniem innego donora H_2S – S-diclofenac, będącego pochodną niesteroidowych leków przeciwzapalnych również potwierdziły zdolność tego gazu do hamowania proliferacji komórek mięśni gładkich naczyń. Inhibicja rozrostu komórek, obserwowana podczas tego doświadczenia, wiązana była ze spadkiem przeżywalności oraz wzrostem intensywności procesów apoptotycznych w tych komórkach [2]. Ponadto, podczas hiperhomocysteinemii obserwowany jest spadek aktywności CSE, konsekwencją czego może być zmniejszenie syntezy endogennego H_2S . Nie jest zatem zaskoczeniem, że dzięki wykorzystaniu narzędzi inżynierii genetycznej, powodujących wzrost produkcji endogennego H_2S można zahamować proliferację komórek mięśni gładkich ściany naczyń, a przez to utrzymać odkształcalność przez ścianę naczyń podczas hiperhomocysteinemii. Badania przeprowadzone w warunkach *in vitro* potwierdzają, że nadekspresja enzymu CSE, uczestniczącego w tworzeniu H_2S hamuje proliferację komórek mięśniówki poprzez wzrost produkcji tego gazowego mediatora [13].

5. WPŁYW SIARKOWODORU NA AGREGACJĘ PŁYTEK KRWI

Płytki krwi odgrywają bardzo istotną rolę w procesie hemostazy (m.in. w hamowaniu krwawienia). Płytki mogą być aktywowane przez szereg agonistów włączając czynnik koagulacyjny (trombinę), hormony (epinefrynę, wazopresynę), niskocząsteczkowe związki (serotoninę, difosforan adenozyiny – ADP), pochodne lipidowe (czynnik aktywacji płytek – PAF, tromboksan A_2) i inne związki (kolagen). Reakcją płytek na różne aktywatory jest adhezja, zmiana kształtu, agregacja i wydzielanie różnych substancji zmagazynowanych w ziarnistościach płytkowych [16]. Aktywacja płytek krwi przez agonistę może także prowadzić do produkcji reaktywnych form tlenu czy azotu [17]. Tak więc aktywacja płytek związana jest z uruchamianiem wielu procesów fizjologicznych i patologicznych włączając trombozę, choroby serca, arteriosklerozę czy choroby nowotworowe.

Wyniki przeprowadzonych badań wskazują na zaangażowanie H_2S w mechanizm hamowania jednego z etapów aktywacji płytek krwi – agregacji płytek krwi

w warunkach *in vitro*. Stwierdzono, że NaHS zapobiega, w sposób zależny od stężenia, agregacji płytek indukowanej przez różnych agonistów: ADP, kolagen, epinefrynę, trombinę czy kwas arachidonowy. Całkowite zahamowanie agregacji płytek krwi obserwowano przy stężeniu 10 mM NaHS, niezależnie od rodzaju agonisty. W celu zrozumienia mechanizmów leżących u podstaw inhibicji agregacji płytek indukowanej przez NaHS, przetestowano różne inhibitory NaHS. Początkowo bowiem aktywność antyagregacyjną H₂S wiązano z jego udziałem w tworzeniu endogennego NO. Jednak, ani inhibitor syntazy tlenu azotu (L-NAME), ani inhibitory cyklicznej adenylowej oraz cyklicznej guanylowej nie powodowały zahamowania aktywności NaHS i jego wpływu na hamowanie agregacji płytek krwi indukowanej ADP. Wykluczono zatem mechanizm związany z endogenną produkcją NO oraz z udziałem cGMP oraz cAMP jako mediatorów w antyagregacyjnym działaniu NaHS. Ponadto, wyniki badań z zastosowaniem blokerów kanałów K_{ATP} (glibenklamid, TEA) wykluczyły również zaangażowanie tych kanałów w antyagregacyjnym działaniu NaHS [18]. Mechanizmy inhibicji procesu agregacji płytek krwi przez siarkowodor, podobnie jak inne właściwości biologiczne H₂S pozostają nadal niewyjaśnione. Zastosowanie czułych metod analitycznych pozwoli śledzić losy siarkowodoru w różnych komórkach, co z pewnością przybliży nas do poznania mechanizmów działania tego związku.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] K. Abe, H. Kimura, J. Neurosci., 1996, **16**, 1066.
- [2] D.J. Elsey, R.C. Fowkes, D.F. Baxter, Cell Biochem. Funct., 2010, **28**, 95.
- [3] E. Łowicka, J. Bętkowski, Pharmacol. Rep., 2007, **59**, 4.
- [4] P.J. Hogg, J. Thromb. Haemost., 2009, **7**, 13.
- [5] R. Wang, FASEB J., 2002, **16**, 1792.
- [6] J. Bętkowski, Postepy Hig. Med. Dosw., 2004, **58**, 285.
- [7] G. Chwatko, Wiad. Chem., 2010, **64**, 243.
- [8] R. Wang, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 2009, **29**, 156.
- [9] M. Medina, J.L. Urdiales, M.I. Amores, Eur. J. Biochem., 2001, **268**, 387.
- [10] W.A. Turski, E. Bald, Post. Bioch., 2005, **51**, 395.
- [11] S. Kraczkowska, Z. Suchocka, J. Pachecka, Biul. Wydz. Farm. AMW, 2005, **3**, 4.
- [12] J.T. Brosnan, R.L. Jacobs, L.M. Stead, M.E. Brosnan, Acta Biochim. Pol., 2004, **51**, 405.
- [13] U. Sen, P.K. Mishra, N. Tyagi, S.C. Tyagi, Cell Biochem. Biophys., 2010, **57**, 49.
- [14] S. Yan, T. Chang, H. Wang, L. Wu, R. Wang, K.Q. Meng, Biochem. Biophys. Res. Commun., 2006, **351**, 485.
- [15] T. Chiku, D. Padovani, W. Zhu, S. Singh, V. Vitvitsky, R. Banerjee, Biol. Chem., 2009, **284**, 11601.
- [16] K. Karolczak, B. Olas, J. Kołodziejczyk, Post. Biol. Kom., 2009, **36**, 101.
- [17] M. Krzanowski, T.B. Domagała, M. Frołow, A. Szczeklik, Kard. Pol., 2000, **2**, 29.
- [18] G. Zagli, R. Patacchini, M. Trevisani, R. Abbate, S. Cinotti, G.F. Gensini, G. Masotti, M. Geppetti, Eur. J. Pharmacol., 2007, **559**, 65.
- [19] N. Tyagi, K.S. Moshal, U. Sen, T.P. Vacek, M. Kumar, W.M. Hughes Jr., S. Kundu, S.C. Tyagi, ARS, 2009, **11**, 25.

CZYNNIKI WPŁYWAJĄCE NA PENETRACJĘ SKŁADNIKÓW AKTYWNYCH PRZEZ SKÓRĘ

FACTORS INFLUENCING THE PERCUTANEOUS PENETRATION OF ACTIVE INGREDIENTS

M. Jaworska, E. Sikora*, J. Ogonowski,

*Instytut Chemii i Technologii Organicznej,
Wydział Inżynierii i Technologii Chemicznej, Politechnika Krakowska
ul. Warszawska 24, 31-155 Kraków
e-mail: esikora@pk.edu.pl

Abstract

Wstęp

1. Transport przez naskórkowy
2. Drogi dyfuzji substancji aktywnej przez skórę
3. Wpływ właściwości substancji aktywnych na ich zdolność penetracji w głąb skór
4. Podłoże dla substancji aktywnej
 - 4.1. Forma fizykochemiczna podłoża a transport przez naskórkowy
 - 4.1.1. Wpływ stopnia rozdrobnienia emulsji
 - 4.1.2. Wpływ doboru fazy olejowej
 - 4.1.3. Wpływ mieszaniny surfaktant/kosurfaktant oraz jej stężenia
 - 4.2. Promotory transportu przezskórnego

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane

mgr inż. Małgorzata Jaworska – absolwentka Wydziału Inżynierii i Technologii Chemicznej Politechniki Krakowskiej. Jest doktorantką w Instytucie Chemii i Technologii Organicznej. Przedmiotem jej zainteresowań naukowych są makro-, mikro- i nanoemulsje jako nośniki substancji aktywnych przez skórę.

dr inż. Elżbieta Sikora – ukończyła studia i doktoryzowała się na Wydziale Inżynierii i Technologii Chemicznej Politechniki Krakowskiej. Jest adiunktem w Katedrze Technologii Organicznej i Procesów Rafineryjnych. Zainteresowania naukowe dr inż. E. Sikory dotyczą technologii organicznej małowadkowej, obejmują zagadnienia związane z pozyskiwaniem, badaniem właściwości oraz zastosowaniem surowców pochodzenia naturalnego w produktach kosmetycznych i produktach chemii gospodarczej.

prof. dr hab. inż. Jan Ogonowski – jest kierownikiem specjalności Chemia i Technologia Kosmetyków oraz kierownikiem Katedry Technologii Organicznej i Procesów Rafineryjnych na Wydziale Inżynierii i Technologii Chemicznej Politechniki Krakowskiej. Katedry Technologii Organicznej i Procesów Rafineryjnych na Wydziale Inżynierii i Technologii Chemicznej Politechniki Krakowskiej. Zainteresowania naukowe profesora dotyczą katalizy, technologii chemicznej oraz technologii produktów małowadkowych.

ABSTRACT

This article presents main factors influencing transdermal delivery of active ingredients in cosmetic and pharmaceutical emulsions. The emulsions are widely used as vehicles, because of their excellent solubilizing properties for lipophilic and hydrophilic active ingredients.

It is shown that physicochemical properties of the active ingredients (i.e. molecular mass, polarity, lipophilicity), type of emulsion, the droplet size of dispersed phase, kind of emollients, surfactant/co-surfactant system and presence of permeation enhancer may affect the percutaneous absorption.

Keywords: percutaneous penetration, active ingredient, vehicle, emulsion, permeation enhancer

Słowa kluczowe: przenikanie przezskórne, składnik aktywny, nośnik, emulsja, promotor przenikania

WSTĘP

Najbardziej popularną formą podłoża stanowiącego nośnik substancji aktywnych w produktach kosmetycznych są emulsje. Stanowią one formę fizykochemiczną kosmetyku, która skutecznie wspomaga utrzymanie równowagi wodno-lipidowej w skórze, a dodatkowo ma zdolność transportu substancji aktywnych, zarówno polarnych jak i niepolarnych, w głębsze warstwy skóry, co podnosi efektywność działania kosmetyków. Obecnie, kiedy na rynku produktów pielęgnacyjnych pojawiają się kosmetyki inwazyjne, z pogranicza farmaceutyków, tzw. kosmeceutyki, wiedza na temat sposobów przenikania składników czynnych przez skórę oraz optymalizacja właściwości podłoża stanowi niezwykle ważny element przy projektowaniu nowych formułacji [1, 2]. Właściwie dobrany skład bazy woskowo-tłuszczowej, obecność rozpuszczalników substancji aktywnej, odpowiedni układ surfaktant/kosurfaktant oraz obecność promotorów sorpcji stanowią istotne elementy wpływające na transport substancji biologicznie-czynnych przez skórę.

Przyjmuje się, że dyfuzja substancji aktywnych przez skórę może zachodzić na dwa sposoby: drogą wewnątrzkomórkową i międzykomórkową. Czynnikiem determinującym dyfuzję związku aktywnego przez skórę są jego właściwości fizykochemiczne: masa cząsteczkowa, liofilowość i polarność. Wraz ze wzrostem powinowactwa składnika aktywnego do lipidowej warstwy naskórka rośnie jego zdolność penetracji przez *stratum corneum*, natomiast większość związków o charakterze hydrofilowym ma znacznie ograniczoną możliwość penetracji do skóry [3–5].

1. TRANSPORT PRZEZNASKÓRKOWY

W przypadku kosmetyków, podobnie jak leków podawanych zewnętrznym, przenikanie substancji czynnych przez barierę skóry stanowi główny problem ograniczający skuteczność działania produktu. Ograniczenia wynikają z budowy i funkcji, jakie pełni ta zewnętrzna powłoka naszego organizmu. Skóra ma przede wszystkim za zadanie ochronę przed wnikaniem związków chemicznych oraz patogennych mikroorganizmów.

Skóra ludzka zbudowana jest z trzech zasadniczych części: tkanki podskórnej, skóry właściwej oraz wielowarstwowego naskórka. Barierę ochronną, limitującą przenikanie substancji przez skórę stanowi najbardziej zewnętrzna warstwa naskórka, tzw. warstwa rogowa (*stratum corneum*). W uproszczeniu można ją przedstawić, jako układ korneocytów (martwych komórek, wypełnionych keratyną) połączonych ze sobą białkowymi wypustkami (desmosomami), zawieszonych w spoiwie lipidowym o budowie ciekłokrystalicznej. Macierz lipidowa warstwy rogowej ma strukturę wielokrotnych podwójnych warstw utworzonych przez spontaniczne uszeregowanie regionów polarnych lipidów przedzielonych warstwami wodnymi. W Tabeli 1 i 2 przedstawiono ogólny skład substancji występujących w strukturach cementu międzykomórkowego.

Tabela 1. Skład lipidów cementu międzykomórkowego [3]
 Table 1. Composition of the intercellular lipids [3]

Rodzaj lipidów	[% wag.]
Ceramidy	40
Sterole i pochodne	25
Wolne kwasy tłuszczowe	18
Węglowodory	11
Inne	6

Tabela 2. Składniki Naturalnego Czynnika Nawilżającego (NMF) [3]
 Table 2. Ingredients of Natural Moisture Factor[3]

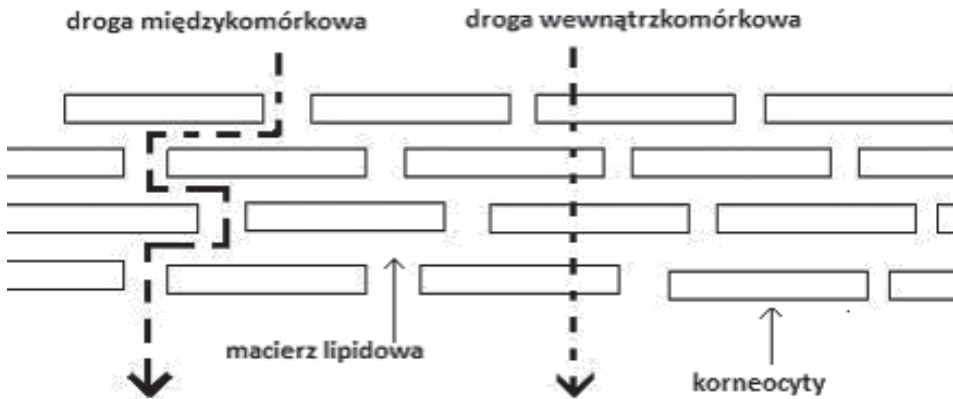
Związek	[% wag.]
Wolne aminokwasy	40,0
Kwas piroglutaminowy(PCA)	12,0
Mleczany	12,0
Mocznik	7,0
Cukry proste, kwasy organiczne i peptydy	8,5
Organiczne związki azotu	1,5
Jony chlorkowe	6,0
Jony fosforanowe	0,5
Jony sodowe i potasowe	9,0
Jony wapniowe i magnezowe	3,0
Cytryniany i inne sole organiczne	0,5

Spoiwo międzykomórkowe zawdzięcza zwartą strukturę oddziaływaniom pomiędzy poszczególnymi składnikami, z jednej strony, o charakterze niepolarnym pomiędzy łańcuchami alkilowymi lipidów, z drugiej polarnym – tworzenie wiązań wodorowych pomiędzy cząsteczkami wody i polarnymi fragmentami lipidów.

Większość substancji chcąc przekroczyć barierę naskórka musi przebrnąć przez hydrofobowy cement międzykomórkowy wypełniający przestrzenie między korneocytami. Bez większych problemów mogą przez warstwę rogową naskórka przenikać jedynie związki charakteryzujące się powinowactwem do lipidów cementu międzykomórkowego. Związki hydrofilowe, zwłaszcza zjonizowane, praktycznie nie wnikają w strukturę spoiwa, za wyjątkiem niektórych substancji małowcząstkowych [3–7].

2. DROGI DYFUZJI SUBSTANCJI AKTYWNEJ PRZEZ SKÓRĘ.

Model kinetyczny skóry, według którego warstwa rogowa przedstawiona została, jako membrana o charakterze lipofilowym po raz pierwszy przedstawiono w latach 80. Wykluczał on możliwość dyfuzji związków zdysocjowanych przez tę warstwę. Niewielki transport jonów przez skórę był tłumaczony dyfuzją kanałami potowymi lub poprzez mieszki włosowe. Jednak w 1987 r. został opublikowany po raz pierwszy [8] model zakładający istnienie dwóch dróg penetracji: lipofilowej (poprzez cement międzykomórkowy) i hydrofilowej (poprzez mikropory) (Rys. 1). Od tamtego czasu pojawiło się wiele pytań i niejasności, jak chociażby lokalizacja hydrofilowych mikrokanalów lub ich powiązanie z obszarami wodnymi istniejącymi pomiędzy podwójnymi warstwami lipidów warstwy rogowej naskórka. Znaczącym jest fakt, iż dominującą drogą dyfuzji substancji aktywnych przez skórę (początkowo badania prowadzono dla leków podawanych zewnętrznie), są przestrzenie międzykomórkowe (droga międzykomórkowa). Nie można zatem ominąć przeszkody w postaci macierzy lipidowej i transportować substancji aktywnej wyłącznie drogą transcelularną („wewnątrzkomórkową”), ponieważ substancja aktywna zawsze musi pokonać również przestrzeń międzykomórkową o charakterze lipofilowym. Dla substancji hydrofilowych będzie to czynnikiem hamującym szybkość dyfuzji [3–9].



Rysunek 1. Drogi transportu przeznaskórkowego
Figure 1. Pathways for skin penetration

Sznitowska w swej pracy podjęła próbę opisanie polarnej drogi dyfuzji przez skórę substancji amfoterycznych: aminokwasów (lizyny, histydyny, kwasu asparaginy) oraz baklofenu [4]. Związki te występują w postaci jonów w całym zakresie pH, w punkcie izoelektrycznym tworzą tzw. jony obojętne, pozwalają więc na założenie, że obserwowany transport jest wynikiem dyfuzji związku w postaci jonowej. Badanie mechanizmu transportu przez skórę prowadzono w warunkach *in vitro*. Na podstawie przeprowadzonych badań autorka stwierdziła, że dyfuzja związków o charakterze jonowym przez skórę przebiegała drogą hydrofilowych mikroporów.

Szybkość penetracji jonów badanych substancji nie zależała od ich współczynnika podziału lipid/woda, determinującego dyfuzję związków podstawową drogą, tzn. w strukturach lipidowych. Współczynnik przenikania wszystkich badanych jonów zawierał się w wąskim zakresie $1-5 \times 10^{-8}$ cm/s, chociaż różniły się one hydrofobowością. Zdaniem autorki na kinetykę przenikania badanych związków przez skórę miały istotny wpływ zjawiska hydroosmotyczne, zachodzące w *stratum corneum*, co przemawia za transportem mikroporami. Przy czym nie stwierdzono zależności pomiędzy szybkością dyfuzji związków aktywnych od liczby mikroporów w *stratum corneum*. Podstawową cechą polarnej drogi dyfuzji jest jej krętość i nieciągłość. Dowodem nieciągłości hydrofilowych mikroporów jest brak zależności szybkości transportu jonów a ich zawartością oznaczoną w *stratum corneum* lub w naskórku. Nawet przy dużym gradiencie stężeń pomiędzy naskórkiem a hydrofilową skórą właściwą obserwowano małą szybkość penetracji badanych związków przez skórę. W trakcie badań próbowano również określić lokalizację hydrofilowych mikrokanałów. Przeprowadzone badania przemawiały za międzykomórkową lokalizacją polarnej drogi dyfuzji. Zwiększoną penetrację baklofenu zaobserwowano w obecności etanolu lub laurylosiarczanu sodu, które wpływają na struktury lipidowe, a nie na białkowe struktury keratyny, która jest podstawowym składnikiem keratynocytów. Ostatecznie Sznitowska wnioskuje, że wewnątrzkomórkowej dyfuzji związku towarzyszy przenikanie przez przestrzeń międzykomórkową o charakterze lipidowym i ten etap limituje szybkość transportu substancji hydrofilowych.

3. WPŁYW WŁAŚCIWOŚCI SUBSTANCJI AKTYWNYCH NA ICH ZDOLNOŚĆ PENETRACJI W GŁĄB SKÓRY

Jedną z najważniejszych właściwości substancji aktywnej, mającą wpływ na jej penetrację w głąb skóry jest lipofilowość. Ze względu na to, iż cement międzykomórkowy warstwy rogowej naskórka składa się głównie z lipidów, substancje lipofilowe dużo łatwiej przenikają przez *stratum corneum* niż substancje hydrofilowe. Niżej położone żywe warstwy naskórka i skóry właściwej mają zdecydowanie bardziej hydrofilowy charakter (obszar proteinowy). Pod względem fizycznym można je uznać za rodzaj hydrożelu białkowego. Nie mniej jednak droga składników aktywnych o charakterze hydrofilowym do tych warstw jest znacznie utrudniona przez konieczność pokonania wyżej położonej warstwy rogowej naskórka. Dlatego tak istotnym, przy projektowaniu efektywnie działających kosmetyków, jest znajomość właściwości substancji czynnej, w celu określenia, jaka jej ilość pozostanie w warstwach lipidowych naskórka, a jaka dotrze do warstw hydrofilowych skóry [3, 4].

Transport substancji aktywnych przez skórę opisuje I prawo dyfuzji Ficka (Równanie 1) [10]:

$$J = \frac{DK(c_v - c_R)}{h} = k_p(c_v - c_R) \quad (1)$$

gdzie:

J – przepływ składnika aktywnego przez jednostkę powierzchni w jednostce czasu,

D – współczynnik dyfuzji,

K – współczynnik podziału składnika aktywnego między nośnikiem, a *stratum corneum*,

h – grubość membrany/długość drogi dyfuzji,

k_p – współczynnik przenikania składnika aktywnego w *stratum corneum*,

$c_v - c_R$ – różnica stężeń składnika aktywnego pomiędzy nośnikiem i *stratum corneum*.

Z powyższego równania wynika, że przepływ składnika aktywnego z nośnika do skóry jest wprost proporcjonalny do gradientu stężeń. Zatem im większe stężenie substancji czynnej w emulsji, tym efektywniej zajdzie proces dyfuzji. Oczywiście należy pamiętać o pewnych ograniczeniach, jak chociażby o skłonności do podrażnienia skóry przez składnik aktywny przy zbyt wysokich jego stężeniach. Parametrami limitującymi dyfuzję będzie również lipofilowość składnika aktywnego oraz jego masa cząsteczkowa, ponieważ współczynnik dyfuzji (D) jest odwrotnie proporcjonalny do masy cząsteczkowej.

Miarą lipofilowości związku, powinowactwa do fazy lipidowej, jest logarytm dziesiętny ze współczynnika podziału substancji aktywnej w mieszaninie oktanolu i wody (log P). Zależność przedstawiająca definicję współczynnika podziału oktanol/woda (Równanie 2) oparta jest na prawie podziału Nernsta [11–13]:

$$P = C_{\text{okt}}/C_{\text{aq}} \quad (2)$$

gdzie:

P – współczynnik podziału,

C_{okt} – stężenie związku aktywnego w fazie oktanolowej,

C_{aq} – stężenie w fazie wodnej.

Lipofilowość jest najważniejszym czynnikiem determinującym zachowanie się substancji chemicznej w kontakcie ze skórą. Ma istotne znaczenie dla procesów jego dystrybucji w organizmie, szczególnie wpływa na stopień jego penetracji przez lipofilowe błony komórkowe i wchłaniania do krwiobiegu. Bogate w lipidy błony komórkowe są łatwo penetrowane przez substancje lipofilowe, charakteryzujące się wysokim współczynnikiem podziału oktanol/woda [11, 12].

Hydrofilowe substancje (związki o budowie jonowej, aminokwasy, rozpuszczalne w wodzie witaminy), o małej wartości logP, nie wykazują rozpuszczalności w lipidach i w niewielki stopniu są zdolne do pokonania lipofilowej bariery jaką jest rogowa warstwa naskórka [4, 12]. W przypadku tego typu związków, często

w celu zwiększenia możliwości ich transportu do skóry, stosuje się kapsułkowanie, np. zamykanie w pęcherzykach liposomowych, których błony zbudowane są z fosfolipidów.

4. PODŁOŻE DLA SUBSTANCJI AKTYWNEJ

Oprócz właściwości fizykochemicznych substancji aktywnej, podstawę skutecznie działającego preparatu kosmetycznego stanowi dobrze zaprojektowane podłoże, które może wpływać na wzrost aktywności substancji czynnej lub ją dezaktywować. Należy unikać sytuacji, w których substancja czynna kosmetyku ma zbyt duże powinowactwo do składników bazy, co nie pozwoli na uwolnienie jej do skóry. Oprócz składu również forma fizykochemiczna podłoża nie pozostaje bez wpływu na efektywność działania kosmetyku.

4.1. FORMA FIZYKOCHEMICZNA PODŁOŻA A TRANSPORT PRZEZNASKÓRKOWY

Substancję aktywną można nanosić na skórę w różnych układach fizykochemicznych. Do najbardziej popularnych form nośników substancji czynnych zalicza się emulsje. Za ich pomocą można osiągnąć homogeniczny układ wielu niemieszających się składników, takich jak węglowodory, tłuszcze, woski, substancje zapachowe, woda i substancje hydrofilowe. Dzięki temu można wprowadzić do jednego układu zarówno rozpuszczalne w tłuszczach związki lipofilowe, jak i rozpuszczalne w wodzie surowce biologicznie aktywne o charakterze polarnym.

W zależności od stopnia dyspersji wyróżnia się:

- makroemulsje – emulsje klasyczne, układy o wielkości zdyspergowanych cząstek większej od 500 nm,
- mikroemulsje – średnica cząstek rozproszonych wynosi w tych układach mniej niż 500 nm,
- nanoemulsje – najnowsza klasa emulsji, o ekstremalnie małych rozmiarach kropelek fazy rozproszonej rzędu 20–200 nm.

Makroemulsje są układami dyspersyjnym o małej stabilności termodynamicznej. W odróżnieniu od nich, mikroemulsje tworzą się spontanicznie, co wymaga minimalnej energii tworzenia i są układami termodynamicznie stabilnymi o niskiej lepkości. Charakteryzuje je izotropia optyczna. W ich tworzeniu dużą rolę odgrywają kosurfaktanty, które pomagają emulgatorowi w stabilizowaniu całego układu [20, 21].

Nanoemulsje określane są terminem miniemulsji lub submikroemulsji. Cząstki nanoemulsji są zbyt małe by rozpraszać światło widzialne, co sprawia, że są układami optycznie przezroczystymi lub półprzezroczystymi. W przeciwieństwie do mikroemulsji charakteryzuje je jedynie stabilność kinetyczna [14–19].

W Tabeli 3 przedstawiono właściwości układów emulsyjnych.

Tabela 3. Zestawienie właściwości charakteryzujących układy emulsyjne
Table 3. Comparison properties of emulsions

Właściwości	Emulsje	Mikroemulsje	Nanoemulsje
Wygląd	mleczne	mleczne/transparentne	transparentne
Termodynamiczna stabilność	niestabilne	stabilne	niestabilne, kinetyczna stabilność
Powstawanie	wkład energii	spontanicznie	metody nisko- i wysoko-energetyczne
Napięcie międzyfazowe	$\sim 50 \text{ mN m}^{-1}$	ok. 0 mN m^{-1}	–
Izotropia optyczna	nie	tak	tak
Rozmiar cząstek	$> 500 \text{ nm}$	$< 500 \text{ nm}$	20–200 nm

Kluczową rolę w tworzeniu i stabilizacji układu emulsyjnego pełni emulgator. Zgodnie z regułą Bancrofta typ tworzonej emulsji prostej zależy głównie od właściwości emulgatora. Rozpuszczalne w wodzie emulgatory wykazują tendencję do tworzenia emulsji typu O/W, podczas gdy emulgatory rozpuszczalne w oleju wykazują skłonność do tworzenia emulsji typu W/O [17, 21]. Praktyczne zastosowanie emulgatorów wymaga znajomości wielkości udziału części hydrofilowej i lipofilowej w surfaktancie. Miarą tego udziału jest współczynnik równowagi hydrofilowo-lipofilowej HLB [21, 48].

Śród surfaktantów stosowanych do stabilizacji emulsji kosmetycznych preferowane są emulgatory niejonowe. Dużą popularnością cieszą się estry tłuszczowe sorbitanu (Spany), polioksyetylenowane estry sorbitanu (Tweeny), oksyetylenowane alkohole i kwasy tłuszczowe oraz oksyetylenowane estry glicerolu. Ostatnio coraz większą popularnością, ze względu na ich dobrą biokompatybilność (biogodność) oraz korzystne właściwości ekotoksikologiczne, cieszą się emulgatory stanowiące pochodne surowców naturalnych, głównie poliglikozydy alkilowe oraz estry sacharozy [20]. Do tworzenia i stabilizowania mikroemulsji stosunkowo często stosowane są także fosfolipidy. Jako kosurfaktanty, zwiększające skuteczność emulgatorów, stosuje się alkohole: etanol, izopropanol, butanol, glikol propylenowy i oktanodiol. Substancje te ułatwiają powstawanie mikroemulsji, regulują bilans hydrofilowo-hydrofobowy oraz wpływają na zwiększenie stabilności całego układu. Najczęściej stosowanymi komponentami lipofilowymi emulsji sporządzanych w celach badawczych są: mirystynian izopropylu (IPM), palmitynian izopropylu (IPP), kwas oleinowy oraz średniołańcuchowe triglicerydy (MCT) [4, 16, 17, 20].

4.1.1. Wpływ stopnia rozdrobnienia emulsji

Wielu autorów w swoich pracach zajmuje się porównaniem efektywności różnych baz, jako nośników substancji aktywnych.

Ziegenmeyer i Fuehrer badali wpływ bazy na penetrację przez skórę chlorowodoru tetracykliny. Porównywano makroemulsje, żel oraz mikroemulsję typu O/W. We wszystkich przypadkach zawartość fazy wodnej (woda) i fazy olejowej (dodekanu) była stała. Poszczególne produkty różniły się natomiast stężeniem kosurfaktanta (dekanolu) oraz emulgatora (Brij 35 – oksyetylenowany 35 molami tlenu etylenu alkohol laurylowy). Badania dowiodły zwiększenie transportu leku przez skórę za pomocą mikroemulsji [22].

Lin i współautorzy badali metodą *in vitro* szybkość transportu przezskórnego alkoholu cetylowego. W skład badanych emulsji wchodziły ponadto: woda, olej silykonowy a jako emulgatory oksyetylenowane estry sorbitanu. Określano ilościowo szybkość i głębokość penetracji skóry. Uzyskane wyniki wykazały, że forma fizykochemiczna emulsji bazowej w istotny sposób wpływa na szybkość przenikania przez skórę. Alkohol cetylowy był dostarczany do skóry przynajmniej dwa razy szybciej z mikroemulsji niż miało to miejsce w przypadku zastosowania, jako bazy makroemulsji (kremu i mlecza) [23].

Również Paolino i współautorzy [24] potwierdzili, że mikroemulsja O/W w porównaniu z makroemulsją czy żelem, stanowi bardziej efektywny sposób wprowadzania składnika aktywnego (ketoprofenu) do skóry. Do otrzymania żelu zastosowano wodę, etanol, trietanolaminę i Carbopol 934 jako składnik żelujący. W skład badanych emulsji wchodziły triglicerydy kaprylowe i kaprynowe jako faza olejowa, lecytyna jako emulgator, *n*-butanol pełniący rolę kosurfaktanta oraz woda. Dodatkowo jedna z mikroemulsji zawierała w swym składzie kwas oleinowy, który pełnił rolę promotora przenikania. Przenikanie związku aktywnego badano metodą *in vitro*, umieszczając fragment ludzkiej skóry w komorze Franza. Autorzy badań zaobserwowali najlepszy stopień przenikania związku aktywnego z mikroemulsji. Ponadto zauważono, że obecność kwasu oleinowego nieznacznie tylko zwiększyła przenikanie ketoprofenu przez skórę, mimo iż związek ten jest jednym z najefektywniej działających promotorów przezskórnego transportu dla większości substancji czynnych. Przypuszczano, iż działanie kwasu oleinowego może być maskowane przez fosfolipidy wchodzące w skład lecytyny, o podobnym właściwościach wzmacniania przezskórnej absorpcji związków aktywnych. Inna postawiona przez autorów badań hipoteza zakładała, że kwas oleinowy mógł być zbyt silnie związany ze strukturą mikroemulsji, co utrudniałoby jego oddziaływanie na struktury lipidów w warstwach naskórka.

W innej pracy [25] porównywano szybkość transportu przezskórnego δ tokofolu z mikroemulsji i nanoemulsji. W skład sporządzonych układów emulsyjnych wchodziła woda, olej rzepakowy jako faza olejowa oraz Polysorbat 80 (polioksyetylenowany monooleinian sorbitanu) jako emulgator. Jedyna różnica pomiędzy badanymi preparatami polegała na metodyce ich sporządzania, nanoemulsje wykonywano za pomocą homogenizatora fluidyzacyjnego, natomiast do otrzymania mikroemulsji zastosowano mieszałdo magnetyczne. Wielkość cząstek fazy zdyspergowanej w przypadku nanoemulsji wynosiła 65 nm.

Badania prowadzono na grupie chomików syryjskich. Dwie godziny po aplikacji nanoemulsji zaobserwowano 36-krotny wzrost δ tokoferolu w skórze chomików. Stosując mikroemulsję jako bazę badanych preparatów uzyskano tylko 9-krotny wzrost stężenia witaminy E w skórze gryzoni. 3 godziny po aplikacji dla nanoemulsji wzrost był już 68-krotny, podczas gdy dla mikroemulsji stężenie tokoferolu w skórze chomików wzrosło jedynie 11-krotnie. W badaniach nie zastosowano promotorów przenikania w celu wykazania bezpośredniej zależności pomiędzy stopniem rozdrobnienia fazy wewnętrznej emulsji, stanowiącej bazę dla składnika aktywnego, a szybkością wnikania substancji czynnej do skóry. Wyniki badań potwierdziły, że nanoemulsje stanowią formę fizykochemiczną, która powoduje znaczący wzrost dostępności δ tokoferolu w transdermalnej aplikacji. Nanoemulsje typu O/W solubilizują słabo rozpuszczalny w wodzie składnik aktywny, dzięki temu możliwy jest jego transport do żywych warstw skóry, gdzie zostaje uwolniony.

Przedmiotem badań zespołu Frelichowskiej była rola emulsji typu „Pickering” w transporcie leków lipofilowych [26]. Porównano klasyczną emulsję (CE) stabilizowaną emulgatorem (Polysorbat 85, polioksyetylenowany trioleinian sorbitanu) z emulsją typu „Pickering” (PE) stabilizowaną przez cząstki stałe, w tym przypadku cząstki krzemionki. Za model lipofilowego składnika aktywnego posłużył retinol. Badania przeprowadzono metodą *in vitro*, na skórze świni w komorze Franza. Badane preparaty były emulsjami typu O/W, o identycznym składzie, stopniu rozdrobnienia fazy wewnętrznej oraz lepkości. Penetracja retinolu z obu emulsji CE i PE była 5-krotnie większa niż z roztworu retinolu w triglicerydach. Ponadto szybkość przenikania retinolu do wewnętrznych warstw skóry zdecydowanie zależała od rodzaju emulsji. W przypadku klasycznej emulsji obserwowano powolną dyfuzję retinolu przez naskórek do skóry właściwej, podczas gdy aplikowana w emulsji PE witamina A kumulowała się w *stratum corneum*. Autorzy badań próbowali tłumaczyć to zjawisko różnicami związanymi z odmiennym zachowaniem cząstek emulsji klasycznej i emulsji Pickering w macierzy lipidowej SC.

4.1.2 Wpływ składu fazy olejowej

Oprócz fizykochemicznej formy produktu, na efektywnością działania kosmetyków wpływa skład bazy woskowo-tłuszczowej. Dobór fazy olejowej zależy głównie od jej zdolności solubilizacyjnych w stosunku do składnika aktywnego oraz dodatkowych właściwości wzmacniających jego dyfuzję, tak jak w przypadku kwasu oleinowego.

Malcolmson wraz ze współautorami wykazali [27], że istotny wpływ na efektywność mikroemulsji typu O/W w dostarczaniu składnika aktywnego w głąb skóry ma ilość zdyspergowanej fazy hydrofobowej oraz rozpuszczalność substancji czynnej w tej fazie. Kilka słabo rozpuszczalnych leków steroidowych zostało umieszczonych w mikroemulsjach oraz roztworach micelarnych. Wszystkie preparaty zawierały prosty skład bazy emulsyjnej: wodę, olej sojowy oraz Brij 96 (oksyetylenowany

10 molami tlenu etylenu alkohol oleinowy), jako emulgator. Porównano rozpuszczalność silnie lipofilowego leku w hydrofobowej fazie wewnętrznej mikroemulsji i roztworach micelarnych pozbawionych oleju. Na podstawie przeprowadzonych badań autorzy wnioskowali, że wraz ze wzrostem rozpuszczalności sterydu w oleju sojowym zwiększa się zdolność dostarczania związku aktywnego za pomocą mikroemulsji do skóry.

Rhee wraz z zespołem [28] badali zależność pomiędzy składem mikroemulsji, która miała stanowić nośnik dla ketoprofenu a szybkością jego przenikania przez skórę. Szczególnie uwagę zwrócono na zależność pomiędzy rodzajem i stężeniem zastosowanego surfaktanta oraz składem fazy olejowej, a transportem transdermalnym ketoprofenu. Badania prowadzono dla mikroemulsji typu O/W. W ich skład wchodziła woda, kwas oleinowy jako faza olejowa oraz mieszanina emulgatorów: polioksyetylenowany (8) ester kaprylowy glikolu propylenowanego i uwodorniony olej rycynowy etoksyłowany 40 molami tlenu etylenu. Oprócz kwasu oleinowego jako fazę olejową testowano różne rodzaje olejów roślinnych (olej bawełniany, olej kukurydziany, olej sezamowy, oliwę z oliwek), a także olej parafinowy, skwalen, mirystynian izopropylu, triacetyna (trioctan gliceryny) oraz Myvacet (acetylowane monoglicerydy). Wszystkie badane substancje wykazywały zdolności solubilizujące względem związku aktywnego. Następnie wykonywano emulsje zawierające oleje, w których ketoprofen rozpuszczał się najlepiej (Triacetyna, Myvacet, kwas oleinowy, IPM), po czym zbadano szybkość przenikania substancji czynnej przez fragment skóry szczura umieszczonej w komorze dyfuzyjnej Franza. Ostatecznie na fazę olejową wybrano kwas oleinowy, ponieważ stosując mikroemulsje, w skład których wchodził, obserwowano największy stopień przenikania związku aktywnego przez skórę. Autorzy tłumaczyli, że efekt ten może być związany z właściwościami kwasu oleinowego, który jest znany, jako znakomity promotor przenikania dla hydrofobowych substancji czynnych. Prawdopodobnie mechanizm jego działania polega na rozluźnieniu struktury układu laminarnego macierzy lipidowej poprzez oddziaływanie na hydrofobowe łańcuchy lipidów.

Podobne wnioski wysnuł inny zespół badawczy [29], który pracował nad optymalną recepturą dla przezskórnego transportu meloksykamu. W badaniach zastosowano mikroemulsje typu O/W zawierające 0,375% meloksykamu. Jako składniki fazy olejowej stosowano różne substancje hydrofobowe (kwas oleinowy, oleinian etylu, mirystynian izopropylu, oleinian etylu, mirystynian izopropylu) oraz różne związki powierzchniowo czynne (polioksyetylenowany monooleinian sorbitanu, polioksyetylenowany monolaurynian sorbitanu, polioksyetylenowany triooleinian sorbitanu, olej rycynowy etoksyłowany 35 molami tlenu etylenu, polioksyetylenowany (8) ester kaprylowy glikolu propylenowanego). Badania potwierdziły bardzo dobre właściwości solubilizacyjne kwasu oleinowego względem meloksykamu, tak jak to miało miejsce w przypadku ketoprofenu [28]. Jednocześnie okazało się, że badany związek aktywny najlepiej rozpuszczał się w jednym z emulgatorów, polioksyetylenowanym triooleinianie sorbitanu.

Mimo, iż kwas oleinowy charakteryzował się najwyższą rozpuszczalnością meloksykamu, na fazę olejową wybrano mirystynian izopropylu ze względu na HLB tego oleju (11.1) zbliżone do HLB emulgatora (11.0). Jako kosurfaktant stosowano etanol ze względu na właściwości wzmacniające transport przeznaskórkowy wielu związków aktywnych oraz wpływ na stabilizację mikroemulsji. Formuła z najwyższym wskaźnikiem przenikalności przez skórę składała się z 0,375% meloksykamu, 5% IPM, 50% Tween 85/etanol (1:1) i wody. Tradycyjna droga wprowadzania lipofilowych składników aktywnych do bazy polegała na rozpuszczeniu ich w fazie olejowej. Metodę taką stosowano w przypadku tryptolidyny [30], aceklofenaku [31] i soli dietyloaminowej diklofenaku [32]. Jednak ze względu na większą rozpuszczalność meloksykamu w emulgatorach niż w oleju zastosowano inny sposób rozpuszczania aktywnych związków hydrofobowych.

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że stopień penetracji związku aktywnego przez skórę wzrastał wraz ze zmniejszeniem zawartości oleju. Autorzy badań tłumaczyli ten efekt tym, że woda, której zawartość w mikroemulsji rosła wraz ze zmniejszeniem zawartości fazy olejowej, mogła spowodować nawodnienie *stratum corneum*, spęcznienie komórek korneocytów i w rezultacie rozszerzenia kanałów, którymi transportowane są substancje aktywne za pomocą emulsji typu O/W [29].

4.1.3. Wpływ mieszaniny surfaktant/kosurfaktant oraz jej stężenia

Bardzo duże znaczenie dla efektywności nośników w transporcie przezskórnym ma dobór kosurfaktanta, właściwe połączenie surfaktant/ kosurfaktant, oraz stężenie emulgatora i zawartość fazy wodnej w emulsji.

Jak wcześniej wspomniano Rhee i współautorzy [28] badali zależność pomiędzy rodzajem i stężeniem zastosowanego emulgatora, a transportem ketoprofenu do skóry. Formuły zawierały różne ilości (odpowiednio 80%, 55% i 30%) mieszaniny emulgatorów: polioksyetylenowany (8) ester kaprylowy glikolu propylenowanego i uwodorniony olej rycynowy etoksylogowany 40 molami tlenu etylenu. Wyniki badań potwierdziły wpływ zawartości mieszaniny surfaktantów na szybkość przenikania ketoprofenu przez skórę. Wraz ze spadkiem tej zawartości z 80 do 30% szybkość dyfuzji związku aktywnego wzrosła 12–23-krotnie. Autorzy badań zasugerowali, iż zjawisko to może być związane ze wzrostem termodynamicznej aktywności substancji czynnej w mikroemulsji o mniejszym stężeniu emulgatorów. Ketoprofen dobrze rozpuszcza się w mieszaninie surfaktantów, co może hamować jego uwalnianie z mikroemulsji. Autorzy doszli do wniosku, że każde oddziaływanie związku aktywnego z surfaktantem może spowalniać jego uwalnianie z nośnika do skóry.

Do podobnych wniosków doszli Yuan i współautorzy [29], którzy wykazali, że wraz ze zmniejszeniem zawartości surfaktanta w bazie rośnie stopień penetracji przez skórę związku aktywnego. Autorzy badań tłumaczyli to faktem, iż w mikro-

emulsjach o niższej zawartości surfaktantów rośnie aktywność termodynamiczna substancji czynnej, ponieważ zmniejsza się oddziaływanie związku aktywnego z surfaktantem, które spowalnia jego uwalnianie z nośnika do skóry.

Chen wraz z zespołem [30], badali wpływ składu mikroemulsji na szybkość przenikania przez skórę tryptolidyny. W skład sporządzonych formułacji wchodził kwas oleinowy jako faza olejowa, Tween 80 (polioksyetylenowany monooleinian sorbitanu) jako emulgator, glikol propylenowy jako kosurfaktant oraz woda. Dodatkowo, jako promotor przenikania dodano mentol. Stopień penetracji tryptolidyny oceniono metodą *in vitro*, stosując do tego celu komorę dyfuzyjną Franza, w której jako membranę umieszczono skórę myszy. Autorzy zaobserwowali znaczny wzrost transportu przezskórnego tryptolidyny z mikroemulsji, w porównaniu z przenikaniem z 20% wodnego roztworu glikolu propylenowego. Ponadto zauważono, że spośród badanych mikroemulsji, szybkość uwalniania tryptolidyny była największa w przypadku formułacji zawierającej zmniejszoną ilość mieszaniny surfaktant/kosurfaktant. Autorzy badań, podobnie jak zespół Rhee [28] tłumaczyli obserwowane zjawisko wzrostem termodynamicznej aktywności substancji czynnej wraz ze zmniejszaniem się stężenia surfaktanta i kosurfaktanta w nośniku. Termodynamiczna aktywność substancji czynnej w formułacji jest siłą napędową do uwalniania tego związku z nośnika i jego penetracji w głąb skóry.

Wpływ stężenia emulgatora na dyfuzję do skóry substancji czynnych z różnych baz (emulsji, mikroemulsji oraz systemów micelarnych) był przedmiotem badań Ktistisa [33]. W skład badanych układów emulsyjnych wchodził propranolol jako składnik aktywny, woda jako faza wodna, mirystynian izopropylu jako faza tłuszczowa oraz polioksyetylenowany monooleinian sorbitanu /sorbitol jako system surfaktant/kosurfaktant. Dla każdego z tych układów współczynnik przenikania malał wraz ze wzrostem zawartości surfaktanta.

Interesujące badania nad zależnością między strukturą związku aktywnego a jego dyfuzją do skóry prowadził zespół badawczy Hua [34]. Do sporządzenia mikroemulsji O/W mającej transportować Vinpocetine, jako mieszaninę surfaktant / kosurfaktant zastosowano Cremophor RH 40 (uwodorniony olej rycynowy etoksylogowany 40 molami tlenu etylenu) i Transcutol (eter monoetylowy glikolu dietylenowego), a ponadto kwas oleinowy jako fazę olejową oraz wodę. Zaobserwowano korelację między współczynnikiem dyfuzji substancji czynnej, lepkością preparatu i przenikaniem. Duża zawartość wody oraz zmniejszona ilość surfaktantów wpłynęły korzystnie na przenikanie. Autorzy badań tłumaczyli to wpływem stopnia hydratacji *stratum corneum* na przenikanie przezskórne oraz wzrostem termodynamicznej aktywności w badanych formułacjach związku aktywnego, charakteryzującego się słabą rozpuszczalnością w wodzie.

Delgado-Charro i współautorzy [35] badali metodą *in vitro* szybkość transportu przezskórnego sacharozy. W skład mikroemulsji będących nośnikiem hydrofilowego związku aktywnego wchodziła mieszanina emulgatorów: Labrasol (polioksyetylenowany (8) ester kaprylowy glikolu propylenowanego) i pochodne Plurolu (estry tłuszczowe poliglicerolu) ze względu na ich kompatybilność ze skórą. W skład

badanych formułacji wchodziły ponadto woda oraz oleiniany etylu jako faza olejowa. Badano szereg układów różniących się stosunkiem fazy wodnej do fazy olejowej. Autorzy badań podobnie jak inne zespoły badawcze [28, 34] zaobserwowali, że układy zawierające większą ilość wody charakteryzowały się większym efektem wzmacniającym przenikanie substancji czynnej przez skórę.

Sintov i Shapiro [36] pracowali nad układem mikroemulsyjnym mającym transportować lidokainę, w postaci chlorowodoru. W tym celu zastosowano mieszaninę emulgatorów: uwodorniony olej rycynowy etoksylogowany 40 molami tlenu etylenu (HLB = 15,0)/oleiniany glicerolu (HLB = 2,8) oraz stearynian poliglikolu etoksylogowany 40 molami tlenu etylenu (HLB = 16,9) /oleiniany glicerolu. Okazało się, iż preparaty zawierające etoksylogowany stearynian poliglikolu stanowiły bardziej efektywną bazę do transportu przezskórnego hydrofilowej substancji aktywnej.

Badania zespołu Maghraby'ego [37] dotyczyły wpływu kosurfaktantów na zdolności transportujące mikroemulsji względem hydrokortyzonu. Etanol, izopropanol i glikol propylenowy były stosowane w wcześniejszych badaniach, jako kosurfaktanty [30, 38, 39]. Glikol propylenowy wchodził w skład mikroemulsji transportujących ibuprofen i tryptolidynę [30, 39]. Etanol i propanol były stosowane w mikroemulsjach będących nośnikiem estradiolu [38]. Autorzy badań zaobserwowali, że etanol zwiększał rozpuszczalność związku aktywnego w mikroemulsji, co powodowało wzrost gradientu stężeń, głównej siły napędowej procesu transportu przezskórnego. Wywnioskowano, że wzrost rozpuszczalności lipofilowego związku aktywnego w nośniku jest głównym czynnikiem powodującym wzrost dyfuzji tego związku do skóry. Badania te wprawdzie wykazały lepsze przenikanie leku w obecności etanolu niż izopropanolu, ale emulsje różniły się składem fazy olejowej. W przypadku izopropanolu, jako fazę olejową zastosowano mirystyniany izopropylu, natomiast w przypadku etanolu rolę tę spełniał kwas oleinowy, który wykazuje właściwości wzmacniające przezskórną absorpcję.

Zespół Maghraby'ego zbadał działanie tych trzech kosurfaktantów (etanolu, izopropanolu i glikolu propylenowego) w mikroemulsjach o takim samym składzie. Formułacje zawierały 20% fazy olejowej, 20% fazy wodnej i 60% mieszaniny surfaktant/kosurfaktant. Autorzy badań jako fazę olejową zastosowali olej z eukaliptusa ze względu na dobre właściwości solubilizujące steroidowe związki aktywne zbliżone budową do hydrokortyzonu [40] oraz Tween 80 jako emulgator. Stwierdzono, że stopień uwolnienia substancji aktywnej do skóry znacząco wzrastał w obecności kosurfaktantów, szczególnie w obecności etanolu. Autorzy badań tłumaczyli to faktem, iż kosurfaktanty przyczyniają się do zmniejszenia napięcia międzyfazowego na granicy faz, a więc do zwiększenia powierzchni kontaktu międzyfazowego i redukcji rozmiaru cząstek mikroemulsji. Dzięki temu wrosła powierzchnia kontaktu nośnika ze skórą, co z kolei wpływało na zwiększenie transportu substancji aktywnej przez skórę.

4.2. PROMOTORY TRANSPORTU PRZEZSKÓRNEGO

W wielu pracach autorzy podkreślają, że bardzo istotnym elementem preparatu kosmetycznego lub farmaceutycznego, wpływającym na efektywność jego działania są tzw. promotory transportu przezskórnego. Pod tym pojęciem rozumiane są związki chemiczne zdolne do odwracalnego przekształcania struktury układu laminarnego macierzy lipidowej naskórka, dzięki czemu mogą ułatwiać lub przyspieszać dyfuzję innych cząstek przez *stratum corneum*. Najczęściej stosowanymi promotorami sorpcji są: alkohole i kwasy tłuszczowe oraz ich estry (np. alkohol i kwas olejowy, mirystynian izopropylu, palmitynian izopropylu), alkohole (glikol propylenowy, izopropanol, etanol), mocznik, terpeny oraz ich pochodne [41–45]. Promotory lipofilowe działają na hydrofobowe łańcuchy lipidów, natomiast promotory hydrofilowe i amfifilowe oddziałują z grupami hydrofilowymi lipidów cementu międzykomórkowego. W efekcie dochodzi do rozluźnienia struktury warstwowej lipidów naskórka, zwiększenia jej płynności i w konsekwencji do wzrostu stopnia dyfuzji substancji aktywnej w głąb skóry. Jednak lipidy cementu międzykomórkowy to nie jedyne miejsce, na które mogą w naskórku oddziaływać promotory sorpcji. Główny obszar warstwy rogowej naskórka jest zbudowany z korneocytów, komórek zbudowanych przede wszystkim z keratyna oraz niewielkiej ilości innych protein, hydrofilowych związków niskocząsteczkowych i wody [3]. Substancje hydrofilowe zwiększające penetrację składników aktywnych mogą działać wewnątrzkomórkowo i na proteiny korneocytów, głównie poprzez oddziaływanie z polarnymi grupami α -keratyny. Prawdopodobnie prowadzi to do powstania systemu mikroporów, przez które może zachodzić transport związków drogą hydrofilową [4]. Poza wnętrzem korneocytów, także w ciekłokrystalicznej strukturze cementu międzykomórkowego znajdują się nierównomiernie rozłożone obszary wodne. Woda jest w nich utrzymywana dzięki oddziaływaniom ze związkami silnie hydrofilowymi takimi jak składniki NMF-u oraz polarnymi fragmentami peptydów i lipidów cementu [3]. W tym przypadku rola hydrofilowych promotorów takich jak gliceryna, polega na penetracji do wodnych przestrzeni cementu międzykomórkowego i zwiększeniu ich powierzchni dzięki swojej higroskopijności [11]. Odpowiednio dobrany do receptury promotor sorpcji może zatem mieć znaczący wpływ na wzrost dyfuzji substancji czynnej przez skórę.

Kantaraci wraz z zespołem [46] badali wpływ glikolu propylenowego i DMSO (sulfolenenek dimetylu) na zwiększenie stopnia penetracji soli sodowej diclofenaku przez skórę. Sporządzono dwie mikroemulsje składające się z oleju sojowego, wody i mieszaniny emulgatorów: Brij 58 (oksyetylenowany 20 molami tlenu etylenu alkohol cetylowy) / Span 80 (monooleinian sorbitanu). Rolę kosurfaktantów spełniały propanol lub izopropanol, których działanie badano w połączeniach z glikolem propylenowym i DMSO pełniącymi funkcję promotorów sorpcji. Badanie przenikania przez skórę królika przeprowadzono w komorze Franza. Zaobserwowano, że oba układy powodowały wzrost dyfuzji przez skórę badanego związku aktywnego, przy czym glikol propylenowy wykazuje silniejszy wpływ na przenikanie

w połączeniu z izopropanolem, podczas gdy DMSO jest bardziej efektywny w połączeniu z propanolem.

Schmalfuss i współautorzy [47] (1996) badali przenikanie hydrofilowej substancji aktywnej (chlorowodoru difenhydraminy), dla której nośnikiem były mikroemulsje typu W/O. W skład bazy emulsyjnej wchodził mirystynian izopropylu jako faza olejowa, woda oraz mieszanina emulgatorów Tween 80 (polioksyetylenowany monooleinian sorbitanu) i Span 20 (monolaurynian sorbitanu). W pracy porównano cholesterol i kwas oleinowy jako promotory sorpcji. Zaobserwowano, że w przypadku substancji aktywnych o charakterze hydrofilowym, jedynie cholesterol wykazywał efekt wzmacniania penetracji związku. Autorzy badań tłumaczyli to zjawisko rozluźnieniem struktury dwuwarstwy lipidowej *stratum corneum* poprzez wbudowanie pomiędzy ceramidy dużych cząsteczek cholesterolu. Prawdopodobnie ułatwia to polarnym grupom ceramidów kontakt z wodnymi obszarami cementu międzykomórkowego, a przez to zwiększeniu ulega powierzchnia obszarów hydrofilowych. Dzięki temu zjawisku możliwy jest transport hydrofilowych związków przez skórę. Natomiast kwas oleinowy wbudowując się pomiędzy ceramidy mógł spajać jeszcze mocniej ich lipofilowe fragmenty, przez co nie przyczynił się do wzmocnienia transportu hydrofilowej difenhydraminy przez naskórek.

PODSUMOWANIE

Czynniki wpływające na transport przeznaskórkowy aktywnych składników kosmetycznych i farmaceutycznych związane są zarówno z właściwościami fizykochemicznymi samego składnika aktywnego (masą cząsteczkową, polarnością, liofilowością) jak również z formą fizykochemiczną bazy kosmetyku czy obecnością w recepturze, tzw. promotorów przejścia, czyli substancji ułatwiających przenikanie składników kosmetyku przez skórę.

Dobrze zaprojektowane podłoże, w którym składniki są dobrane i połączone w sposób prawidłowy, stanowi podstawę skutecznie działającego preparatu kosmetycznego. Baza kosmetyku czy farmaceutyku może wpływać na wzrost aktywności substancji czynnej. Większość opisanych w literaturze badań przeprowadza się pod kątem optymalizacji składu nośników, w celu zwiększenia przenikania składników aktywnych przez skórę. Jak dowodzą badania przeprowadzone z zastosowaniem mikroemulsji, dobór fazy olejowej zależy głównie od zdolności solubilizacyjnych w stosunku do składnika aktywnego oraz dodatkowych właściwości wzmacniających jego penetrację przez skórę.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] Z. D. Draeos, J.S. Dover, *Kosmeceutyki*, Elsevier Urban & Partner, Wrocław 2006.
- [2] J. Arct, *Wiadomości PTK*, 2001, **3/4**, 11.
- [3] J. Arct, S. Majewski, K. Pytkowska, *Kosmetyczne zastosowanie witamin A i E, Pielęgnacja i suplementacja*, Wyższa Szkoła Zawodowa Kosmetyki i Pielęgnacji Zdrowia w Warszawie, 2008.
- [4] M. Sznitowska: „Polarna droga dyfuzji leku przez skórę – dowody na istnienie i próby charakterystyki, Rozprawa habilitacyjna”, Katedra i Zakład Farmacji Stosowanej, Gdańsk 1996.
- [5] N. Dayan, *Cosmetic&Toiletries*, 2005, **6**, 67.
- [6] B.W.Barry, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2001, **14**, 101.
- [7] G.M. El Maghraby, B.W. Barry, A.C. Williams, *European Journal of Pharmaceutical Science*, 2008, **34**, 203.
- [8] A. Ghanem, H. Mahmoud, W.I. Higuchi, U.D. Rohr, S. Borsadia, P. Liu, J.L. Fox., W.R. Good, [w:] *Advances in Drug Delivery Systems 3*, Elsevier, Amsterdam 1987.
- [9] J. Hadgraft, *International Journal of Pharmaceutic*, 2001, **224**, 1.
- [10] A.Otto, J. du Plessis, J.W. Wiechers, *International Journal of Cosmetics Science*, 2009, **31**, 1.
- [11] J. Arct, M. Chełkowska, *Wiadomości PTK*, 2001, **3/4**, 37.
- [12] E. Starzyk, J. Arct, *Wiadomości PTK*, 2003, **3**, 12.
- [13] K. Pigoń, Z. Ruziewicz, *Chemia fizyczna*, PWN, Warszawa 2007.
- [14] P. Somasundaran, S. Chakraborty, N. Deo, T. Somasundran, *Cosmetics&Toiletries*, 2006, **12**, 47.
- [15] S.C. Kothekar, J.T. Waghmare, S.A. Momin, *Cosmetics&Toiletries*, 2006, **7**, 51.
- [16] N. Usón, M.J. Garcia, C. Solans, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 2004, **250**, 415.
- [17] N. Sadurni, C.Solans, N. Azemar, M.J. Garcia-Celma, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2005, **26**, 438.
- [18] T. Tadros, P. Izquierdo, J. Esquena, C. Solans, *Advances in Colloid and Interface Science*, 2004, **108–109**, 303.
- [19] K. Bouchemal, S. Briancon, E. Perrier, H.Fessi, *International Journal of Pharmaceutics*, 2004, **280**, 241.
- [20] S. Heuschkel, A. Goebel, R. Neubert., *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2008, **2**, 603.
- [21] R. Zieliński, *Surfaktanty. Towaroznawcze i ekologiczne aspekty ich stosowania*, Wyd. Akademii Ekonomicznej w Poznaniu, Poznań 2000.
- [22] J. Ziegenmeyer, C. Fuehrer, *Acta Pharm Technol*, 1980, **26**, 273.
- [23] E.E. Linn., R.C. Pohland, T.K. Byrd, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 1990, **16**, 899.
- [24] D. Paolino, C.A. Ventura., S. Nistico, G. Puglisi., M. Fresta, *International Journal of Pharmaceutics*, 2002, **244**, 21.
- [25] T. Kotyla, F. Kuo F., V. Moolchandani., T. Wilson, R. Nicolosi, *International Journal of Pharmaceutics*, 2008, **347**, 144.
- [26] J. Frelichowska, M-A. Bolzinger, J. Pelletier, J.-P. Valour., Y. Chevalier, *International Journal of Pharmaceutics*, 2009, **371**, 56.
- [27] C. Malcolmson, M.J. Lawrence, *J. Pharm. Pharmacol.*, 1993, **45**, 141.
- [28] Y.-S. Rhee, J.-G. Choi, E.-S. Park, S.-C. Chi, *International Journal of Pharmaceutics*, 2001, **228**, 161.
- [29] Y. Yuan, S. Li, F. Mo, D. Zhong, *International journal of Pharmaceutics*, 2006, **321**, 117.
- [30] H. Chen, X. Chang, T. Weng, X. Zhao, Z. Gao., Y. Yang, H. Xu, X. Yang, *Journal of Controlled Release*, 2004, **98**, 427.
- [31] J. Lee, Y. Lee, J. Kim, M. Yoon, Y.M. Choi, *Arch. Pharm. Res.*, 2005, **9**, 1079.
- [32] L. Djordjevic, M. Primorac, M. Stupar., D. Krajisnik., *Int. J. Pharm.*, 2004, **271**, 11.

- [33] G. Ktistis, I. Niopas, *J. Pharm. Pharmacol.*, 1998, **50**, 413.
- [34] L. Hua, P. Weisan, L. Jiayu, Z. Ying, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 2004, **30**, 657.
- [35] M.B. Delgado-Charro, G. Iglesias-Vilas, J. Blanco-Mendez., M.A. Lopez-Quintela, J.P. Marty, R.H.Guy, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 1997, **43**, 37.
- [36] A.C. Sintov, L. Shapiro, *Journal of Controlled Release*, 2004, **95**, 173.
- [37] G.M. El Maghraby, *International Journal of Pharmaceutics*, 2008, **355**, 285.
- [38] S. Peltola, P. Saarinen-Savolainen., J. Kiesvaara, T.M. Suhonen., A.Urtii, *International Journal of Pharmaceutics*, 2003, **254**, 99.
- [39] H. Chen, X. Chang, D. Du, J. Li, H. Xu, Z. Yang, *International Journal of Pharmaceutics*, 2006, **315**, 52.
- [40] B. Biruss, H. Kahling, C.Valenta, *International Journal of Pharmaceutics*, 2007, **328**, 142.
- [41] B.W. Barry, [w:] *Advances in Drug Delivery Systems*, 3, Elsevier., Amsterdam 1987.
- [42] B.W. Barry, [w:] *Drug Delivery System*, Chichester, 1987.
- [43] L. Zaprutko, D. Partyka, B. Bednarczyk-Cwynar, *Wiadomości PTK*, 2003, **3**, 20.
- [44] W.W. Ting, C.D. Vest, R.D. Sontheimer, *International Journal of Dermatology*, 2004, **43**, 538.
- [45] K. Moser, K. Kriwet, A. Naik, Y.N. Kalia, R.H. Guy, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2001, **52**, 103.
- [46] G. Kantaraci, I. Ozgungey, H.Y. Karasulu, T. Guneri, G. Basdemir, *Drug Dev. Res.*, 2005, **65**, 17.
- [47] U. Shmalfuss, R. Neubert, W. Wohlrab, *Journal of Controlled Release*, 1997, **46**, 279.
- [48] J. Ogonowski, A. Tomaszkiwicz-Potępa, *Związki powierzchniowo czynne*, Wyd. PK, Kraków 1999.

Praca wpłynęła do Redakcji 7 kwietnia 2011

FELIETON NAUKOWY



OKRUCHY XXI.
O ŻYCIU I PRACACH
RUDOLFA HERMANA GÜNSBERGA (1827–1879)

Ignazy Z. Siemion

*Wydział Chemii, Uniwersytet Wrocławski
ul. F. Joliot-Curie 14, 50-383 Wrocław*



Ignacy Z. Siemion, urodzony w 1932 r., ukończył studia chemiczne na Uniwersytecie Moskiewskim w 1955 r. Doktorat nauk technicznych na Politechnice Wrocławskiej – 1964. Doktor habilitowany nauk chemicznych – 1968. Profesor nadzwyczajny – 1974, profesor zwyczajny – 1981. Był kierownikiem Zakładu Chemii Organicznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego. Własne zainteresowania badawcze: chemia i stereochemia peptydów i białek. Wypromował 23 doktorów chemii, z których czworo się habilitowało. Autor 9 książek, 275 prac oryginalnych i ponad 120 artykułów przeglądowych oraz dotyczących historii nauki. W latach 1983–1994 Redaktor Naczelny „Wiadomości Chemicznych”. Obecnie opiekun Gabinetu Historii Chemii Wydziału Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego.

Dzisiaj, w dobie poczty elektronicznej i Internetu, nigdy nie wiemy do kogo trafią nasze słowa. W LIX tomie „Wiadomości Chemicznych” zamieściłem notatkę o „dwóch duszach” Ludwika Bruneta, krakowskiego fizyko-chemika, a zarazem pisarza i krytyka literackiego [1]. Niedługo po tym odezwał się żyjący we Francji stryjeczny prawnik uczonego, emerytowany profesor neurobiologii, Jan Brunet, prosząc o przysłanie mu tego materiału. Oczywiście uczyniłem to bez zwłoki. Nieco później odezwał się praprawnuk lwowskiego profesora technologii chemicznej, Rudolfa Günsberga. Wzmiankowałem o nim w mojej książce o chemikach – Polakach doby zaborów [2]. Odległy potomek znalazł tę wzmiankę o swoim przodku i prosił o materiały o nim. Najpoważniejszym materiałem, jakim wtedy dysponowałem, były fragmenty wspomnień Bolesława Limanowskiego, historyka i socjologa, działacza niepodległościowego i współtwórcy Polskiej Partii Socjalistycznej. Na początku lat siedemdziesiątych XIX wieku los rzucił go do Lwowa i blisko zetknął z Günsbergiem. Ale wróćmy do korespondencji z jego potomkiem. I tak, 18 października 2008. pisał on do mnie co następuje:

„Dear Mr. Siemion,

I read in Your book „About the Polish chemists of the annexation period” published in 1995 that you wrote on page 166 about Professor Rudolf Herman Günsberg (1827–1879). I’m trying to find more information about him as due to the war my family’s knowledge of him is very limited. You mentioned in your book that Radziszewski has written a short biography of him and that also W. Zajączkowski wrote about him in the history of Technical University, Do You have any advice for me how to get hold of this information or any other way how to find more about Robert Günsberg?

I would be very gratefull

With Kind Rerards Patrick Günsberg, Helsinki, Findland”

Oczywiście wysłałem do Helsinek wszystko co miałem. Mój korespondent odezwał się po jakimś czasie jeszcze raz, 15 lipca 2010. Pisał wtedy:

„Dear Profesosr Siemion.

Last fall You sent me very valuable information on my great great grandfather Rudolf Günsberg (1827–1879), I would be really eager to find out more about him.

It is possible that archives of Lwow University of Technology – that would contain information on Rudolf Günsberg – were moved to Wrocław in the first half of the 20th century? Is there any chance of finding more information on Rudolf Günsberg, like a picture of portrait? Or it is hopeless effort, as the I can imagine that the I world war and the II world war have taken their toll of many old papers, etc.?

I’m sorry to bother You with this, and I can uderstand that You are very busy with your other duties, but if You could give me any advice of there’s anything I could do myself to find more information? I would be so gratefull!

Respectfully, Patrick Günsberg”

Niestety, tym razem nie mogłem już pomóc mojemu korespondentowi. Nie miałem ani portretu uczonego, ani dostępu do archiwum Politechniki Lwowskiej. Myślę jednak, że warto tu przytoczyć fragment wspomnień Limanowskiego, dotyczący Günsberga.

„Jesienią 1871 roku – pisał Limanowski – dostałem zajęcie u Rudolfa Günsberga, profesora technologii Akademii Technicznej i przenieśliśmy się na mieszkanie do jego domu, znajdującego się na krańcu miasta, w pobliżu lasku Cesarskiego (Kajserwaldu). Jakkolwiek po zaprowadzeniu języka polskiego jako wykładowego w Akademii Technicznej pozwolono profesorom jeszcze przez kilka lat używać niemieckiego, to jednak Günsberg nie chciał z tego korzystać i od razu rozpoczął swoje wykłady po polsku. Właśnie miałem mu pomagać w przygotowaniu pisanym tych wykładów i uczyć czytać i pisać jego chłopca. Za to dawał mi mieszkanie i kolację. Zajęcia moje odbywały się wieczorem. Z Günsbergiem nie miałem dużo zajęcia. Sam pisał po polsku swoje wykłady, czasami tylko brakło mu słowa lub zwrot był cudzoziemski. Był on Semitą, studia wyższe odbywał w Pradze i niechętnie mówił o Czechach, domagających się własnego uniwersytetu. Ożenił się z Polką, córką bankiera Simona, który z Adamem Sapiehą w 1877 roku brał udział w planach powstańczych przeciwko Moskwie. Żona jego urodziwa, miła osoba, była patriotką i językiem domowym był polski. (...) Dzieci Günsbergów, chłopczyk i dziewczynka, były bardzo ładne. (...) Zaprzyjaźnili się ze mną i spoufalili (...) Günsberg na swoją kolację miewał kielbaski i kufel piwa i mnie do towarzystwa to samo zamawiał. Jeżeli go nie było na kolacji, to dostawałem jak wszyscy herbatę i jakieś mięsisko, zwykle pozostałe z obiadu. Dom Günsberga znajdował się niedaleko od rogatki Łyczakowskich, w jednej z bocznych ulic, na samym krańcu dotykając pól, pod kartofle i zboże uprawianych (...) Brama wjazdowa domu była ostatnia na uliczce i zwracała się już ku połom. Podwórze było obszerne i zdaje się, był tam z boku ogród warzywny. Dom stał cały wewnątrz ogrodzenia. W głównym domu mieszkali Günsbergowie. (...) Z boku, o jakieś kroków kilkanaście, bliżej do pól, była przybudówka, w której znajdowała się drewnutnia i dwa mieszkania; jedno ja zajmowałem, drugie stróż domu. (...) Jedną z moich korespondencji do „Bluszczu” poświęciłem Günsbergowi, opisując jego zasługi w sprawie rozwoju gorzelnictwa i browarnictwa w Galicji. Miały one – podług jego zapatrywań – nie tylko powiększyć produkcję samych napojów, lecz stać się pomocą w wypasaniu bydła. Żona Günsberga umarła kilka lat później. Byłem na jej pogrzebie. Uroczystość żałobna odbyła się w kościele karmelickim, była ona bowiem wyznania katolickiego. Günsberg umarł – jak mi się zdaje – już po moim wyjeździe ze Lwowa. (...)

Z jakich powodów i kiedy rozstałem się z Günsbergiem, nie przypominam sobie. Zdaje się, że Günsberg otrzymał urzędowe mieszkanie przy laboratorium chemicznym w Politechnice. Przypominam sobie bowiem, że oprowadzał mnie po laboratorium i pokazywał, jak je świetnie urządzone podług jego wskazówek. W każdym razie pozostałem z nim w dobrych stosunkach; następnie na kursach gorzelnicznych, które urządzał corocznie, wykładałem algebrę” [3].

Relacja Limanowskiego nie jest wolna od przeinaczeń, Günsberg uczęszczał na Akademię Techniczną w Wiedniu, a nie w Pradze. Inna rzecz, że nie wiemy, czy nie rozpoczął studiów w Pradze, a skończył w Wiedniu, bo i to jest możliwe. Ale wiadomością, która mnie nieco podnieciła, była tu wiadomość, że Limanowski poświęcił swemu lwowskiemu pracodawcy specjalną korespondencję do „Bluszczu”. Odnalezienie tego tekstu nie było łatwe, bo jak się okazało, redakcja czasopisma nie podpisała korespondencji nazwiskiem autora. To zresztą zrozumiałe, nazwisko Limanowskiego, przestępca politycznego z punkty widzenia władz carskich, nie mogło dobrze służyć warszawskiemu wydawnictwu. Uparte poszukiwania pani Kasi Lukjan, pracownicy Biblioteki Wydziału Chemii UW, doprowadziły jednak do uzyskania tego materiału. W istotny sposób rozszerza on naszą wiedzę o lwowskim technologu, i nie od rzeczy, będzie i ten tekst tu zaprezentować:

„Akademii Technicznej, jak już pisałem o tem, przyznano samorząd. Jednym z przywilejów tego samorządu jest to, że grono profesorów samo wybiera sobie kolegów na wakujące katedry i przedstawia rządowi do zatwierdzenia. W liczbie innych profesorów przedstawionych rządowi do zatwierdzenia, znajdował się i Rudolf Günsberg, o którym mam mówić, przedstawiony na katedrę technologii chemicznej in primo loco. Przedstawienie to było, jak zobaczymy, mimowolnie tylko uznaniem zasług dra Günsberga, ale nieszczerem, ponieważ w kilka tygodni następnie grono profesorskie cofnęło swoje przedstawienie, opierając się na błahym ustępie z listu pisanego prywatnie przez Günsberga do byłego dyrektora akademii, Reisingera – w którym to ustępie upatrywało lekceważenie profesorskiej posady. Ministerstwo zdziwione takim lekkomyślnem postępowaniem pozostawia całą sprawę w zawieszeniu, ponieważ nie zauważa dostatecznych powodów do cofnięcia wyboru, a z drugiej strony nie chce naruszać prawa samorządu. Jeżeli by istotnie w owym prywatnym liście okazało się lekceważenie, jakie chcą upatrywać profesorowie, to czyż dla tak błahej przyczyny już wszystkie zasługi dra Günsberga miałyby pójść w niepamięć? O tych zasługach tu w Galicji dobrze wiedzą, ale nie zawadzi dać kilku wyjaśnień.

Dr Günsberg jest rodem z Wiednia, ale młodzieńcem jeszcze przybył do Galicji, ożenił się z Polką, wychowuje dzieci po polsku i najzupełniej interes własny zespolił z interesem kraju. Gdy w jesieni roku zeszłego uznano język polski jako wykładowy na akademii technicznej, pozwalając wszakże przez kilka lat profesorom używać języka niemieckiego, Günsberg, pomimo trudności językowych, jakie zwalczać musiał, rozpoczął – na żądanie uczniów, od razu swoje wykłady w języku polskim, chociaż inni, mając większą łatwość przyswojenia nowej terminologii, nie zadali sobie tej pracy i woleli wykladać po niemiecku. Technologia chemiczna, którą wykłada prof. Günsberg, nie jest dotąd przedmiotem obowiązkowym, a pomimo tego znaczna liczba uczniów zapisała się na ten przedmiot i uczęszcza pilnie. W ogóle Günsberg cieszy się miłością swych uczniów. Sama katedra technologii chemicznej zawdzięcza swoje istnienie tylko usilnym jego przedstawieniom i staraniom. Rozpocząwszy swój zawód naukowy kilku ważnymi badaniami chemicznymi, które ogłoszono w Rocz-

nikach akademii wiedeńskiej i o których bardzo pochlebnie odezwano się, musiał zarzucić to wszystko, ponieważ w akademii nie tylko za siebie, ale i za innych ujrzał się w obowiązku pracować. Pobierając płacę pomocnika profesora chemii, w istocie przez długie lata był rzeczywistym profesorem, ponieważ wyznaczony na katedrę chemii prof. Wolf brał pieniądze i siedział w Wiedniu, a do Lwowa przyjeżdżał co najwyżej na parę miesięcy. Takie są zasługi Günsberga dla akademii.

Na polu podniesienia rolnictwa i przemysłu krajowego nie małe są też zasługi prof. Günsberga. Wkrótce po przyjeździe do Galicji został jednym z najczynniejszych członków Towarzystwa Gospodarczego, tj. rolniczego i Towarzystwa Technicznego. Towarzystwo Gospodarcze oddało mu nawet redakcją wydawanego przez siebie pisma: *Rolnik*. Nie znając polskiego języka, którego dopiero po przybyciu do kraju zaczął się uczyć, miał ogromne trudności w redagowaniu pisma, a pomimo tego i pomimo że zmuszony był opłacać sekretarza i tłumacza, zamiast korzyści musiał jeszcze z własnej kieszeni dokładać na redakcję – nie zrażał się i *Rolnika* podniósł do tej wysokości, na jakiej on obecnie się znajduje. Od czasu redakcji Günsberga, *Rolnik* stał się pismem umiejętnym i wpływowym. Usiłowania jego około podniesienia gorzelnictwa są tu dobrze znane. Większość właścicieli większych ziemskich zna Günsberga i udaje się do niego po radę. Kilka gorzelnii zostało urządzonych podług jego wskazówek, jedna u Tadeusza Wasilewskiego w Sieńkowie została wybudowana podług jego projektu i wkrótce otworzoną zostanie. W roku 1870 otworzył pierwszą szkołę praktycznego gorzelnictwa w Galicji. Pozwólcie mi przytoczyć początek zagajenia odczytanego przez Günsberga przy pierwszym publicznym popisie gorzelników, i to tym bardziej, że ten ustęp dokładnie przedstawia jak wielkie znaczenie ma gorzelnictwo dla Galicji.

„Szkoła praktycznych gorzelników, którą własnym usiłowaniem, jako człowiek prywatny, założyłem, powiada Günsberg, a która dopiero połowę swego zadania (kurs teoretyczny) w ciszy w jednym zakątku tego domu po raz pierwszy spełniła, posiadając zaledwie tylu uczniów, ilu do zagajenia wykładów niezbędny zwyczaj wymaga, szkoła ta ma wielką przyszłość w Galicji. Zważywszy cel jej, dziwić się zaiste przychodzi, że od dawna już nie została założoną, i że teraz dopiero i to z wielkimi trudnościami światło dzienne ujrzała. Wszak gorzelnictwo jest jedynym od dawna przemysłem galicyjskim, ciągle jeszcze wzrastającym. Około tysiąca gorzelnii jest tutaj w ruchu, a za wyrobiony z nich produkt miliony guldenów wpływa rokrocznie z zagranicy do kraju. Gorzelnictwo stanowi oś główną większej części gospodarstwa, ono jest punktem pośredniczącym w produkcji mięsa, mleka i nawozu – za pomocą rośliny okopowej, mającej wielkie w gospodarstwie rolnem znaczenie, a nie mającej prócz gorzelnii u nas innej drogi odbytu, którą to rośliną jest kartofel.

Gorzelnictwo pozostaje zatem w nierozzerwalnym związku z rolnictwem, tworząc w tem połączeniu naszą rzeczywistość i jedyne bogactwo krajowe. Temu też zawdzięcza u nas ono swe upowszechnienie i trwałość bytu. Istniało z dawien dawna i istnieć będzie, dopóki tylko trudnić się nie przestaniemy rolnictwem, gdyż leży to w naturze rzeczy, i rolnik dla należytego utrzymania gospodarstwa zmuszony

jest pędzić gorzelnię. Ale myliłby się mocno, kto by z mnogiej liczy będących u nas w ruchu gorzelni i z tego, iż są, wnosił, że gorzelnictwo u nas jest takie, jakim być powinno. Myliłby się, kto by mniemał, iż gospodarze nasi dlatego, iż mają gorzelnie, mają z nich także i zysk taki, jaki mieć powinni. Komu znane są nasze stosunki gospodarskie, ten wie bardzo dobrze, że mało któremu gospodarzowi opłaci się pędzenie gorzelni i że po większej części wszyscy, którzy pędzą na własny rachunek, tracą na tem, z której to przyczyny najwięcej u nas gorzelni jest Żydom w dzierżawę wypuszczonych. Właściciel kontent, że przy tem zbędzie swoje kartofle i otrzyma nawóz, chociaż musi jeszcze dodać do tego za bezcen piękną ilość siana, słomy i różnych tym podobnych dodatków. Wszystko to idzie na rachunek nawozu, a mało który gospodarz u nas wie, co go ten nawóz kosztuje.

Stan takowy gorzelnictwa w Galicji, czyniący najbardziej rozpowszechnioną gałąź przemysłu złem koniecznym, wypływa nie tylko ze stosunków krajowych, nie tylko z braku ducha przemysłowego i handlowego u naszej szlachty i z braku potrzebnych niezbędnie kapitałów obrotowych, ale obok tego z braku ludzi technicznie wykształconych do prowadzenia wyrobu, należycie wykształconych gorzelników. Wiadomo, jak wielki wpływ na prowadzenie każdej fabryki wywiera stojący na jej czele kierownik; ale wpływ ten u nas jest jeszcze daleko większy z powodu łatwości naszych panów właścicieli gorzelni, którzy w ogóle mało posiadają wiadomości technicznych, nie wiedzą, czego po gorzelniku wymagać można i należy.”

Po gorzelnictwie prof. Günsberg uważa wyrób skrobi albo krochmalu jako najbardziej mający przyszłość w Galicji. i na tym polu rozwinął swą czynność, a nawet zrobił ważny wynalazek, któremu ludzie fachowi wróżą piękną przyszłość. Z odpadków przy fabrykacji skrobi, które gnijąc zatrują tylko powietrze, przy pomocy metody wynalezionej przez dra Günsberga, łatwo można otrzymywać glutenki (gekortner Kleber) – materiał odznaczający się wielką pożywnością i łatwy do strawienia. Chcąc praktycznie przekonać o możliwości rozwoju tej gałęzi przemysłu, Günsberg urządził przy pomocy jednego z właścicieli ziemskich w 1858 roku w Swierzu fabrykę glutenem na małą skalę. Atoli brak kapitału i brak ducha przedsiębiorczego w naszej szlachcie spowodowały wstrzymanie tej fabrykacji. I dla samego produktu należało jeszcze zdobyć rozgłos. W tym celu, za staraniem Günsberga naczelna komenda wojskowa w Wiedniu poleciła Komisji wojskowo-sanitarnej wypróbować w jednym ze szpitali pożywność i łatwość trawienia glutenek. Rezultat wypadł wcale pomyślny i naczelna komenda wojskowa miała przystąpić do zrobienia próby na wielką skalę - ale ze wszystkimi razem zajęta ustawicznymi sporami konstytucyjnymi, zapomniała o tym swoim postanowieniu. Günsberg wszakże nie zaniedbał tej sprawy i zamierza na wystawie powszechnej wiedeńskiej znowu wystąpić ze swoimi glutenkami. Podług jego przekonania, kiszki z mąki glutenkowej ze względu na pożywność i łatwość trawienia, przewyższą znakomite pruskie kiszki grochowe.

Nie dosyć na tem. Günsberg pracuje i piórem. Ze wszystkich wysłanych na paryską wystawę powszechną on jeden tylko napisał sprawozdanie o niej za względu

na potrzeby nasze krajowe. Gdy przedsięwzięto reorganizacją akademii technicznej, wydał bardzo dobre dzieło w tym przedmiocie, które nie zwróciło na siebie uwagi na jaką zasługuje jedynie tylko dlatego, że u nas w ogóle czytaniem książek, zwłaszcza poważnych, nie zajmują się. Obecnie Günsberg przygotowuje kurs gorzelnictwa” [4].

W tekście tym zwraca uwagę przypisanie Günsbergowi wiedeńskiego pochodzenia. Trudno przypuścić, aby Limanowski, domownik Günsbergów, nie znał prawdziwego stanu rzeczy. To przeinaczenie może więc świadczyć o tym, że sam Günsberg nie chciał ujawniać swoich galicyjskich korzeni.

Pracowite życie Günsberga podsumowywał, na łamach „Kosmosu”, senior chemików lwowskich, Bronisław Radziszewski. Pisał on:

„W dniu 8. listopada b.r. zmarł we Lwowie profesor szkoły politechnicznej, Rudolf Herman Günsberg. Zmarły urodził się w 1825 r. na Wołyniu. Do szkół uczęszczał w Brodach – w Wiedniu ukończył Akademię techniczną, poczem, po prawie dwuletnim pobycie w uniwersytecie Jenajskim, tamże się doktoryzował. Przybywszy do Lwowa był najprzód asystentem a następnie także i zastępcą profesora chemii w ówczesnej Akademii technicznej. Wskutek dokonanego przeobrażenia akademii technicznej lwowskiej na szkołę politechniczną i zrównania teje z uniwersytetami, dr Günsberg przed siedmiu laty został mianowany zwyczajnym profesorem technologii chemicznej w szkole politechnicznej, które to obowiązki pełnił aż do śmierci, będąc w latach 1871/1872 i 1875/1876 wybieranym przez swych kolegów na Dziekana wydziału chemii technologicznej. Działania jego naukowe, prócz kilku drobnych prac analitycznych, odnoszących się do składu chemicznego źródła Bronisławy w Truskawcu i do sposobów oczyszczania wody zawierającej wiele soli magnezowych, skierowane były głównie do podniesienia gorzelnictwa w Galicyi i oparcia tegoż ma racjonalnej podstawie. W tym celu założył i prowadził szkołę gorzelniczą we Lwowie, zasilając swoimi artykułami czasopismo „Rolnik”, założył wspólnie z innymi towarzystwo gorzelników i wydawał pierwszą w języku polskim gazetę, poświęconą specjalnie tej gałęzi przemysłu. Od wielu lat dotknięty nieuleczalną chorobą, gorąco pragnął literaturę naszą obdarzyć dziełem specjalnym, które by obejmowało całość wiedzy naukowej o tej części technologii, której z całym zapalem się poświęcał. Pragnienia jego się urzeczywistniły. Niemal przed samą śmiercią dokonał i wydał własnym nakładem „Podręcznik o wyrobie spirytusu”. Dzieło to obejmuje dwa duże tomy i jest ozdobione 112 znakomicie wykonanymi drzeworytami, może śmiało konkurować z najlepszymi tego rodzaju podręcznikami zagranicznymi, jak np. Stamther’a i innych. Nie tu jest miejsce oceniać to dzieło, owoc długoletnich studiów i doświadczeń – powiemy tylko krótko, że jest ono istotną ozdobą naszej literatury naukowej. Dowód to wymowny, że Günsberg, lubo wychowany wśród i przez Niemców, szczerze ukochał swój kraj rodzinny, a miłość swoją stwierdzał wedle sił swych słowem, radą i czynem. Toteż młodzież nasza to wyższe i szlachetne uczucie umiając odczuć i zrozumieć, zaniósł na swych barkach ciało swego profesora do grobu, na którym złożyła piękny wieniec z odpowiednim napisem. Nad grobem

przemówił prof. Maszkowski, osobisty przyjaciel zmarłego. W końcu nadmienimy, że zmarły dr Günsberg był także członkiem polskiego towarzystwa przyrodników im. Kopernika” [5].

To wzruszające wspomnienie uzupełnijmy kilkoma danymi. Günsberg urodził się w Podkarmieniu, niedaleko Brodów. Do Akademii Technicznej we Lwowie został przyjęty w roku 1857, jako asystent, na miejsce Ignacego Hawranka. W roku 1863 został mianowany adiunktem i zastępcą profesora chemii. Profesorem technologii chemicznej został mianowany 16 lipca 1872 roku [6]. Jego pierwsze publikacje naukowe dotyczyły kilku kwestii analitycznych [7, 8]. Szereg innych publikacji dotyczył badań własności białek występujących w produktach żywnościowych [9–12]. W tej serii prac zwraca uwagę publikacja o białkach mąki pszennej [10]. Günsberg dzieli je na trzy frakcje: 1) nierozpuszczalne w alkoholu i gorącej wodzie; 2) rozpuszczalne w alkoholu, ale nie w wodzie; 3) rozpuszczalne w alkoholu i w wodzie. Niektóre z nich charakteryzuje analitycznie, oznaczając w nich zawartość węgla, wodoru i azotu. Miał więc, jak z tego widać, niezłe możliwości analityczne. W pracach Günsberga nie brak jednak i publikacji czysto chemicznych, jak ta o strukturze azotynów [13].

Technologiczny kierunek badań Günsberga reprezentuje jego praca o uzyskiwaniu różnorodnych produktów węglowodorowych z galicyjskiego wosku skalnego [14]. Danych bibliograficznych tej pracy nie udało się jednak w pełni ustalić.

Główne zainteresowania technologiczne Günsberga skupiały się na technologii produkcji alkoholu etylowego. Na łamach czasopisma „Rolnik” ogłosił dwie dotyczące tego zagadnienia prace [15, 16]. Tej tematyce poświęcił też oddzielny druk [17], a także dzieło swojego życia, podręcznik gorzelnictwa [18].

Całe swe życie zawodowe przepracował Günsberg we lwowskiej wyższej szkole technicznej. Problematykę szkolnictwa technicznego poznał gruntownie, czemu dawał wyraz w druku. Najobszerniejszym jego na ten temat opracowaniem jest książka pt. „Szkoly techniczne. Myśl odpowiedniego urzadzienia szkół technicznych” [19]. Wyszła ona drukiem w roku 1868. Rok wcześniej Rada miasta Lwowa delegowała Günsberga na wystawę przemysłową do Paryża, polecając mu, by przy tej okazji zapoznał się ze szkolnictwem zawodowym w Niemczech i Francji. Wymieniona tu książka była wypełnieniem tego zadania. Wynik badań Günsberga musiał wielce satysfakcjonować Radę miasta, bo zleciła ona przetłumaczenie dużych jej fragmentów na język niemiecki [20].

Günsberg uważał, że należy wyraźnie podnieść poziom ogólnego wykształcenia techników, bo nie powinni oni pod tym względem odbiegać od ewentualnych swoich zleceniodawców. W tym celu należałoby, zdaniem Günsberga, podnieść kryteria kwalifikujące na studia techniczne, a może nawet ujednoczyć programy nauczania w gimnazjach i szkołach realnych, z których akademie techniczne czerpią kandydatów na studia. W „urzędzeniu” szkół technicznych należy natomiast wyraźnie określić cele kształcenia. Stąd wynikał postulat specjalizacji szkół technicznych i ścisłego dopasowania programów szkół do ich specjalizacji. Trzeba też powiedzieć, że praca

Günsberga rysuje interesujący obraz stanu szkół zawodowych w Galicji, w połowie XIX wieku.

Wyjazd do Paryża zaowocował jeszcze jedną pracą uczonego. We wczesnych latach 60. XIX wieku udało się Ernestowi G. Solvayowi rozwiązać kwestie przemysłowej syntezy sody kalcynowanej metodą sodowo-amoniakalną. W roku 1865 zbudowana przezeń fabryka wypuściła pierwszy swój produkt. Soda Solvaya została zaprezentowana na przemysłowej wystawie w Paryżu w 1867 roku [21]. Nie sposób przypuścić, by specjalista od technologii chemicznej mógł obojętnie przejść wobec tego wydarzenia. Z wizytą więc w Paryżu należy, moim zdaniem, wiązać późniejsze zainteresowanie się Günsberga metodą sodowo-amoniakalną. Günsberg stwierdził, że drogę syntezy można odwrócić „(...) bo wodorowęglan sodu, traktowany salmiakiem, daje wodorowęglan amonu i sól kuchenną”. Spostrzeżenie swoje ogłosił w „Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft” w roku 1874 [22]. Skłoniła go do tego, jak pisał, wiadomość, że A. Bauer ogłosił podobne spostrzeżenie. Günsberg rozpoczął więc badania nad wpływem tej reakcji na proces syntezy sody. Jego wstępna konkluzja głosiła, że „(...) punkt ciężkości całego amoniakalno-sodowego procesu leży w stosunkach rozpuszczalności, których zbadaniem się zatrudniłem.” Doniesienie Günsberga zapowiadało więc obszerniejsze na ten temat badania. Przeszkodziła temu zapewne potęgująca się choroba uczonego.

Günsberg zmarł w roku 1879. Jego następcą na Katedrze Technologii Chemicznej został Juliusz Brühl, któremu przypadło w udziale przyznanie Politechnice Lwowskiej nowej sławy.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] I.Z. Siemion, *Dwie dusze Ludwika Bruneta*, [w:] *Viridafrium Chymicum czyli Notatek chaotycznych część II*, Wrocław 2007, s. 221–231.
- [2] I.Z. Siemion, *O chemikach – Polakach doby zaborów*, Wrocław 1995, s. 166.
- [3] B. Limanowski, *Pamiętniki*, Warszawa 1958, s. 43–44 i 73.
- [4] (B. Limanowski), *Korespondencja z zagranicy*, Bluszcz, R. VII, T. VIII, s. 110–111 i 118.
- [5] Br.R., *Kosmos*, 1879, 4, 351–352.
- [6] W. Zajączkowski, *C.K. Szkoła Politechniczna we Lwowie*, Lwów 1894.
- [7] R. Günsberg, *Analyse des Bronislavbrunnes in der Badeorte Truskawiec auf der Cameralherrschaft Drohobycz in Galizien*, Sützungsberichte d. Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Classe d. Kaiserlichen Akademie d. Wissenschaften in Wien, 1861, 43, 175; 197–207.
- [8] R. Günsberg, *Ueber die massenanalytische Methode zur Bestimmung des Alkoholgehaltes in alkoholischen Zuckerlösungen*, Sützungber., 1861, 43, 386; 567–570.
- [9] R. Günsberg, *Ueber die Veränderungen des Weizenkleelebers durch Kochen desselben mit Wasser*, Sützungber., 1860, 41, 676.
- [10] R. Günsberg, *Ueber die wasserlöslichen Bestandtheile des Weizenklebers*, Sützungber., 1862, 44, 115; 429–444.
- [11] R. Günsberg, *Ueber das Verhalten von Gummi gegen Eiweisskörper*, Sützungber., 1862, 45, 627; 643–647.
- [12] R. Günsberg, *Ueber das Verhalten von Dextringummi gegen Hünereiweiss*, 1864, 49, 369; 409–418.

- [13] R. Günsberg, *Ueber die Untersalpetersäure und die Constitution der Salpetersauren Salze*, Sützungsber., 1874, **68**, 498.
- [14] R. Günsberg, *Erfindung eines Verfahrens aus dem Erdwachse Paraffin, Photogen, Maschinenschmiröl und Wagenschmiredarzustellen*, Pharmazeutische Centralhalle für Deutschland, 1867.
- [15] R. Günsberg, *O nowowynalezionym patentowanym aparacie do badania zacieru Hollefreunda*, Rolnik, 1872.
- [16] R. Günsberg, *O stanie obecnym gorzelnictwa*, Rolnik, 1874.
- [17] R. Günsberg, *Sposób rozpoznawania jakości kartofli i zboża i obliczanie wydatku spirytusu w gorzelniach*, Lwów 1873.
- [18] R. Günsberg, *Podręcznik o wyrobie spirytusu*, T.1, s. XII + 281; 76 drzeworytów w tekście; T. 2, s. VII + 200; 36 drzeworytów. Lwów 1879.
- [19] R. Günsberg, *Szkoły techniczne. Myśl odpowiedniego urządzenia szkół technicznych*, Lwów 1868.
- [20] R. Günsberg, *Die chemisch-technischen Fachschulen*, Lemberg 1869.
- [21] J.J. Gessen, *Oczerki istorii proizwodstwa sody*, Leningrad-Moskwa 1951, s. 76.
- [22] R. Günsberg, *Zur Kenntniss Amoniak-soda prozesses*, Ber., 1974, 7, 644–646.

Praca wpłynęła do Redakcji 12 kwietnia 2011

NOWE WYDAWNICTWA



„*Chemiczne metody analizy ilościowej*”, Andrzej Cygański, Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa 2011, wyd. siódme, oprawa miękka, lakierowana, str. 590.

Kolejne wydanie tego niezmiernie popularnego podręcznika chemii analitycznej, adresowanego przede wszystkim do studentów wydziałów chemicznych uniwersytetów i politechnik, zostało nieco zmienione w porównaniu z poprzednimi. W szczególności Autor rozszerzył treści poświęcone ogólnym rozważaniom na temat metod analitycznych, zmienił rozdział poświęcony wagom i ważeniu (o czym wspomnę jeszcze niżej), ale także dodał dwa nowe rozdziały: o charakterystyce rodzaju równowag i o zastosowaniu w analizie hydrolizy nieodwracalnej. Zauważalne są też zmiany dostosowujące symbolikę i nomenklaturę do zalecanych przez IUPAC.

Trudno jest recenzować książkę tak powszechnie znaną i uznaną. Sam zalecam ją swoim studentom na równi z klasycznym podręcznikiem J. Minczewskiego i Z. Marczenki. Jej zalety to m.in. przejrzysty i konsekwentny układ rozdziałów, duża liczba przykładowych zadań, w połączeniu ze zwięzłe ale wyczerpująco wyłożonymi zagadnieniami teoretycznymi, oraz ożywiające tekst przykłady wykorzystania wiedzy analitycznej w praktyce. Dlatego nieco przewrotnie odniosę się krytycznie do kilku szczegółów w nadziei, że zauważone przeze mnie niedociągnięcia – skądinąd raczej drobne i niewpływające na moją bardzo wysoką ocenę – zostaną poprawione w przyszłych wydaniach, zaś o zaletach rozwozić się zbytnio nie będę, bo i tak są znane.

Bardzo przystępnie i zwięzłe skonstruowany rozdział o statystyce pomiarowej i analizie błędów zawiera tylko jeden test małych prób, Dixona. Jest on bardzo prosty w użyciu, lecz wymaga znajomości wartości krytycznych tego testu. Dlatego sugeruję dodanie testu 3d (opisanego jest m.in. w popularnym podręczniku Galusa [Z. Galus (red.), „Ćwiczenia rachunkowe z chemii analitycznej”, PWN 2008]); test 3d wymaga od użytkownika trochę więcej rachowania, za to można go zastosować bez żadnych pomocniczych tabel. Jest to dość ważne, bo w oznaczeniach analitycznych metodami klasycznymi najczęściej liczba dostępnych wyników jest niewielka i studenci nie wiedzą, czy budzący wątpliwości należy odrzucić.

Obszerny rozdział poświęcony wagom analitycznym i ważeniu można bez uszczerbku dla czegokolwiek znacznie skrócić. Czy nam się to podoba czy nie, klasyczne, mechaniczne wagi analityczne odchodzą powoli do lamusa, zaś zastępują je wagi elektroniczne, a z użytkowego punktu widzenia należy jedynie znać sposoby na sprawdzenie rzetelności tych wag, bowiem niespecjalista pod żadnym pozorem nie powinien zabierać się za ich naprawę czy choćby tylko regulację.

W kilku miejscach można znaleźć niezbyt ściśle sformułowania, które mogą wprowadzić w konfuzję bardziej wnikliwego czytelnika. Niezbyt podoba mi się definicja aktywności (na stronie 100),

a także zastosowanie słowa „odwracalna” w relacji do reakcji redox na str. 106. Definiując bufony na str. 303 skorzystałbym raczej z teorii Brønsteda – skądinąd wyczerpująco opisanej krótko przedtem. Co do buforów: wykres 4.11 na str. 305 (pojemność buforu w funkcji pH) ogranicza się do zakresu pH między 2.5 i 7. Tymczasem może warto wspomnieć, co dzieje się z tą wielkością w środowiskach bardzo kwaśnych lub bardzo zasadowych – można tu np. zastosować wzór podany przez prof. Hulanickiego [A. Hulanicki, „Reakcje kwasów i zasad w chemii analitycznej”, PWN 1979, str. 149]. Jest to zresztą ciekawy punkt do dyskusji ze studentami na temat znaczenia niektórych pojęć i sensu definicji.

Gdy omawiany jest komplekson II (EDTA), jego właściwości kwasowo-zasadowe pokazuje wykres 4.23. Uważny czytelnik zauważy jednak, że EDTA jest w istocie formalnie kwasem sześcioprotonowym (także oba atomy azotu są donorami par elektronowych). Warto o tym wyraźnie powiedzieć mimo że odpowiednie formy pojawiają się tylko w mało ważnym analitycznie zakresie pH < 2,5, gdyż jakkolwiek by na to nie spojrzeć, wykres 4.23 ścisły nie jest.

Drobnych niedociągnięć można znaleźć więcej. Od lat w podręcznikach chemii analitycznej pojawia się osobliwość, którą jako pierwszy podał tandem Minczewski-Marczenko w swojej „Chemii analitycznej”. Otóż opisując manganometryczne oznaczanie żelaza autorzy ci proponują żeby roztwór zawierający próbkę po redukcji cyną przenieść ilościowo do innej zlewki, tam go rozcieńczyć i zadać mieszaniną Zimmermanna-Reinharda. Jest to operacja zupełnie zbędna, skoro można od razu zacząć analizę w zlewce o odpowiedniej pojemności i wszelkie manipulacje prowadzić w jednym naczyniu, oszczędzając czas i zmniejszając ryzyko błędu. Ciekawe, dlaczego akurat ten błąd można spotkać bodajże we wszystkich polskich podręcznikach z chemii analitycznej.

Tej samej analizie dotyczy ilustracja obliczania krzywej miareczkowania redox (na str. 341 i dalszych). Krzywą tę Autorzy liczą dla środowiska $[H^+] = 1M$, aby uprościć rozważania, lecz dobrze byłoby chyba wspomnieć, iż dla pH różnych od zera wyrażenie na potencjał rozważanego układu nie jest już tak proste, jak zastosowany wzór 4.80. Co więcej, na str. 344 krzywa miareczkowania otrzymana drogą obliczeń jest porównana z wyznaczoną doświadczalnie poprzez miareczkowanie potencjometryczne. Krzywe te jednak różnią się nie tylko kształtem, co jest zresztą skomentowane, lecz także zakresem wartości, i to znacznie, co już skomentowane nie jest, a powinno.

Wyraźnym brakiem jest nieuwzględnienie wśród przykładów oznaczeń alkacymetrycznych analiz wykorzystujących wymiennicze jonowe. Te ostatnie są wprawdzie omawiane, ale dopiero w rozdziale poświęconym technikom rozdziału. Tymczasem wymiana jonowa pozwala w prosty sposób oznaczyć np. sole przez miareczkowanie równoważnej im ilości kwasu albo zasady w elucencji.

Na koniec wspomnę o czymś, co w obecnych realiach społeczno-gospodarczych można uznać za kryptoreklamę oczywiście przy złej woli. Otóż przy omawianiu bardziej zaawansowanych urządzeń technicznych, jak wagi i biurety automatyczne, podawane są nazwy firm i symbole konkretnych urządzeń. Obecnie, w odróżnieniu od czasów gdy pojawiały się pierwsze wydania omawianej książki, na naszym rynku obecni są praktycznie wszyscy liczący się producenci urządzeń laboratoryjnych, które aż tak bardzo się między sobą nie różnią. Dlatego proponuję, żeby w następnych wydaniach usunąć wszelkie skojarzenia tego rodzaju.

Nie chciałbym jednak pozostawić wrażenia, jakobym miał o podręczniku Cygańskiego złe mniemanie. Jest to bardzo dobry podręcznik, o czym już zresztą wspomniałem na samym wstępie, a teraz powtórzę: zalecam go swoim słuchaczom na równi z książką Minczewskiego i Marczenki, zaś wymienione wyżej niedociągnięcia są w istocie drugorzędne. Co więcej, omawiane dzieło zawiera dygresje do problemów i analiz środowiskowych, medycznych i innych, co niezmiernie podnosi atrakcyjność tekstu. Z kolei znaczna liczba przykładów rachunkowych oraz starannie pod względem metodycznym dobranych zadań pozwala mieć pewność, że student, który przerobi ten materiał, będzie miał właściwie ukierunkowaną i szeroką wiedzę na temat klasycznej chemicznej analizy ilościowej.

INFORMACJE

INFORMACJE REDAKCJI „WIADOMOŚCI CHEMICZNYCH”

CENY PRENUMERATY NA ROK 2011

Redakcja miesięcznika PTCh „Wiadomości Chemiczne” zawiadamia, że wysokość prenumeraty rocznej „Wiadomości Chemicznych” za 2011 r. wynosi **168 zł** dla instytucji i niezrzeszonych prenumeratorów indywidualnych oraz **78 zł** dla bibliotek szkół średnich i podstawowych. Należność za prenumeratę prosimy przekazywać na konto:

Bank PEKAO SA
Oddział we Wrocławiu
pl. Powstańców Śl. 9, 50-950 Wrocław
Redakcja „Wiadomości Chemiczne”
NRB 48 1240 6670 1111 0000 5649 8781

Prenumerata „Wiadomości Chemicznych” dla członków PTCh, połączona z opłatą składek członkowskich, jest znacznie niższa i przedstawia się następująco:

- prenumerata „Wiadomości Chemicznych” na rok 2011 wraz ze składką członkowską, w ramach której dostarczany jest „Orbital”, wynosi **70 zł** (składka – 50 zł, prenumerata – 20 zł);
- emeryci, doktoranci oraz studenci płacą **35 zł** (składka – 15 zł, prenumerata – 20 zł); a nauczyciele szkół średnich i podstawowych płacą **40 zł** (składka – 20 zł, prenumerata – 20 zł).

Członkowie PTCh, którzy zechcą zaprenumerować „Wiadomości Chemiczne” na podanych tu warunkach, proszeni są o wnoszenie opłat na konto:

PTCh Warszawa, ul. Freta 16
Millennium BIG BG SA
NRB 57 1160 2202 0000 0000 2720 2458

Informacje bieżące

Informujemy, że od roku 2010, rezygnujemy z przesyłania do Autorów bezpłatnych odbitek manuskryptu – w zamian będziemy przysyłać elektroniczną wersję opublikowanej pracy. Decyzja ta została podjęta na prośbę wielu autorów jak również ze względu na obniżenie kosztów wydawania czasopisma.

Redakcja „Wiadomości Chemicznych”



Politechnika Wrocławska

Studia Doktoranckie na Wydziale Chemicznym

Wydział Chemiczny Politechniki Wrocławskiej ogłasza nabór na czteroletnie stacjonarne **STUDIA DOKTORANCKIE** w roku akademickim 2011/2012, w następujących dyscyplinach:

- **BIOTECHNOLOGIA**
- **CHEMIA**
- **INŻYNIERIA CHEMICZNA**
- **TECHNOLOGIA CHEMICZNA**

Warunkami przyjęcia na studia są ukończone studia wyższe II stopnia i pozytywny wynik postępowania kwalifikacyjnego.

Zgłoszenia wraz z wymaganym dokumentami należy składać w Dziale Nauczania Politechniki Wrocławskiej (Wybrzeże Wyspiańskiego 27, budynek A-1, pokój 153) w dniach od 4 do 27 maja bieżącego roku.

Przewidywany termin rozmów kwalifikacyjnych: 20–22 czerwca 2011.

Kandydaci zakwalifikowani na studia, którzy uzyskają wysoką lokatę w postępowaniu rekrutacyjnym, mogą otrzymać stypendium doktoranckie. Ponadto, zgodnie z Regulaminem Studiów Doktoranckich, doktoranci mogą ubiegać się o stypendia socjalne i naukowe.

Dodatkowe informacje, w tym o potencjalnych promotorach, można uzyskać na stronach internetowych Studium Doktoranckiego Politechniki Wrocławskiej (<http://www.doktoranci.pwr.wroc.pl>) i Wydziału Chemicznego (<http://www.ch.pwr.wroc.pl>).



Instytut Niskich Temperatur i Badań Strukturalnych PAN
im. Włodzimierza Trzebiatowskiego
we Wrocławiu
zaprasza na

STUDIA DOKTORANCKIE

FIZYKA I CHEMIA CIAŁA STAŁEGO
także w ramach Międzynarodowej Szkoły Badawczej
im. Maksa Plancka (Drezno - Wrocław - Praga)

Wszyscy uczestnicy studium otrzymują stypendia

Stypendium im. W. Trzebiatowskiego
dla najlepszych doktorantów

Program studenckich staży naukowych
dla studentów wszystkich lat studiów

Termin składania podań: **27 czerwca 2011 r.**

Pełna informacja: www.intibs.pl



**XIth International Conference
on
Molecular Spectroscopy
under the auspices
European Academy of Sciences, Arts and Humanities
Dedicated to the Memory of
PROFESSOR GALINA A. PUCHKOVSKA**

Conference topics:

- Molecular structure, interactions and recognitions
- Molecular materials
- Modelling - simulation
- Biological molecular systems
- Nonlinear optical materials
- Hydrogen - bonded ferroelectrics
- Nanomaterials



**FROM MOLECULES TO MOLECULAR
MATERIALS, BIOLOGICAL
MOLECULAR SYSTEMS and
NANOSTRUCTURES**

***Wrocław - Kudowa Zdrój
17 - 21 09 2011***

Organizers:

Institute of Low Temperature
and Structure Research of the
Polish Academy of Sciences
in Wrocław



Polish Academy of
Sciences the Wrocław
Branch



Wrocław Research Center
EIT+



Faculty of Chemistry
University of Wrocław



**Information and registration:
polcmos2011@int.pan.wroc.pl
<http://hermes.int.pan.wroc.pl/polcmos2011/>**

Redakcja „Wiadomości Chemicznych” informuje, że są u nas do nabycia następujące pozycje „Biblioteki Wiadomości Chemicznych”:

Nomenklatura chemii nieorganicznej. Zalecenia 1990, red. Z. Stasicka, cena 25 zł
Podstawowa terminologia stereochemii oraz Słownik podstawowych terminów w nauce o polimerach. Zalecenia 1996, red. O. Achmatowicz, B. Szechner i P. Kubisa, cena 12 zł

Nomenklatura węglowodanów. Zalecenia 1996, tłum. i red. T. Sokołowska i A. Wiśniewski, cena 18 zł

I.Z. Siemion, *Bronisław Radziszewski i lwowska szkoła chemii organicznej*, cena 18 zł

K. Maruszewski, *Fizykochemia molekuł zamkniętych w zeolitach i zol-żelach*, cena 18 zł

Praca zbiorowa, *Uporządkowane materiały mezoporowate*, red. B. Burczyk, cena 18 zł

Skorygowana nomenklatura rodników, jonów, jonorodników i podobnych indywidualności chemicznych. Zalecenia 1993, red. T. Sokołowska i A. Wiśniewski, cena 15 zł

I.Z. Siemion, *Lutum sapientiae, czyli Notatek chaotycznych część pierwsza*, cena 18 zł

M. Zabłocka-Malicka, *Ruchliwość jonów w podwójnych układach stopionych soli*, cena 8 zł.

Praca zbiorowa, *Nanomateriały*, red. D. Hreniak, W. Łojkowski, W. Stręk, M. Suszyńska, cena 25 zł.

Praca zbiorowa, *Ogniwa paliwowe – nowe kierunki rozwoju*, red. H. Drulis, J. Hanuza, D. Hreniak, M. Miller, G. Paściak, W. Stręk, cena 20 zł

Glosariusz nazw klas związków organicznych i reaktywnych produktów pośrednich oparty na strukturze (Zalecenia IUPAC 1994), red. i tłum. F. Kaźmierczak i J. Gawroński, cena 16 zł.

Od substancji prostych do życia. Świat RNA – początki życia na Ziemi, Zdzisław Chilmonczyk – NAKŁAD WYCZERPANY.

Profesor Bogusława Jeżowska-Trzebiatowska. 1908–1991 w setną rocznicę urodzin, cena 12,00 zł.

Chemia koordynacyjna w Polsce. Część I, cena 17,50 zł.

Chemia koordynacyjna w Polsce. Część II, cena 17,50 zł.

Chemosensory optyczne oraz materiały rozpoznawcze dla jonów metali w roztworach, Krzysztof Kledzik, cena 22,00 zł.

Obliczenia teoretyczne stałej ekranowania magnetycznego i stałych strzeżeń spinowo-spinowych. Teobald Kupka cena 20,00 zł.

Książki wysyłamy na koszt zamawiającego. Zamówienia prosimy kierować pod adresem: Redakcja „Wiadomości Chemicznych”, ul. F. Joliot-Curie 14, 50-383 Wrocław. Opłaty należy wnosić na konto: Bank PEKAO SA O/Wrocław, Redakcja „Wiadomości Chemicznych”, NRB 48 1240 6670 1111 0000 5649 8781.

REGULAMIN DLA AUTORÓW

„Wiadomości Chemiczne” publikują artykuły przeglądowe, dotyczące wszystkich dziedzin chemii i wcześniej niedrukowane w innych czasopismach. Prace raz opublikowane w „Wiadomościach Chemicznych”, bez zgody Redakcji, nie mogą być wydane gdzie indziej.

Treść artykułów powinna odpowiadać aktualnemu stanowi wiedzy i uwzględniać najnowsze osiągnięcia z dziedziny, której artykuł dotyczy.

„Wiadomości Chemiczne” nie przyjmują do druku oryginalnych prac własnych. W wyjątkowych przypadkach mogą zostać wydane prace przeglądowe dotyczące dorobku własnego autora (np. nowo mianowanego profesora lub laureata ważnej nagrody) albo prace podsumujące dorobek Instytutu, Wydziału itp. Zamiar złożenia takiego artykułu do druku powinien być jednak wcześniej uzgodniony z Redakcją.

Ponadto w serii „Biblioteka Wiadomości Chemicznych” publikowane są prace, będące z założenia dłuższymi artykułami przeglądowymi lub monografiami poświęconymi ważnym i aktualnym problemom współczesnej chemii. Autorzy, którzy chcieliby dla „Wiadomości Chemicznych” taki artykuł napisać, powinni wcześniej skontaktować się z Redakcją i przesłać pocztą elektroniczną (**e-mail: wchem@wchuwr.pl**) lub zwykłą informację zawierającą tytuł przygotowywanej publikacji oraz przybliżoną liczbę stron, tabel i rysunków itp.

W ramach nowej serii wydawniczej „WCh” pod nazwą „Habilitatione” mogą być publikowane prace habilitacyjne z szeroko pojmowanego obszaru chemii. Zważywszy, że zgodnie z ustawą, dopuszczalne jest przedstawianie rozpraw habilitacyjnych albo w formie monografii, albo w formie pliku bliskotematycznych publikacji, poprzedzonych omówieniem w języku polskim (tzw. autoreferatem), Redakcja przewiduje drukowanie (również w kolorach) obydwu tych wariantów. W zależności od sytuacji finansowej Wydawnictwa lub w przypadku specjalnych wymagań Autorów, Redakcja zastrzega sobie prawo negocjacji kosztów druku z Autorami lub Instytucjami zlecającymi druk.

Prace należy przysyłać do Redakcji pocztą elektroniczną (**e-mail: wchem@wchuwr.pl**) oraz **równoległe** – pocztą zwykłą (na adres: Redaktor Naczelny/Sekretarz Redakcji „Wiadomości Chemicznych”; ul. F. Joliot-Curie 14, 50-383 Wrocław), dwa egzemplarze jednostronnego wydruku komputerowego publikacji z dołączoną płytą CD, zawierającą tekst, tabele i ilustracje.

Tekst powinien być przygotowany w edytorze **Word** lub innym kompatybilnym z MS Office. Artykuły należy opracowywać zwięźle i nie zamieszczać nadmiaru szczegółów, odsyłając Czytelnika do piśmiennictwa oryginalnego, które powinno uwzględniać najnowsze prace z dziedziny, której dotyczy artykuł.

Maszynopis nie powinien przekraczać 25 stron, wliczając wykaz piśmiennictwa w przypadku krótkiego przeglądu, lub 100 stron, w przypadku monografii przeznaczonej do druku w Bibliotece „Wiadomości Chemicznych”. Strona powinna zawierać **1800** znaków (razem ze spacjami), co przy interlinii 1,5 oznacza 30 wierszy po 60 znaków oraz margines z prawej strony ok. 5 cm.

Na pierwszej stronie, pod tytułem polskim, należy umieścić tytuł w języku angielskim, nazwisko(a) i adres autora(ów) oraz spis rozdziałów. Dalej powinno się znaleźć obszernie streszczenie pracy w języku angielskim (do 2700 znaków, z cytowaniem piśmiennictwa i odsyłaczami do tabel i rysunków w tekście) oraz wykaz słów kluczowych, osobno w języku polskim i osobno w angielskim. Redakcja prosi o przysyłanie tekstów angielskich adjustowanych.

Na oddzielnej karcie prosimy dołączyć krótką (do 150 wyrazów) **notkę biograficzną**, zawierającą tytuły naukowe i miejsca pracy oraz inne informacje wg uznania Autora/Autorów, w tym aktualne zdjęcie. Nadesłanie tych informacji będziemy traktować jako zgodę na ich publikację.

Rysunki (mogą być kolorowe, ale trzeba się liczyć z dopłatą do druku) w formie wydruku należy przesłać w dwóch egzemplarzach. Muszą mieć odpowiednią formę graficzną, by w razie potrzeby nadawały się do reprodukcji. Na odwrocie należy wpisać ołówkiem nazwisko autora i numer rysunku – ten sam, który w odpowiednim miejscu został wpisany w manuskrypcie. Na osobnej stronie dołączyć podpisy pod rysunki w języku polskim i angielskim. Osobno należy dołą-

czyć ponadto jeden komplet wzorów i schematów, narysowanych oddzielnie w formie nadającej się do reprodukcji. W wersji elektronicznej rysunki czarno-białe należy zapisać w formacie .doc, .cdr, .jpg, .tif, .pdf, natomiast rysunki kolorowe – w formacie .jpg lub .tif. Rozdzielczość rysunków ≥ 300 dpi. Każdy z rysunków zapisać w oddzielnym pliku.

Tabele należy ponumerować cyframi arabskimi, a ich tytuły w języku polskim i angielskim zapisać nad tabelami.

Piśmiennictwo należy zestawić w kolejności cytowania w tekście: powinno ono zawierać kolejno inicjały imion i nazwisko, skrót tytułu czasopisma zgodny z przyjętymi normami, rok wydania, tom podkreślony i numer pierwszej strony cytowanej pracy, przykład: J. Kowalski, Wiad.Chem., 2007, **61**, 473. Wykaz skrótów ważniejszych czasopism chemicznych jest podany w „Wiadomościach Chemicznych”, 1989, **43**, 979. Jeśli część piśmiennictwa zebrana jest w monografiach lub innych wydawnictwach, nie należy podawać szczegółowo wykazu tego piśmiennictwa, lecz cytować odnośne wydawnictwo.

O **przyjęciu** pracy do druku decyduje Komitet Redakcyjny. Przed podjęciem decyzji wszystkie prace są przesyłane recenzentom. Artykuły niezakwalifikowane do druku Redakcja zwraca, zachowując kopię maszynopisu.

Autorzy zobowiązani są do wykonania jednej korekty tekstu.

Autor wskazany w liście przewodnim jako osoba kontaktowa otrzymuje drogą elektroniczną plik opublikowanej pracy w formacie pdf.

Redakcja
„Wiadomości Chemicznych”

