



*Wydział Rolniczy Akademii Rolniczej we Wrocławiu
Instytut Fizyki Politechniki Wrocławskiej*

Rozprawa doktorska

*Wpływ wybranych związków organicznych fosforu na
fizyczne właściwości modelowej błony biologicznej.*

Dorota Bonarska-Kujawa

*Promotor
Dr hab. Halina Kleszczyńska, prof. AR*

Wrocław 2005

***”Nie można zatem rozdzielić wiary i rozumu nie pozbawiając człowieka możliwości właściwego poznania samego siebie, świata i Boga.”
Jan Paweł II Encyklika „Fides et ratio” p.17***

Serdecznie dziękuję:

- *Pani profesor Halinie Kleszczyńskiej za ogromne serce, życzliwą opiekę i wyrozumiałość w trakcie wykonywania badań i redagowania pracy,*
- *Panu prof. Leszkowi Kordasowi, pani dr hab. Małgorzacie Komorowskiej i panu dr Krzysztofowi Bieleckiemu za pomoc w wykonaniu części eksperymentów,*
- *Śp. pani Basi Patrykiewicz za ogromną życzliwość i niezawodną pomoc w laboratorium w trakcie wykonywania doświadczeń,*
- *Pracownikom Katedry Fizyki Biofizyki Akademii Rolniczej za serdeczność i miłą współpracę,*
- *Kochanym Rodzicom, Bratu i Bratowej oraz wszystkim, którzy wspierali mnie w czasie studiów.*

Pracę tę dedykuję mojemu Mężowi Januszowi.

Spis treści:

Spis stosowanych nazw i skrótów	3
I. Wstęp	4
II. Część ogólna	6
II.1. Struktura i funkcje błony biologicznej	6
II.1.1. Struktura błony biologicznej	6
II.1.2. Funkcje błony biologicznej	10
II.2. Błona erytrocytów	11
II.2.1. Struktura i funkcje błony erytrocytów	11
II.2.2. Błona erytrocytów jako model błony biologicznej	16
II.3. Zmiana parametrów fizycznych błony erytrocytów pod wpływem związków biologicznie aktywnych	17
II.3.1. Podatność na hemolizę i oporność osmotyczna	17
II.3.2. Płynność błony erytrocytów	19
II.3.3. Zmiana kształtu erytrocytów	29
II.4. Wybrane związki biologicznie aktywne	34
II.4.1. Klasyfikacja i właściwości pestycydów	34
II.4.2. Związki stosowane w badaniach	36
II.4.2.1. Związki organiczne fosforu	36
II.4.2.2. Bioaktywne składniki herbicydów stosowane w mieszaninach	39
II.4.3. Cele łączenia związków	44
III. Cel pracy	46
IV. Materiały i metody	48
IV.1. Materiały	48
IV.1.1. Erytrocyty i cienie erytrocytów	48
IV.1.2. Rośliny wyższe stosowane w testach biologicznych	48
IV.1.3. Roztwory	48
IV.1.4. Odczynniki	49
IV.1.5. Substancje stosowane w pracy	49
IV.2. Metody	53
IV.2.1. Metoda spektroskopii absorpcyjnej	53
IV.2.1.1. Toksyczność hemolityczna związków	53
IV.2.1.2. Toksyczność hemolityczna mieszanin równomolarnych	53
IV.2.1.3. Toksyczność hemolityczna mieszanin nierównomolarnych	55

IV.2.1.4. Oporność osmotyczna erytrocytów	56
IV.2.2. Metoda spektroskopii fluorescencyjnej	57
IV.2.2.1. Wyznaczanie polaryzacji i anizotropii fluorescencji	57
IV.2.2.2. Wyznaczanie uogólnionej polaryzacji	57
IV.2.3. Metoda mikroskopowa badania kształtu erytrocytów	58
IV.2.4. Badanie stopnia inhibicji wzrostu roślin wyższych	59
IV.2.5. Badanie wydajności kiełkowania nasion	60
V. Wyniki badań	61
V.1. Toksyczność hemolityczna związków i ich mieszanin	61
V.1.1. Toksyczność hemolityczna badanych związków	61
V.1.2. Toksyczność hemolityczna mieszanin równomolarnych badanych związków z 2,4-D i FMG	63
V.1.3. Toksyczność hemolityczna mieszanin nierównomolarnych badanych związków z 2,4-D i FMG	68
V.2. Oporność osmotyczna erytrocytów	71
V.3. Wpływ badanych związków na płynność błony erytrocytów	72
V.4. Wpływ badanych związków na kształt erytrocytów	77
V.5. Wpływ badanych związków i ich mieszanin na inhibicję wzrostu roślin wyższych	80
V.6. Wpływ badanych związków i ich mieszanin na kiełkowanie roślin wyższych	83
V.7. Zestawienie efektów uzyskanych z oddziaływania mieszanin związków z erytrocytami	86
VI. Dyskusja	88
VII. Wnioski	100
VIII. Streszczenie	102
IX. Literatura	104

Spis stosowanych nazw i skrótów

2,4-D - kwas (2,4-dichlorofenoksy)octowy

AFa-1 - Ester di-n-butyłowy kwasu 2-(N-n-butyloamino) heptanofosfonowego-2

AFa-2 - Ester di-n-butyłowy kwasu 2-(N-n-cykloheksyloamino) heksanofosfonowego-2

AFa-3 - Ester di-etyłowy kwasu 2-(N-n-butyloamino) heptanofosfonowego-2

AFa-4 - Ester di-n-butyłowy kwasu 2-(N-n-propyloamino) heksanofosfonowego-2

AFa-5 - Ester di-n-butyłowy kwasu 2-(N-n-oktyloamino) propanofosfonowego-2

AFa-6 - Ester di-etyłowy kwasu 1-(N-n-pentyloamino) dekanofosfonowego-1

AFa-7 - Ester di-etyłowy kwasu 1-(N-n-pentyloamino) heptanofosfonowego-1

AFa-n - Aminofosfoniany acykliczne

AFc-1 - Ester di-n-propylowy kwasu 4-n-butylo, 1-(n-butyloamino)
cykloheksanofosfonowego-1

AFc-2 - Ester di-n-butyłowy kwasu 1-(n-butyloamino) cyklopentanofosfonowego-1

AFc-3 - Ester di-n-butyłowy kwasu 1-(n-tetradecyloamino) cykloheksanofosfonowego-1

AFc-4 - Ester di-n-butyłowy kwasu 1-(n-oktyloamino) cykloheksanofosfonowego-1

AFc-5 - Ester di-etyłowy kwasu 1-(n-butyloamino) cykloheksanofosfonowego-1

AFc-n - Aminofosfoniany cykliczne

AFm-1 - Ester di-etyłowy kwasu 9-(n-butyloamino) fluorenofosfonowego-9

AFm-2 - Ester di-n-oktyłowy kwasu 9-(n-butyloamino) fluorenofosfonowego-9

AFm-3 - Ester di-n-undecylowy kwasu 9-(n-butyloamino) fluorenofosfonowego-9

AFm-n - Aminofosfoniany pochodne fluorenu

Aldehyd glutarowy – $\text{OHC}(\text{CH}_2)_3\text{CHO}$;

DMF – dimetyloformamid;

DPH- 1,6-difenylo-1,3,5-heksatrien

FMG – N-(fosfonometylo)glicyna (glifosat)

Laurdan – 2-dimetyloamino-6-laurylonaftalen

Odczynnik Bradford – stosowany do oznaczania stężenia białka w cieniach erytrocytów

p – poziom ufności

TMA-DPH - p-toluenosulfonian [1-(4-trimetyloamoniofenylo)-6-fenylo-1,3,5-heksatrienu]

TMAP-DPH-p-toluenosulfonian N-[1-propylo-(4-trimetyloamoniofenylo)-6-fenylo-1,3,5-heksatrienu]

TU- jednostka toksyczności (toxic unit)

I. Wstęp

Współczesne rolnictwo, w celu podniesienia produkcji roślinnej, wymaga stosowania m. in. odpowiednich środków ochrony roślin z grupy pestycydów. Substancje te tracą z upływem czasu swoją skuteczność działania, ze względu na uodpornianie się układów biologicznych, przeciwko którym są skierowane. Istnieje zatem ciągła potrzeba stałego poszukiwania nowych skutecznych związków biologicznie aktywnych z grupy pestycydów. Badania nad nowymi środkami ochrony roślin, w tym także nad herbicydami, prowadzone są intensywnie na całym świecie, są to jednak badania kosztowne i długotrwałe. Szacuje się, że aby uzyskać 1 lub 2 nowe, skutecznie działające pestycydy należy zsyntetyzować i wnikliwie przetestować kilkanaście tysięcy związków, a to zajmuje ok. 10 lat.

Z tego powodu, w ramach poszukiwania nowych skuteczniejszych substancji z grupy pestycydów, łączy się ze sobą substancje znane i już stosowane w rolnictwie, z nowymi związkami w mieszaniny dwu- lub wieloskładnikowe. Badania prowadzone w tym kierunku, mają na celu wyłonienie takich mieszanin, które wykazują znacznie wyższą skuteczność biologiczną, aniżeli poszczególne jej składniki. Efekt taki można uzyskać tylko wtedy, kiedy poszczególne składniki utworzonej mieszaniny, wzajemnie się wspomagają w oddziaływaniu z organizmami, wykazując działanie synergiczne. Oprócz wysokiej aktywności mieszanina taka posiada inne walory. Istnieje mniejsze ryzyko indukowania odporności układów biologicznych, które ma miejsce w przypadku stosowania pojedynczych substancji, ponadto mieszaniny pestycydów posiadają poszerzone spektrum działania.

Skutki działania różnych substancji biologicznie aktywnych z grupy pestycydów na organizmy żywe są znane od dawna, do chwili obecnej nie zostały jednak w pełni poznane molekularne mechanizmy tego oddziaływania. Związki te przy zetknięciu z organizmem żywym na poziomie komórkowym trafiają w pierwszym rzędzie na błonę komórkową, zatem w bezpośrednim oddziaływaniu z nią mogą wykazywać działanie toksyczne. Mogą one pozostać w błonie, zaburzając jej strukturę i funkcje, lub też wnikają do wnętrza komórki i tam wywierają swoje główne działanie.

Toksyczny wpływ prezentowanych w tej pracy nowych związków organicznych fosforu, które stanowią grupę potencjalnych herbicydów, na błonę biologiczną jest m. in. związany z ich właściwościami litycznymi, czego dowodzi indukowana przez nie hemoliza krwinek czerwonych. Wbudowane do błony erytrocytów związki indukują zmiany struktury i właściwości błony, a przy odpowiednio wysokich stężeniach substancje te powodują uszkodzenie błony i hemolizę.

Podjęte w tej pracy badania miały na celu ocenę aktywności biologicznej nowych związków z grupy aminofosfonianów, na podstawie ich wpływu na błonę erytrocytów, traktowaną jako model błony biologicznej. Celem badań, o znaczeniu podstawowym, było również określenie mechanizmu oddziaływania tych substancji z modelową błoną biologiczną na poziomie molekularnym. Badania dotyczyły również aktywnych składników stosowanych w rolnictwie herbicydów, a także mieszanin dwuskładnikowych aminofosfonianów z herbicydami.

Do badań zostały wybrane substancje zróżnicowane pod względem struktury chemicznej: aminofosfoniany acykliczne, cykliczne i pochodne fluorenu. W ramach jednej grupy związki różniły się między sobą strukturą podstawników przy atomach: węgla, fosforu i azotu. Taki wybór związków umożliwił określenie wpływu, jaki mają pierścienie aromatyczne oraz poszczególne grupy funkcyjne związku na jego aktywność biologiczną.

Aktywność biologiczną związków określano w pierwszym rzędzie na podstawie ich oddziaływania z błoną erytrocytów oraz porównano z ich aktywnością w odniesieniu do roślin wyższych. W szczególności aktywność użytych w pracy substancji określano na podstawie zmian parametrów fizycznych wynikających ze zmiany struktury i właściwości błony erytrocytów takich jak: zmiana oporności osmotycznej erytrocytów, zmiana płynności błony i zmiana kształtu erytrocytów. Parametry te zostały zmierzone przy wykorzystaniu metod: spektroskopii absorpcyjnej, spektroskopii fluorescencyjnej, mikroskopowego badania kształtu erytrocytów, stopnia inhibicji wzrostu roślin wyższych i wydajności kiełkowania nasion. Określano również aktywność związków na podstawie ich destrukcyjnego działania na błonę, powodującego indukowanie hemolizy, która wyrażona jest jako toksyczność hemolityczna związku.

II. Część ogólna

II.1. Struktura i funkcje błony biologicznej

II.1.1. Struktura błony biologicznej

Błona biologiczna jest jednym z głównych elementów struktury wszystkich organizmów żywych, oddzielającym od siebie poszczególne komórki i organelle komórkowe. Zapewnia ona integralność przestrzenną, ograniczając objętość komórki oraz pozwala na przestrzenne zróżnicowanie przedziałów wewnątrzkomórkowych. Wszystkie istniejące w komórce organelle komórkowe otoczone są błoną plazmatyczną, co umożliwia izolację głównych szlaków metabolicznych w komórce. Z podziału komórki na ograniczone błoną wewnętrzną przedziały wynika wiele korzyści. Skupienie cząsteczek uczestniczących w określonych reakcjach chemicznych w niewielkiej części całkowitej objętości komórki powoduje, że szybkość reakcji znacząco wzrasta. Ograniczenie przedziałów błoną pozwala na utrzymywanie pewnych bardzo reaktywnych związków w izolacji od innych części komórki, które mogłyby być przez nie przypadkowo uszkodzone.

Głównymi składnikami błony komórkowej są białka i lipidy. Ich zawartość procentowa zależy od rodzaju błony. Dużą zawartość lipidów posiada błona, która pełni głównie funkcję ochronną, przykładem są osłonki mielinowe włókien nerwowych, w których faza lipidowa stanowi ok. 80 % masy błony. Zupełnie inne są proporcje białek i lipidów w wewnętrznej błonie mitochondriów, zawiera ona bowiem ok. 80 % białek a tylko 20 % lipidów, co wiąże się z ważną rolą tej błony w złożonych procesach metabolicznych.

Lipidy błonowe można podzielić na następujące główne klasy:

- **Glicerofosfolipidy**- fosfatydylocholina, fosfatydyloetanolamina, fosfatydyloseryna, fosfatydyloinozytol, fosfatydyloglicerol, difosfatydyloglicerol, plazmogeny,
- **Fosfosfingolipidy**- sfingomielina,
- **Glikoglicerolipidy**- monogalaktozodiglicerol, digalaktozodiglicerol,
- **Glikosfingolipidy**- cerebrozyd, gangliozydy,
- **Sterole**- cholesterol, sitosterol, stigmasterol, ergosterol,
- **Inne** - mono-, di- i trialkiloglicerole, lipidy bipolarne, sulfolipidy.

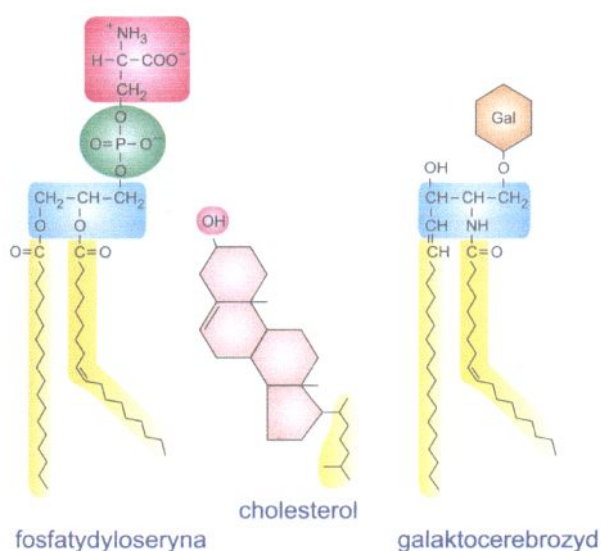
Oprócz steroli (mała grupa polarna), wszystkie wymienione klasy lipidów mają wyraźnie wyodrębnioną część polarną (hydrofilową) i część niepolarną (hydrofobową). Grupy polarne mogą mieć wypadkowy ładunek różny od zera. Takimi lipidami są: fosfatydyloseryna i fosfatydyloinozytol. Fosfatydylocholina i sfingomielina należą do fosfolipidów dipolowych, o wypadkowym ładunku równym zero i są one najpowszechniej spotykanymi lipidami w błonach komórkowych. Pod względem ilości z fosfolipidami konkuruje cholesterol, którego zawartość procentowa w niektórych błonach może stanowić nawet połowę całkowitej ilości lipidów.

Poszczególne lipidy mogą różnić się liczbą łańcuchów alkilowych (1, 2, 3 i 4), stanowiących część hydrofobową lipidów, ich długością (zwykle od 12 do 24 atomów węgla) i stopniem nienasycenia (zwykle od 1 do 6 wiązań podwójnych). Najczęściej jednak lipidy posiadają 2 łańcuchy węglowodorowe. Lizofosfolipidy należące do glicerofosfolipidów mają tylko jeden łańcuch alkilowy, natomiast kardiolipina (difosfatydyloglicerol) jest glicerofosfolipidem mającym cztery łańcuchy. Zdecydowana większość kwasów tłuszczowych występujących w fosfolipidach posiada parzystą liczbę atomów węgla [Benga i Holmes, 1984; Kuypers i inni, 1985; Sackmann, 1995; Huijbregts i inni, 2000; Bernhardt i Ellory, 2003; McMullen i inni, 2004].

Funkcją lipidów błonowych jest nie tylko tworzenie struktury bimolekularnej, lecz również pełnią one szereg ważnych funkcji fizjologicznych [Przestalski, 1988; Gennis, 1989; Leśniak i Porębska, 1993; Stryer, 1997; Kleszczyńska, 1999; Chong i Sugar, 2002].

Do najważniejszych funkcji lipidów należą:

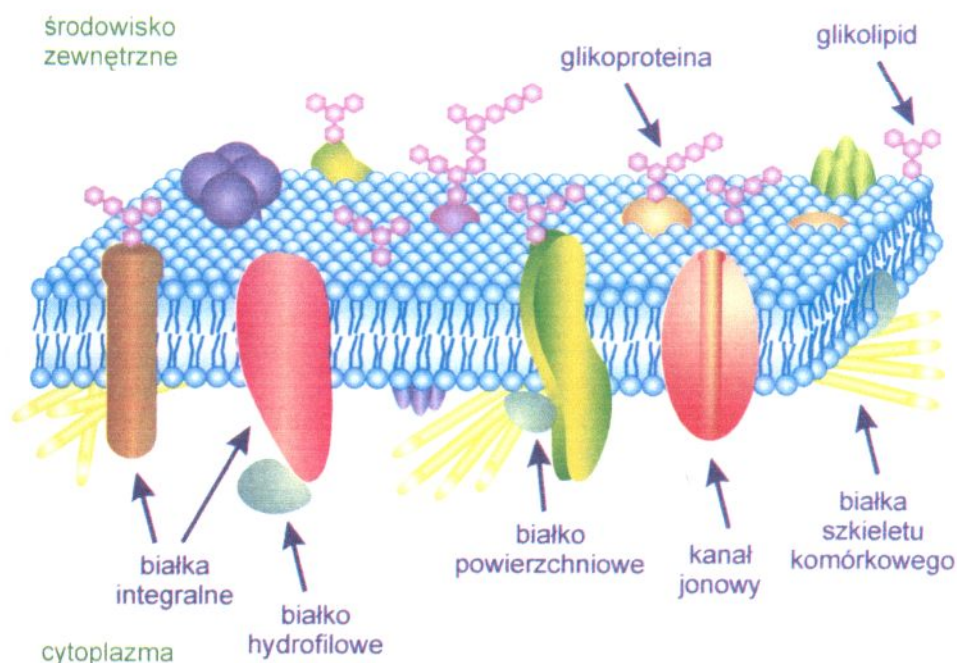
- tworzenie stabilnej dwuwarstwy, w której funkcjonują białka,
- stabilizacja niektórych obszarów błony,
- transport substancji rozpuszczalnych w lipidach,
- regulowanie procesów metabolicznych,
- udział w syntezie makromolekuł,
- optymalizacja aktywności enzymów błonowych,
- regulacja wzrostu komórek, ich adhezji oraz wiązania się ze specyficznymi receptorami błony cytoplazmatycznej.



Rys. 2.1. Struktury wybranych lipidów błonowych [za Dołowy i inni, 2003].

Białka błonowe występują w postaci „czystej” (bez żadnych dodatkowych makromolekuł), w postaci glikoprotein (z przyłączonymi resztami cukrowymi), lipoprotein (w postaci białek z przyłączonymi łańcuchami węglowodorowymi kwasów tłuszczowych). Ze względu na lokalizację w błonie białka można sklasyfikować jako białka powierzchniowe (peryferyjne) i wewnętrzne (integralne). Białka powierzchniowe połączone są z dwuwarstwą lipidową za pomocą oddziaływań słabych, głównie elektrostatycznych. Mogą one łączyć się z częścią hydrofilową cząsteczek lipidów lub z białkami integralnymi. Białka integralne oddziałują elektrostatycznie w części hydrofilowej błony i hydrofobowo z jej wnętrzem hydrofobowym. Białka błonowe pełnią różne funkcje w komórce np.: receptorów, pomp i „furtek” molekularnych. Należą do nich m.in. białka błonowe wchodzące w skład cytoszkieletu oraz enzymy ważnych szlaków metabolicznych lub sygnałowych [Baumeister i inni, 1981; Benga i Holmes, 1984; Gennis, 1989; Devaux, 1992; Leśniak i Porębska, 1993; Kumari i inni, 1993; Stryer, 1997; Bernthard i Ellory, 2003].

Model błony komórkowej, biorący pod uwagę aspekty zarówno strukturalne, jak i funkcjonalne został stworzony w 1972 roku przez Singera i Nicholsona. Model ten przedstawia błonę biologiczną jako płynną mozaikę białek zanurzonych w dwuwarstwie lipidowej i przyłączonych do niej białek powierzchniowych.



Rys. 2.2. Model błony komórkowej [za Dołowy i inni, 2003].

Pozwala on wytłumaczyć niektóre procesy dynamiczne takie jak: dyfuzja lateralna (powierzchniowa) lipidów i białek powierzchniowych, dyfuzja rotacyjna lipidów, ruchy oscylacyjne łańcuchów lipidowych oraz dyfuzja typu „flip-flop” (w poprzek błony) lipidów z jednej monowarstwy do drugiej. Dowiedziono również, że monowarstwy są pod względem składu lipidów, niejednorodne. W miarę rozwoju badań nad strukturą błony, model Singera i Nicholsona był stopniowo wzbogacany. Odkryto między innymi, że na powierzchni błony istnieją tzw. „domeny lipidowe”, czyli grupy lipidów, których lokalne właściwości różnią się od właściwości globalnych dwuwarstwy (np. stanem skupienia). Wzbogacenie modelu „płynnej mozaiki” o koncepcje kształtu molekularnego cząsteczek lipidowych, pozwala wytłumaczyć fakt, tworzenia przez lipidy membranowe nie tylko warstwy dwumolekularnej, mogą one również tworzyć struktury nielamelarne np.: odwróconą fazę heksagonalną. Kolejną teorią uzupełniającą model Singera i Nicholsona jest teoria zgodności hydrofobowych, mówiąca o kooperatywnych oddziaływaniach białko-lipid, lipid-lipid związanych z dopasowaniem elementów hydrofobowych cząsteczek białek i lipidów [Gennis, 1989; Kumari i inni, 1993; Sackmann, 1995; Przestalski, 1988; Langner i Sarapuk, 1997].

Błonę biologiczną traktuje się obecnie jako twór dynamiczny, asymetryczny, niejednorodny zarówno powierzchniowo jak i przestrzennie. Wszystkie jej składniki biorą udział w procesach fizjologicznych komórki. Asymetria błony ma swoje odbicie zarówno w rozmieszczeniu lipidów jak i białek. Wykazano, że reszty cukrowe glikoprotein oraz glikoglicerolipidów znajdują się tylko po zewnętrznej stronie dwuwarstwy lipidowej, a

większość białek enzymatycznych, a także spektryna po wewnętrznej stronie (cytozolowej). Faza ciekłokrystaliczna, w jakiej znajduje się błona biologiczna w warunkach fizjologicznych, zapewnia jej składnikom odpowiednią ruchliwość, niezbędną do pełnienia przez nie określonych funkcji w komórce.

II.1.2. Funkcje błony biologicznej

Błona komórkowa pełni szereg bardzo istotnych i niezbędnych dla życia komórki funkcji. Podstawowe funkcje odnoszące się do błon biologicznych to:

- funkcja ochronna - pozwalająca na utrzymanie integralności komórki,
- funkcja transportowa - obejmująca transport czynny i bierny w komórce oraz regulację transportu,
- funkcja energetyczna - pozwalająca na zachodzenie przemian energetycznych w komórce w tym głównie oddychania i fotosyntezy,
- funkcja elektryczna - pozwalająca na przekazywanie impulsów elektrycznych,
- funkcja przedziałowa - tworzenie fizycznych granic pomiędzy strukturami komórki, co pozwala na kontrolę ich składu,
- funkcja receptorowa - pozwalająca na przekazywanie informacji poprzez hormony oraz tworzenie optymalnego środowiska dla działania niektórych enzymów, pomp jonowych i receptorów [Benga i Holmes, 1984; Pasternak, 1985; Gennis, 1989; Bernhardt i Ellory, 2003].

Błona komórkowa stanowi przede wszystkim barierę mechaniczną oddzielającą komórkę od środowiska zewnętrznego, a zatem pełni funkcję ochronną. Dzięki niej komórka zachowuje swoją integralność, a jej zniszczenie prowadzi do śmierci komórki. Błona komórkowa odpowiada za transport bierny i aktywny substancji (wody, jonów, pożywienia, ksenobiotyków itp.) do wnętrza lub na zewnątrz komórki. Błona komórkowa pełni również funkcję energetyczną poprzez sterowanie procesami energetycznymi, takimi jak oddychanie czy fotosynteza, niezbędnymi w przemianach energetycznych zachodzących w komórce, a tym samym koniecznymi w utrzymywaniu jej przy życiu. Jest ona odpowiedzialna również za generowanie potencjałów czynnościowych i spoczynkowych (np. za wytwarzanie i przesyłanie impulsów nerwowych), pełniąc tym samym funkcje elektryczne. Wewnątrz komórki błona cytoplazmatyczna oddziela od siebie różne organelle komórkowe, co umożliwia jednoczesne zachodzenie wielu różnych, a niejednokrotnie konkurencyjnych reakcji chemicznych i ma ona także decydujący wpływ na ich szybkość. Błona biologiczna

ma wpływ na rozpoznawanie komórek, ich fuzję i podziały komórkowe. Ponadto przekazuje ona różne informacje, co wiąże się z jej funkcją receptorową, głównie poprzez odbieranie bodźców zewnętrznych i transdukcję sygnałów hormonalnych. Jest także zaangażowana w zjawiska immunologiczne, histogenezę i agregację komórek. Błona cytoplazmatyczna jest więc miejscem wielu ważnych reakcji chemicznych, w większości stymulowanych przez enzymatyczne białka błonowe.



Rys. 2.3. Zdjęcie błony komórkowej w mikroskopie elektronowym
[http://cellbio.utmb.edu/cellbio/membrane_intro.htm].

II.2. Błona erytrocytów

II.2.1. Struktura i funkcje błony erytrocytów

Błony krwinek czerwonych różnych zwierząt zawierają od 46 % do 55 % białek, 35 % do 45 % lipidów i ok. 10 % węglowodanów [Bernhardt i Ellory, 2003]. Erytrocyty poszczególnych gatunków zwierząt różnią się w niewielkim stopniu składem i zawartością procentową poszczególnych białek i lipidów w monowarstwach błony, np.: błona erytrocytów ludzkich składa się z 41 % lipidów, 52 % białek i 7 % węglowodanów [Dodge i inni, 1963].

Błona erytrocytów różnych gatunków zwierząt należy do najczęściej badanych i jej struktura jest najlepiej poznana. Podstawowym elementem strukturalnym błony erytrocytu, podobnie jak wszystkich błon biologicznych, jest dwuwarstwa lipidowa z integralnymi i powierzchniowymi białkami błonowymi. Rozdział białek błonowych przy użyciu elektroforezy wykazał, że błona erytrocytu zawiera ponad 100 różnych białek, w tym ok. 10 najbardziej znaczących [Bernhardt i Ellory, 2003]. Rodzaj i rozmieszczenie białek względem fazy lipidowej zależą od funkcji, jaką pełnią one w błonie. Do białek integralnych, które przenikają dwuwarstwę lipidową należą między innymi: transportowe białka kanałowe i

białka receptorowe. Wiele z tych białek np.: glikoforyny A, B i C, to glikoproteiny zawierające łańcuchy oligosacharydowe. Fragmenty zawierające oligosacharydy zlokalizowane są w zewnętrznej warstwie błony biologicznej. Węglowodany połączone z białkami integralnymi i lipidami tworzą glikokaliks, który otacza komórkę tzw. „płaszczem” o średniej grubości ok. 6 nm i jest stabilizowany przez jony i słabe oddziaływania między cukrami i łańcuchami lipidowymi. Znaczącą rolę stabilizującą odgrywają w nim również siły kulombowskie i stopień hydratacji. Glikokaliks również wpływa na występowanie kanałów anionowych a także determinuje ujemny potencjał komórki i czynnik Rh oraz ma wpływ na kształt krwinki [Sikorski i inni, 1993].

Inne białka integralne takie jak: białko pasma 3 i glikoforyna C łączą się z białkami tworzącymi szkielet membrany.

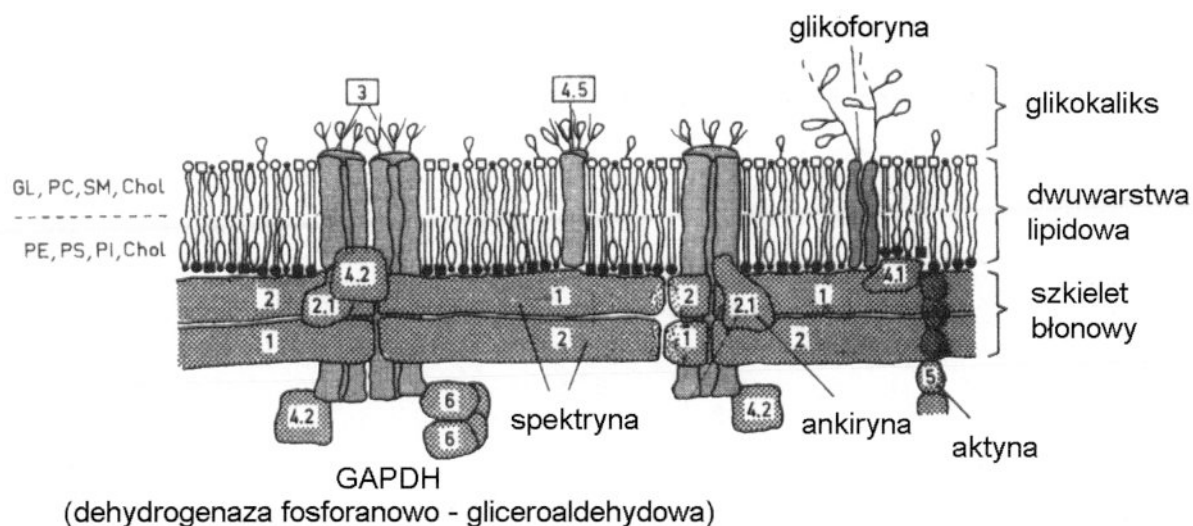
Białka powierzchniowe (peryferyjne), z których większość znajduje się po stronie cytoplazmatycznej błony erytrocytu, to białka enzymatyczne i białka strukturalne wchodzące w skład cytoszkieletu komórki. Białkami cytoszkieletowymi są między innymi: spektryna α i β , aktyna, ankiryna, tropomiozyna, miozyna, białko 4.1 i adducyna, łącząca spektrynę z aktyną. Spektryna i aktyna stabilizowane przez pozostałe białka tworzą sieć cytoszkieletu i łączą się poprzez białko 4.1 z integralnym białkiem pasma 3 i glikoforyną w układ zwany szkieletem komórkowym lub błonowym [Bernhardt i Ellory, 2003; Teti i inni, 2002].

Szkielet błonowy erytrocytów należy do najlepiej poznanych szkieletów błonowych komórek [Baumeister i inni, 1981; Sheetz i Dai, 1996], pełni on wiele ważnych funkcji, do których należą m. in.:

- zapewnienie odpowiednich właściwości mechanicznych krwinki,
- utrzymanie integralności błony,
- regulacja ruchliwości i rozmieszczenia białek,
- udział w utrzymaniu asymetrii lipidów błonowych.

Układ składników i wewnętrzna organizacja błony erytrocytu jest przedstawiona na rys.

2.4.



Rys.2.4. Schematyczna struktura błony ludzkich erytrocytów. Średnia grubość glikokaliks wynosi ok. 6 nm – w pojedynczych miejscach może dochodzić do 15 nm. Grubość dwuwarstwy lipidowej wynosi ok. 4 nm. Przybliżoną grubość szkieletu oszacowano na 20-30 nm, w skład którego wchodzi: spektryna (1,2), aktyna (5), białka białkowe (6), białko pasma 3 (3), glikoforyna C, białka integralne (4.5), ankiryna (2.1) oraz białka 4.1 i 4.2 [Bernhardt i Ellory, 2003].

Lipidy zawarte w błonie erytrocytów można podzielić na trzy grupy [Bernhardt, Ellory; 2003]: lipidy neutralne (25,2 %) oraz lipidy polarne: fosfolipidy (62,7 %) i glikolipidy (ok.12 %). Lipidem neutralnym jest głównie cholesterol [Gregg i Reithmeier, 1983; Parasassi i inni 1994, 1995]. Fosfolipidy dzielą się na: fosfosfingolipidy, do których należy 26 % sfingomieliny (SM) oraz glicerofosfolipidy, do których należą: fosfatydylocholina (PC) - 30 %, fosfatydyloetanolina (PE) - 27 % i fosfatydyloseryna (PS) - 13 %, a także kilka mniejszych frakcji: kwas fosfatydowy, lizo-PC, fosfatydyloinozytol (PI) - jedno i dwufosfonowy [Kuypers i inni, 1985]. Glikolipidy pełnią bardzo ważne funkcje w błonie erytrocytów, gdyż ich fragmenty oligosacharydowe współtworzą grupy krwi. Błona erytrocytów ludzkich zawiera: 20 % cholesterolu, 20 % PC, 18 % PE, 7 % PS, 3 % PI, 18 % SM, 3 % glikolipidów a 11 % stanowią inne lipidy.

W błonie erytrocytu utrzymywana jest asymetria lipidowa [Devaux, 1991, 1992], która związana jest z różnymi funkcjami lipidów. Fosfatydyloseryna i fosfatydyloinozytol zlokalizowane są tylko w wewnętrznej monowarstwie, zaś glikolipidy znajdują się tylko w zewnętrznej monowarstwie. Fosfatydylocholina i sfingomielina występują przede wszystkim w monowarstwie zewnętrznej, natomiast fosfatydyloetanolina głównie w wewnętrznej monowarstwie lipidowej. Taki rozkład lipidów wiąże się z różnymi ich funkcjami, jakie pełnią w kontaktującej się ze środowiskiem warstwie zewnętrznej, oraz w warstwie

wewnętrznej stykającej się z cytoplazmą. Asymetryczne rozmieszczenie fosfolipidów w dwuwarstwie erytrocytów ludzkich jest utrzymywane poprzez odpowiednie mechanizmy aktywne i bierne, w których ważną rolę odgrywają białka enzymatyczne fosfolipaza A i sfingomelinazy. Asymetria dotyczy więc zarówno rodzaju lipidu, jak również zawartości procentowej lipidów w danej monowarstwie (Rys.2.5) [Pasternak, 1995; Schneider i inni, 1986; Haest i inni, 1997; Schwarz i inni, 1999 a; Pomorski i inni, 2001; Devaux, 1988, 2000; Devaux i inni, 2002].

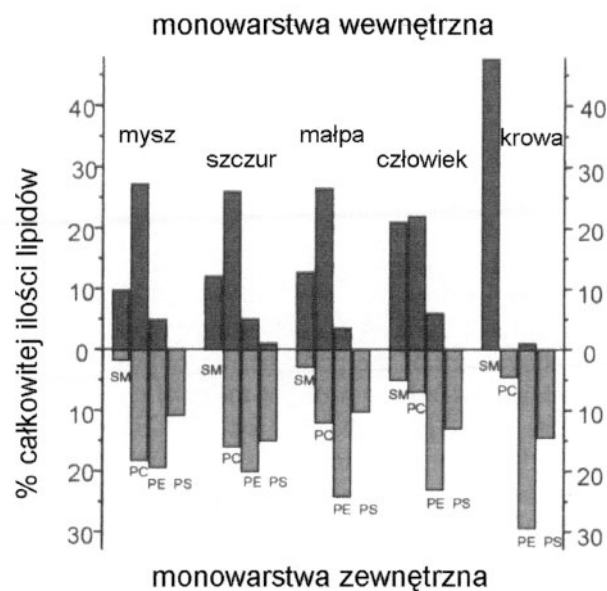
zewnątrzna monowarstwa							
PC		PE	SM		GL	Cholesterol	Białko
PC	PE		SM	PS	PI	Cholesterol	
wewnętrzna monowarstwa							

Rys.2.5. Rozkład lipidów i białek w błonie erytrocytów ludzkich [Bernhardt i Ellory, 2003].

Kwasy tłuszczowe w fosfolipidach różnią się główkami polarnymi, długościami łańcuchów węglowodorowych, ich nasyceniem oraz pozycją glicerolu. W związku z tym wyróżniamy ponad 400 rodzajów lipidów różniących się strukturą, geometrią i gęstością ładunków oraz ruchliwością lateralną, transwersalną i rotacyjną [Schroit, 1991].

Skład lipidowy membrany erytrocytów jest raczej stabilny, gdyż erytrocyty z natury nie syntetyzują fosfolipidów. Duże znaczenie w funkcjonowaniu błony erytrocytów mają też mikrodomeny lipidowe tworzące się w pobliżu integralnych białek błonowych [Bandorowicz-Pikuła, 1995; Pułaski, 1995; Iglic i inni, 1996; Edidin, 1997; Gallet i inni, 1999].

Skład lipidowy błony erytrocytów jest różny u różnych gatunków ssaków. Erytrocyty różnych gatunków różnią się składem lipidów, np.: erytrocyty myszy i szczurów mają wysoką zawartość PC (42-45 %) a niską zawartość SM (12 %) zaś erytrocyty przeżuwaczy, takich jak owce czy woły, mają niską zawartość PC (0-4 %) a wysoką zawartość SM (47-50 %) [Weng i inni, 1996].



Rys. 2.6. Asymetria lipidów w erytrocytach różnych ssaków [Bernhardt i Ellory, 2003].

Błona erytrocytów człowieka, pod względem składu lipidów, jest najbardziej zbliżona do błony erytrocytów świni, co przedstawia tab.2.1. [Szwarocka i Józwiak, 1999; Ziegler i inni, 2004; Vranic-Mandusic i inni, 2004].

Tab.2.1. Zawartość procentowa lipidów w błonach erytrocytów świni i człowieka. Chol-cholesterol, PC-fosfatydylocholina, SM-sfingomielina, PE-fosfatydyloetanolamina, PS-fosfatydyloseryna, PI-fosfatydyloinozytol, PA-kwas fosfatydowy, LizoPC-lizofosfatydylocholina, GSL-glikosfingolipidy [Deuticke, 1977].

Lipid	Świnia	Człowiek
Chol	26,8	26,0
PC	13,9	17,5
SM	15,8	16,0
PE	17,7	16,6
PS	10,6	7,9
PI	1,1	1,2
PA	<0,2	0,6
LizoPC	0,5	0,9
GSL	13,4	11,0

II.2.2. Błona erytrocytów jako model błony biologicznej

Erytrocyty od dawna są wykorzystywane w badaniach błon biologicznych z uwagi na łatwość ich uzyskania oraz dobrze poznaną budowę, pozwalającą na analizę składu i struktury komórki oraz możliwość opisu własności mechanicznych i transportowych błon. Komórki erytrocytów nie mają organelli komórkowych, a więc jedyną ich błoną jest błona cytoplazmatyczna. Praktycznie całą zawartość cytoplazmatyczną tych komórek można usunąć na drodze kontrolowanej hemolizy osmotycznej, dzięki której z komórki wypływa jej zawartość wraz z hemoglobina. Powstająca błona komórkowa wypełniona płynem fizjologicznym nazywana jest cieniem erytrocytu. Komórki erytrocytów są intensywnie badane, ze względu na ich ważne funkcje biologiczne i wrażliwość na wiele procesów chorobowych, a ze względu na łatwość ich uzyskiwania i stosunkowo długi okres życia, wykorzystywane są często w badaniach *in vitro* jako komórki modelowe. Badania prowadzone na krwinkach czerwonych umożliwiły zebranie znacznej ilości informacji popartych doświadczalnie, w tym także dotyczących asymetrii funkcjonalnej i strukturalnej błony plazmatycznej. Szereg prac prowadzonych na erytrocytach dotyczy wpływu czynników fizykochemicznych na te komórki, a w szczególności na właściwości i funkcje błony erytrocytów, traktowanej jako model błony biologicznej [Akahroni i inni, 1999; Andrade i inni, 2004; Bazzoni i Rasia, 2001; Bukowska i inni, 2000; Bukowska, 2004; Deuticke, 1977; Iglic i inni, 2004; Kleszczyńska i inni, 1998, 2000 a, b, c, 2003; Klingen, 2002; Komorowska i inni, 2002; Moore i inni, 1999; Repina i inni, 2004; Gwoździński, 1995; Schrier i inni, 1992; Suwalski i inni, 1996, 2000 a, b, 2003, 2004].

Badania prowadzone na erytrocytach są źródłem informacji zarówno o zmianach w strukturze błony biologicznej, jak i dotyczących procesów w niej zachodzących. Są to m.in badania:

- płynności błony,
- toksyczności związków biologicznie aktywnych,
- transportu biernego i aktywnego różnych substancji przez błony,
- zmiany kształtu komórek wywołane przez ksenobiotyki,
- aktywności związków powierzchniowo czynnych w zależności od ich struktury.

W przeprowadzonych w tej pracy badaniach błonę erytrocytu traktowano zarówno jako przykład, jak i model błony biologicznej.

Związki biologicznie aktywne oddziałujące z błoną erytrocytów, w zależności od struktury, mogą wywierać na nią wpływ niszczący bądź ochronny.

W Katedrze Fizyki i Biofizyki AR we Wrocławiu od wielu lat prowadzone są intensywne badania nad wpływem związków biologicznie aktywnych na błony erytrocytów, czarne błony lipidowe, błony liposomów oraz glonów. Badania te mają na celu określenie toksyczności badanych substancji i wyjaśnienie molekularnego mechanizmu ich oddziaływania z błoną biologiczną. Badania te dotyczą głównie takich związków jak:

- ✓ pestycydy [Kuczera i inni, 1982; Sarapuk i inni, 2000 a, b; Bonarska i inni, 2003 a];
- ✓ surfaktanty [Przestalski i inni, 1993; Kleszczyńska i inni, 2000 a, b, c; 2003];
- ✓ antyoksydanty [Gabrielska i inni, 1995, 1997, 2005; Kleszczyńska i inni, 1998 a, b; Przestalski i inni, 1996];
- ✓ organiczne związki cyny i ołowiu [Kuczera i inni, 1997; Przestalski i inni, 1997; Kleszczyńska i inni, 1999];
- ✓ związki lizosomotropowe [Kleszczyńska i inni, 1997, 1998 c; Lachowicz i inni, 1997]
- ✓ związki organiczne fosforu [Trela i inni, 2001; Bonarska i inni, 2002; Sarapuk i inni, 2003]
- ✓ naturalne oligosacharydy [Pawlaczyk i inni, 2003]

Dotychczasowe wyniki aktywności biologicznej wyżej wymienionych związków uzyskane w testach na błonach modelowych i biologicznych są zgodne z wynikami uzyskanymi na innych układach biologicznych - glonach, grzybach, roślinach wyższych. Stąd wynika, że prowadzone badania należy traktować jako podstawowe i w pełni uzasadnione.

II.3. Zmiana parametrów fizycznych błony erytrocytów pod wpływem związków biologicznie aktywnych.

II.3.1. Podatność na hemolizę i oporność osmotyczna

Wzrost przepuszczalności błony komórkowej erytrocytów w wyniku działania różnych substancji prowadzi do wypłynięcia składników komórki wraz z hemoglobina, w procesie zwanym hemolizą. W warunkach fizjologicznych błona krwinki czerwonej jest nieprzepuszczalna dla hemoglobiny, natomiast w różnym stopniu przepuszcza jony sodu, potasu, chloru, które wraz z hemoglobina traktowane są jako osmotycznie czynne składniki cytoplazmy krwinek czerwonych.

Wyróżniamy różne rodzaje hemolizy, uwzględniające rodzaj czynników, które ją wywołują. Hemoliza indukowana związkami biologicznie czynnymi, hemoliza osmotyczna,

mechaniczna, cieplna, elektryczna, hemoliza wywołana promieniowaniem np.: jonizującym czy świetlnym, hemoliza wywołana zaburzeniami strukturalnymi hemoglobiny, bądź zmianami w metabolizmie krwinek czerwonych w stanach patologicznych, jak również autohemoliza.

Hemoliza osmotyczna, wywołana jest różnicą stężeń określonej substancji wewnątrz i na zewnątrz erythrocytu. Ma ona miejsce np. po umieszczeniu erythrocytów w hipotonicznych roztworach chlorku sodowego, w których stężenie chlorku sodu jest niższe niż w komórce. Hemoliza ta może być procesem nieodwracalnym, polegającym na wypływie hemoglobiny w wyniku trwałego uszkodzenia struktury błony, lub może przebiegać w sposób kontrolowany i odwracalny. Hemolizę odwracalną wykorzystuje się przy preparacji cieni erythrocytów. W procesie tym wskutek kontrolowanego szoku osmotycznego wzrasta przepuszczalność błony erythrocytów w takim stopniu, że z komórki wypływa hemoglobina, a następnie w odpowiednich warunkach błona odzyskuje swoje właściwości transportowe [Dodge i inni, 1963]. Hemoliza osmotyczna stosowana jest przez wielu autorów jako metoda do badania trwałości struktury błony biologicznej i szybkości przenikania przez nią różnych substancji [Good i Rose, 1968; Mosior i Gomułkiewicz, 1989; Schrier i inni, 1992; Białas i inni, 2001; Bogner i inni, 2002; Andrade i inni, 2004].

Hemoliza mechaniczna wywołana jest urazami mechanicznymi, w tym także zbyt wysokim ciśnieniem zewnętrznym, występującym np. przy transfuzji krwi [Hansen i inni, 1998]. Boddźcem hemolizy cieplnej jest zmiana temperatury [Repina, 2004]. Hemoliza elektryczna wywołana jest zewnętrznym polem elektrycznym [Zimmermann i inni, 1976; Song i inni, 1993]. W czasie przechowywania erythrocytów ma miejsce autohemoliza [Pawelski, 1977]. Czynnikiem odpowiedzialnym za hemolizę jest także promieniowanie elektromagnetyczne np. świetlne lub jądrowe [Bolodon i inni, 1994; Kaestner, 2004; Gordiyenko i inni, 2004]. Jak wykazały badania, przyczyną tej hemolizy jest uszkodzenie błony erythrocytów przez reaktywne formy tlenu, nadtlenu, wtórne wolne rodniki związków organicznych, jak również produkty peroksydacji lipidów błony komórkowej [Silva, 2000; Fumiyoshi i inni, 2004; Bukowska i Kowalska, 2004]. Hemoliza może być wywołana przez niektóre składniki pożywienia oraz zmiany patologiczne erythrocytów w chorobach układu krwionośnego jak.: talasemia i anemia sierpowata [Bartos, 2003; Stryer, 1997].

Proces hemolizy może być wywołany różnego rodzaju substancjami biologicznie aktywnymi, takimi jak: leki, toksyny, pestycydy, inne surfaktanty oraz lipidy, które wbudowują się do błony erythrocytów i zmniejszają oddziaływanie między jej składnikami [Akahroni i inni, 1999; Bazzoni i Rasia, 2001; Bonarska i inni, 2002, 2003 a, b; Bryszewska i

inni, 1991; Bukowska i inni, 1998, 2000, 2003; Danieluk i inni, 1998; Duchnowicz i inni, 2002, 2003; Marczak i inni, 2004, Silva i inni, 2000, Suwalsky i inni, 1996, 1998 a, b, 1999, 2000, 2001, 2003]. Liczne badania wykazały, że w szczególności amfifilowe związki biologicznie aktywne charakteryzują się właściwościami litycznymi [Kleszczyńska i inni, 2001 a, b, c, 2003]. Mechanizm oddziaływania tych substancji z błoną erytrocytów nie jest do końca poznany, rozważa się wiele procesów, które mogą potencjalnie być przyczyną hemolizy, spowodowanych obecnością związków amfifilowych w błonie. Substancje te mogą zmieniać właściwości transportowe błony (np. zaburzać transport jonów sodu i potasu) oraz kształt erytrocytów [Deuticke, 1968; Sheetz i Singer, 1974, Sheetz i Dai, 1996; Hagerstrand i Isomaa, 1992]. W prezentowanej pracy wykorzystano hemolizę indukowaną związkami organicznymi fosforu do określenia ich toksyczności hemolitycznej oraz podatności hemolitycznej erytrocytów, jak również hemolizę osmotyczną w celu określenia oporności osmotycznej krwinek.

II.3.2. Płynność błony erytrocytów

Jedną z ważniejszych właściwości błony komórkowej jest jej płynność, czyli uporządkowanie lub ruchliwość jej składników. Płynność błony ma wpływ na różne parametry fizyczne i funkcje komórek. W przypadku komórek erytrocytów od płynności błony zależy ich odkształcalność, aktywność enzymów i receptorów błonowych, dyfuzja tlenu oraz transport substancji przez błonę erytrocytu. Zatem płynność błony ma decydujący wpływ na stan fizjologiczny krwinki czerwonej, a utrzymanie określonej płynności błony jest jedną z najważniejszych funkcji życiowych komórki [Deuticke, 1977; Shinitzky i Barenholtz, 1978; Lakowicz, 1999].

Płynność błony definiuje się jako odwrotność mikrolepkkości błony i określa ona ruchliwość cząsteczek fosfolipidów w dwuwarstwie lipidowej błony (ang. lipid chain mobility, lipid chain flexibility). Ruchy cząsteczek lipidowych w błonach obejmują bardzo szeroki zakres czasowy - od rotacji całych molekuł lipidów i oscylacji ich łańcuchów węglowodorowych zachodzących w czasie 10^{-9} s, wolniejsza jest dyfuzja lateralna wzdłuż błony (10^{-8} s), a także w poprzek (między warstwami) błony typu flip-flop, które trwa nieraz nawet kilka dni. Płynność błony można zbadać na podstawie ruchliwości cząsteczek znacznika wprowadzonego do błony, która zależy zarówno od rozmiarów i kształtu poruszającej się w błonie molekuly, jak i od oporu stawianego przez jej otoczenie.

Na płynność błony mają wpływ: temperatura, oddziaływania lipid-lipid, lipid-białko, długość oraz stopień nienasycenia łańcuchów alkilowych lipidów, skład lipidowy błony. W miarę wnikania w głąb dwuwarstwy lipidowej uporządkowanie łańcuchów maleje, zaś rośnie ich ruchliwość [Shinitzky i Barenholz, 1978; Loew, 1988]. Wykazano, że różna jest płynność monowarstwy zewnętrznej i wewnętrznej dwuwarstwy lipidowej, co wiąże się z asymetrią obu warstw lipidowych, w której istotną rolę odgrywa stosunek molowy sfingomieliny do fosfatydylocholiny [Obsil i inni, 1999]. Stwierdzono, że w monowarstwie wewnętrznej, w której dominują fosfolipidy o krótszych i bardziej nienasyconych łańcuchach węglowodorowych, płynność jest większa niż monowarstwy zewnętrznej. Różnice w płynności błony występują także w płaszczyźnie błony, co jak się uważa, jest wynikiem istniejącej asymetrii lateralnej w obszarach domenowych [Lentz, 1989, 1993]. Białka błonowe również mają wpływ na wzrost mikrolepkości, szczególnie w błonach o niskim stosunku cholesterolu do fosfolipidów. W fazie ciekłokrystalicznej wzrost zawartości cholesterolu w stosunku do fosfolipidów powoduje zwiększenie mikrolepkości błony (zmniejszenie płynności), natomiast w stanie żelu wzrost cholesterolu względem fosfolipidów powoduje zwiększenie płynności błony. Mikrolepkość błony zależy również od stopnia nienasycenia i długości łańcuchów węglowodorowych fosfolipidów w taki sposób, że im większy jest stopień nienasycenia, tym większa płynność. W warunkach fizjologicznych błona jest najczęściej w stanie ciekłokrystalicznym, lecz wzrost temperatury otoczenia wpływa na wzrost jej płynności.

Metody fluorymetryczne służą do badania właściwości błony komórkowej. Za pomocą tych metod badane są między innymi następujące właściwości błon komórkowych: ruchliwość rotacyjna lipidów i białek, przejścia fazowe lipidów błonowych, mikrolepkość wewnętrznych obszarów błony oraz ruchliwość lateralna białek i lipidów, potencjał błonowy i powierzchniowy, agregacja białek, asymetria błony. Do pomiarów tych właściwości wykorzystuje się szereg znaczników fluorescencyjnych. Do badania przejść wykorzystuje się depolaryzację fluorescencji, zaś do badania potencjałów błonowych wykorzystywane są znaczniki wrażliwe na zmianę potencjału.

W prezentowanej pracy badania płynności błony wykonano poprzez pomiar dyfuzji rotacyjnej wprowadzonych do błony znaczników fluorescencyjnych [Lakowicz, 1999; Campbell i Dwek, 1984; Lentz, 1988]. Metoda ta dostarcza informacji dotyczących płynności błony i stanu uporządkowania dwuwarstwy lipidowej. Jest to metoda czuła na zmiany płynności błony, co ma duże znaczenie m.in. w badaniach klinicznych.

$$\begin{array}{ccccccc}
 & & & & R & & \\
 & & & & | & & \\
 CH_3 & - (CH_2)_n & - C & - O & - CH & & \\
 & & || & & | & & \\
 & & O & & H_2C & - O & - P & - O & - (CH_2)_2 & - N^+(CH_3)_3 \\
 & & & & & & || & & & \\
 & & & & & & O^- & & & \\
 & & & & & & & & & \\
 IV & & III & & II & & & & & I
 \end{array}$$

Zjawiska fizyczne zachodzące w cząsteczce znacznika po pochłonięciu przez nią kwantu światła pozwalają określić związek między strukturą otoczenia znacznika, a parametrami jego fluorescencji. Znaczniki fluorescencyjne posiadają w swojej cząsteczce fluoryzujący chromofor, dla którego charakterystyczne są długości fal wzbudzenia λ_{ex} i emisji λ_{em} . Po pochłonięciu kwantu światła w cząsteczce fluoroforu zachodzą zmiany, w wyniku których znacznik przechodzi w stan wzbudzony, trwający ok. 10^{-15} s, podczas którego następują zmiany gęstości elektronowej w obrębie cząsteczki i cząsteczka zmienia nieco swą konfigurację. Część energii pochłoniętego kwantu ΔE zużywana jest na zmiany wewnątrzcząsteczkowe, a część oddawana rozpuszczalnikowi. W wyniku utraty części pochłoniętej energii długość fali odpowiadająca maksimum fluorescencji λ_{em} przesuwają się w

stronę fal dłuższych, w porównaniu z długością fali odpowiadającej maksimum pochłaniania λ_{ex} . Jest to tzw. przesunięcie stokesowskie:

$$\Delta E = h\nu_{ex} - h\nu_{em} = hc(1/\lambda_{ex} - 1/\lambda_{em})$$

gdzie:

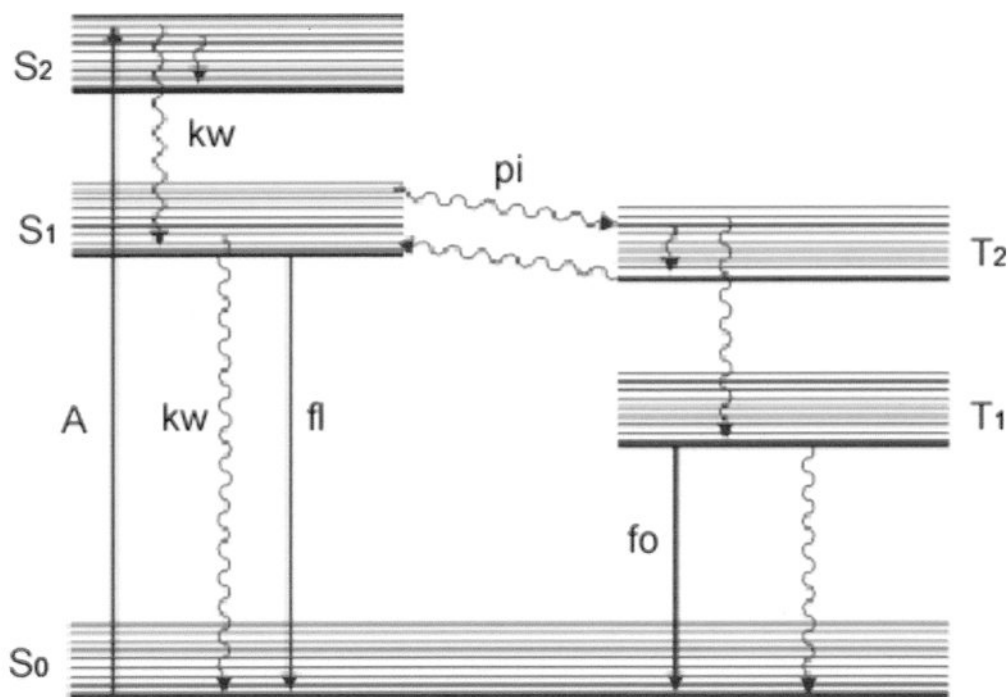
ν_{ex} - częstotliwość fali pochłanianej (wzbudzającej),

ν_{em} - częstotliwość fali emisji (fluorescencji),

h - stała Plancka.

Długości fali odpowiadające maksimum pochłaniania i fluorescencji zależą silnie od polarności środowiska, w którym znajduje się znacznik.

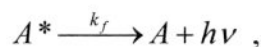
Drogi powrotu cząsteczki ze stanów wzbudzonych do stanu podstawowego obrazują tzw. diagramy Jabłońskiego, wybitnego fizyka polskiego, który pierwszy zastosował je do opisu różnych widm emisyjnych [Jabłoński, 1935; Lakowicz, 1999]



Rys.2.8. Diagram Jabłońskiego stanów energetycznych cząsteczki. Oznaczenia na rysunku: kw – konwersja wewnętrzna, pi – przejście interkombinacyjne, fl – fluorescencja, fo – fosforescencja, S – sekwencja stanów singletowych, T – sekwencja stanów tripletowych. Linie ciągłe łączące różne stany odpowiadają przejściom promienistym, linie faliste – procesom bezpromienistym.

Całkowite prawdopodobieństwo przejścia cząsteczki ze stanu wzbudzonego do stanu podstawowego wynosi 1 i jest sumą prawdopodobieństw wszystkich procesów, w wyniku których cząsteczka może powrócić do stanu podstawowego. Wzbudzony układ dąży do

przyjęcia najbardziej stabilnego stanu i realizuje to najszybszą możliwą drogą. Do opisu procesów często stosuje się wielkość zwaną stałą szybkości np.: jeśli proces dezaktywacji odbywa się na drodze fluorescencji ze stałą szybkością k_f jego przebieg można zapisać schematycznie:



gdzie A^* i A oznaczają cząsteczkę w stanie wzbudzonym i podstawowym, a $h\nu$ jest kwantem wyemitowanej fluorescencji.

Średni czas przebywania cząsteczki w stanie wzbudzonym (czas życia stanu wzbudzonego) jest uwarunkowany kilkoma czynnikami. Przejścia o różnej multipletowości (np. z T_1 do S_0) są formalnie zabronione, dlatego są mniej prawdopodobne i wiążą się z dłuższym czasem życia stanu wzbudzonego cząsteczek. Ponieważ stan singletowy (S_0) jest stanem podstawowym większości znanych molekuł, dlatego wzbudzony stan trypletowy ma najczęściej dłuższy czas życia, niż wzbudzony stan singletowy. Na najniższym wzbudzonym poziomie singletowym cząsteczka może przebywać około 10^{-8} s. Czas życia najniższego wzbudzonego stanu trypletowego jest rzędu 10^{-6} s, istnieją jednak cząsteczki, dla których wynosi on 1 sekundę lub więcej. Obserwujemy to jako różnicę w długościach średnich czasów zaniku emisji spontanicznej światła dla fosforescencji i fluorescencji. Szybkość zachodzenia danego procesu zależy również od różnic energetycznych pomiędzy poziomami. Konwersja wewnętrzna z wyższych singletowych stanów wzbudzonych S_n do pierwszego stanu wzbudzonego S_1 , a także między stanami trypletowymi T_n i T_1 jest ze względu na zagęszczenie poziomów energetycznych procesem bardzo szybkim (10^{11} - 10^{13} s⁻¹). Konwersja wewnętrzna ze stanu S_1 i przejście interkombinacyjne ze stanu T_1 są dużo wolniejsze. Jeśli przejście interkombinacyjne ze stanu S_1 do T_1 zachodzi pomiędzy stanami o podobnej energii, pomimo zakazu spinowego jego stała szybkości jest rzędu 10^7 - 10^{11} s⁻¹ i może ono konkurować z procesem fluorescencji (10^6 - 10^9 s⁻¹).

Sondy fluorescencyjne

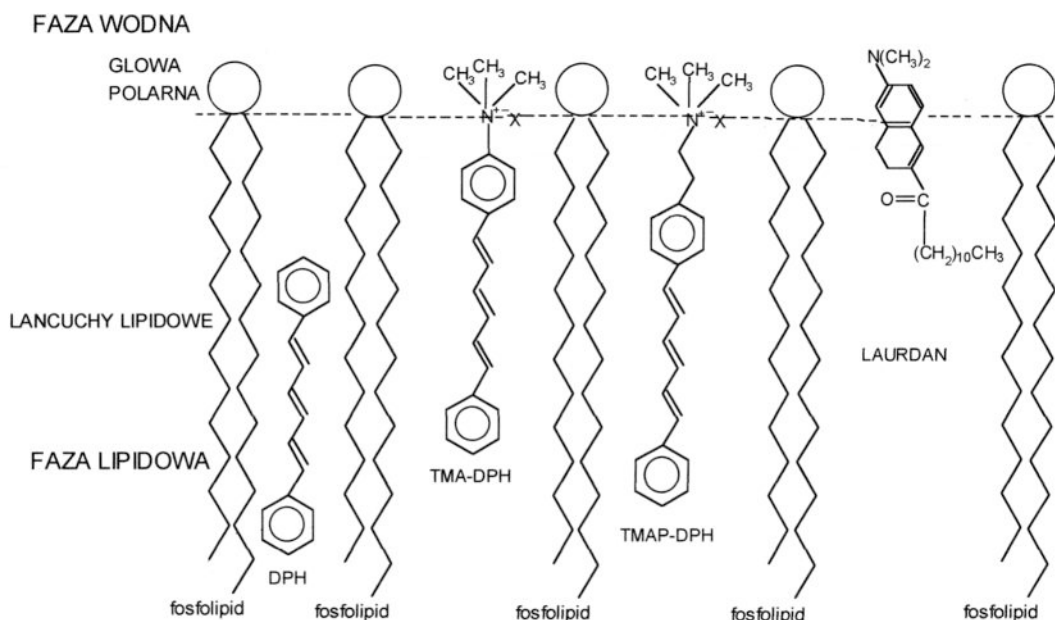
W prezentowanej pracy wykorzystano znaczniki fluorescencyjne, które często stosuje się w badaniach płynności błon. Należą do nich sondy: DPH zastosowany po raz pierwszy przez Shinitzky'ego i Barenholza (1978) i jego pochodne TMA-DPH i TMAP- DPH, będące kationowymi analogami DPH, wprowadzone do badań kilka lat później [Kitagawa i inni, 1991; Dumas i inni, 1997] oraz sonda Laurdan, która była zastosowana po raz pierwszy przez Wezera i Farissa w 1979 i wykorzystywana też przez innych autorów [Parasassi i inni, 1994; Haugland, 2002].

DPH (1,6 - difenylo - 1,3,5 - heksatrien) jest szeroko stosowany jako znacznik do badań płynności fazy lipidowej w błonach, lipoproteidach i pęcherzykach lipidowych [Kaiser i London, 1998; Obsil i inni, 1999; Suwalsky i inni, 1996, 1997, 1999, 2000 a i b, 2002; Lakowicz, 1999]. DPH jest znacznikiem hydrofobowym, nieposiadającym ładunku i jest zorientowany w błonie mało specyficznie, gdyż nie wiąże się na stałe ze składnikami błony. Ze względu na swój hydrofobowy charakter, sonda DPH lokalizuje się głównie w błonie na poziomie końcowych części łańcuchów węglowodorowych (strefa III i IV). Może ona, oprócz równoległego położenia względem łańcuchów węglowodorowych, przyjmować inne położenie w środku dwuwarstwy lipidowej, np. równoległe do powierzchni błony. Badania NMR dla fragmentu łańcuchów acylowych związanych z węglami od 10 do 12 wskazują, że prawdopodobnie głównie na tym poziomie lokalizuje się cząsteczka DPH. Jednakże kwestia jej lokalizacji w błonach pozostaje otwarta [Michalak, 1996].

Trimetyloaminowym, kationowym analogiem sondy DPH jest sonda TMA-DPH, zaś trójmetyloaminopropylowym analogiem jest sonda TMAP-DPH. Obecność ładunku w cząsteczce powoduje związanie się sondy z częścią polarną błony oraz jej równoległe ustawienie względem osi cząsteczek lipidowych. Część polarna sondy TMA-DPH lokalizuje się na poziomie główek polarnych, zaś część hydrofobowa na poziomie reszty glicerolowej i pierwszych węgli łańcuchów alkilowych, zaś sonda TMAP-DPH nieco głębiej (strefa I, II i III) [Lakowicz, 1999]. Czasy życia znaczników TMA-DPH i TMAP-DPH są w większym stopniu wrażliwe na zmiany składu lipidowego błony i temperaturę niż DPH [Kaiser i London, 1998; Obsil i inni, 1999].

Znacznik fluorescencyjny Laurdan (2-dimetyloamino-6-laurylonaftalen) wykazuje spektralną wrażliwość na zmiany stanu fazowego dwuwarstwy lipidowej. Wiaże się z błoną poprzez fragment kwasu laurowego, a jego fluoryzująca reszta naftalenowa jest zlokalizowana w pobliżu glicerolowego fragmentu cząsteczki lipidu [Parasassi i inni, 1994; Michalak, 1996]. Widma emisji fluorescencji Laurdanu są zależne od fazy (żelu lub ciekłokrystalicznej), w których może znajdować się błona. Przy przejściu fazowym lipidów ze stanu żelu do stanu ciekłokrystalicznego obserwuje się przesunięcie emisji Laurdanu o 50 nm w stronę fal dłuższych odpowiadających barwie czerwonej (440 nm do 490 nm). To pasmo emisji (czerwone) z maksimum przy 490 nm jest najbardziej intensywne w fazie żelu [Parasassi i inni, 1995]. Drugie istniejące pasmo wzbudzenia jest przesunięte w stronę długości fal odpowiadających barwie niebieskiej z maksimum przy 350 nm. Pasma to (niebieskie) ma największe natężenie w fazie ciekłokrystalicznej. Te właściwości Laurdanu zależą od szybkości relaksacji dipolowej i polarności otoczenia. Spektralne właściwości wzbudzenia i

emisji Laurdanu wykorzystano m.in. do monitorowania wpływu cholesterolu na hydratację dwuwarstwy i molekularną dynamikę fosfolipidów [Hendrich i inni, 2001, Krasnowska i inni, 2001, Harris i inni, 2002; Suwalsky i inni 2003, 2004].



Rys. 2.9. Sondy fluorescencyjne DPH, TMA-DPH, TMAP-DPH i Laurdan oraz ich prawdopodobna lokalizacja w błonie lipidowej [Dumas i inni, 1997].

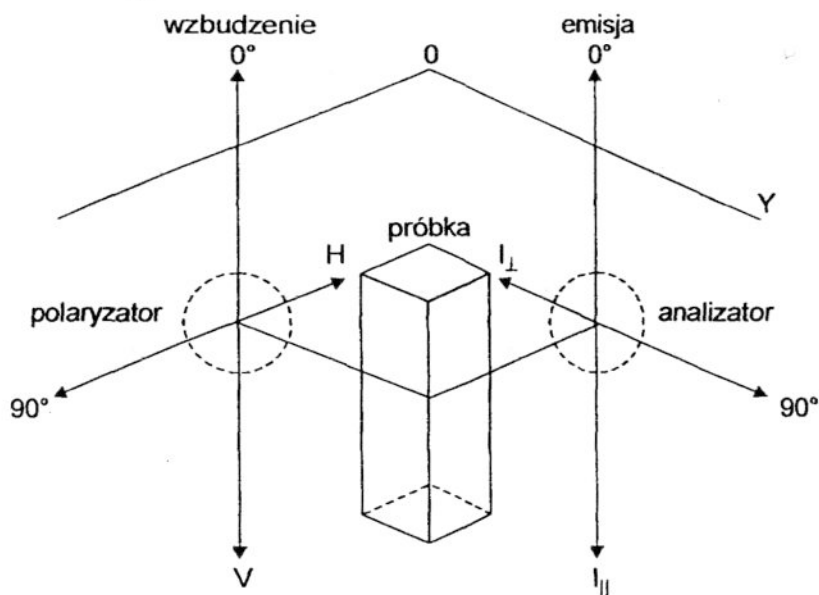
Metody fluorymetryczne są szeroko stosowane w różnych dziedzinach nauki, między innymi do badań klinicznych. Liczne badania wykazały, że w stanach patologicznych u ludzi zmienia się płynność błony krwinek czerwonych. Błony erytrocytów np. u ludzi chorych na cukrzycę insulinozależną, badane metodą polaryzacji fluorescencji sond DPH i TMA-DPH, wykazały podwyższoną wartość mikrolepkości w stosunku do ludzi zdrowych [Bryszewska, Leyko, 1983]. Zmiany płynności błony erytrocytów były również obserwowane w przypadku dystrofii miotonicznej. Badano zmiany mikrolepkości błon fibroblastów ułożliwionych in vitro, oraz pobranych od ludzi chorych na chorobę Huntingtona. Obserwowano także korelację pomiędzy płynnością błony ludzkich komórek białaczkowych a ostrością choroby. Zbadano również wzrost płynności błon erytrocytów u pacjentów po transplantacji nerek i w komórkach mięśnia sercowego szczurów pod wpływem podawanych leków. Przy użyciu sondy Laurdan wykazano zmiany płynności w błonie komórkowej plemników u pacjentów cierpiących na bezpłodność [Bryszewska i inni, 1983; Vareesangthip i inni, 2001; Leifert i inni, 2000; Ambrosini i inni, 2001]. Znacznik ten posłużył również do obrazowania włókien aorty w mikroskopii dwufotonowej [Parasassi, 2000]. Prowadzone są też liczne eksperymenty,

z zastosowaniem wyżej wymienionych sond, nad wpływem innych czynników na płynność błon erytrocytów, w tym leków i substancji biologicznie aktywnych [Lentz, 1993; Błasiak, 1995; Akahroni, 1999; Zavodnik i inni, 2001; Videira i inni, 2001; Marczak i inni, 2004].

Sposób wyznaczania polaryzacji i anizotropii fluorescencji

W metodzie spektroskopii fluorescencyjnej wykorzystano procesy absorpcji i emisji promieniowania elektromagnetycznego przy zastosowaniu sondy fluorescencyjnej. Procesom tym towarzyszą przejścia dipolowe. Momenty przejścia, absorpcyjny i emisyjny, leżą w płaszczyźnie cząsteczki i tworzą kąt α . Prawdopodobieństwo pochłonięcia kwantu światła przez cząsteczkę zależy od kąta, jaki tworzy kierunek pola wektora elektrycznego padającego światła spolaryzowanego z kierunkiem absorpcyjnego momentu przejścia cząsteczki. Jeśli wzbudza się próbkę światłem spolaryzowanym, to pochłaniać światło będą przede wszystkim te cząsteczki znacznika, których absorpcyjne momenty przejścia są równoległe do kierunku drgań wektora pola elektrycznego światła padającego.

Jeśli cząsteczki znacznika pozostają nieruchome podczas trwania stanu wzbudzonego, to kąt między absorpcyjnym i emisyjnym momentem przejścia byłby równy zeru i fluorescencja byłaby również spolaryzowana liniowo wzdłuż tego kierunku. Mierząc za pomocą polaryzatora, zorientowanego równoległe lub prostopadłe do kierunku polaryzacji światła wzbudzającego, natężenie emitowanej fluorescencji, otrzymuje się odpowiednio dwie wartości natężenia światła $I_{||}$ i $I_{\perp}$.



Rys. 2.10. Układ do pomiaru polaryzacji fluorescencji .

Stopień polaryzacji fluorescencji P można scharakteryzować przez różnicę $I_{||} - I_{\perp}$ podzieloną przez sumę $I_{||} + I_{\perp}$.

$$P = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}}$$

Całkowite natężenie fluorescencji F światła spolaryzowanego jest równe $F = I_{\parallel} + 2I_{\perp}$, dlatego dla scharakteryzowania polaryzacji fluorescencji uzasadnione jest wprowadzenie innego parametru - anizotropii fluorescencji (r):

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}}$$

Wielkości P i r są ze sobą związane zależnością:

$$r = \frac{2P}{3 - P};$$

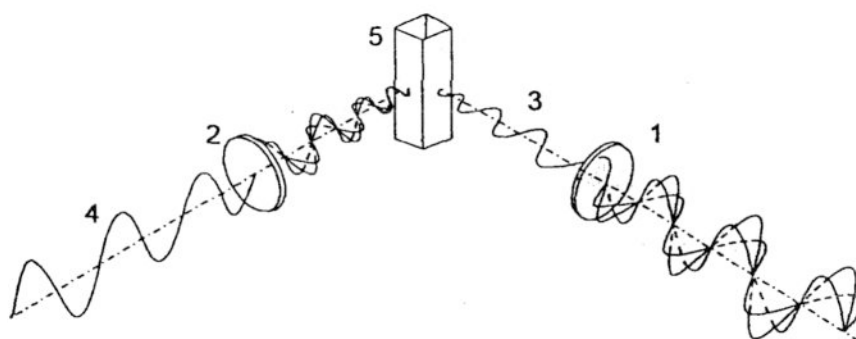
$$P = \frac{3r}{2 + r}$$

Z teorii polaryzacji fluorescencji wynika, że jeśli absorpcyjne i emisyjne momenty przejścia są równoległe ($\alpha=0$) podczas stanu wzbudzonego, to stopień polaryzacji fluorescencji i anizotropii fluorescencji przyjmują graniczne wartości największe i są równe:

$$P_0 = \frac{1}{2};$$

$$r_0 = \frac{2}{5}.$$

Po wzbudzeniu sondy fluorescencyjnej światłem spolaryzowanym może ona, będąc w stanie wzbudzonym, zmienić swoją orientację zanim wyemituje wiązkę fluorescencyjną. Jeśli w stanie wzbudzonym wynoszącym od 1 do 100 ns cząsteczki zmieniają swoje położenie (zależne od lepkości otoczenia), zmienia się zatem kąt α między emisyjnym i absorpcyjnym momentem przejścia, to mówimy wtedy o tzw. depolaryzacji rotacyjnej fluorescencji, czyli depolaryzacji emitowanego światła, wywołanej odchyleniem wiązki emitowanej fluorescencji od kierunku wiązki wzbudzającej.



Rys. 2.11. Zjawisko depolaryzacji fluorescencji: 1 - polaryzator, 2 - analizator, 3 - padająca fala spolaryzowana, 4 - składowa prostopadła do spolaryzowanej fali padającej, 5 – próbka.

W przypadku, gdy kąt pomiędzy absorpcyjnym i emisyjnym momentem przejścia cząsteczki jest różny od zera ($\alpha \neq 0$), ale nie zmienia się podczas trwania stanu wzbudzonego, wówczas P_0 i r_0 można wyrazić:

$$P_0 = \frac{3 \cos^2 \alpha - 1}{\cos^2 \alpha + 3};$$

$$r_0 = \frac{3 \cos^2 \alpha - 1}{5}$$

przyjmują one wówczas wartości z przedziałów:

$$\frac{1}{3} < P_0 < \frac{1}{2}; -\frac{1}{5} < r_0 < \frac{2}{5}.$$

Pomiary polaryzacji lub anizotropii fluorescencji ujawniają więc średnie odchylenie katowe dipolowych momentów przejścia sondy, które ma miejsce między absorpcją i następującą po niej emisją światła fluorescencji. To przesunięcie katowe jest zależne od szybkości i wielkości kąta odchylenia momentu przejścia podczas znajdowania się fluoroforu w stanie wzbudzonym, co z kolei zależy od lepkości środowiska, w którym się on znajduje oraz od rozmiarów i kształtu cząsteczki znacznika. Wyznaczone wartości P będą mniejsze (co do wartości bezwzględnej) od P_0 na skutek rotacyjnego ruchu znacznika i zmiany kąta α . Depolaryzacja fluorescencji zależy od czasu trwania stanu wzbudzonego τ i od czasu relaksacji rotacyjnej ρ . Związek między uśrednionymi w czasie wielkościami P i τ , a lepkością środowiska η został przedstawiony przez Perrina i Jabłońskiego i znany jest jako równanie Perrina:

$$\frac{1}{P} - \frac{1}{3} = \left(\frac{1}{P_0} - \frac{1}{3} \right) \left(1 + \frac{3\tau}{\rho} \right) = \left(\frac{1}{P_0} - \frac{1}{3} \right) \left(1 + \frac{RT\tau}{V\eta} \right),$$

gdzie: P - obserwowany współczynnik polaryzacji,

P_0 -teoretyczny maksymalny współczynnik polaryzacji,

τ - czas życia fluoroforu,

V - objętość molowa fluoroforu,

η - współczynnik lepkości,

R - stała gazowa,

T - temperatura.

Dla anizotropii fluorescencji otrzymuje się nieco prostsze wyrażenie:

$$\frac{r}{r_0} = 1 + \frac{3\tau}{\rho} \left(\frac{1}{r_0} \right) \left(1 + \frac{RT\tau}{V\eta} \right)$$

i stąd współczynnik lepkości można wyznaczyć ze wzoru:

$$\eta = \frac{r \tau RT}{(r_0 - r)V}.$$

II.3.3. Zmiana kształtu erytrocytów

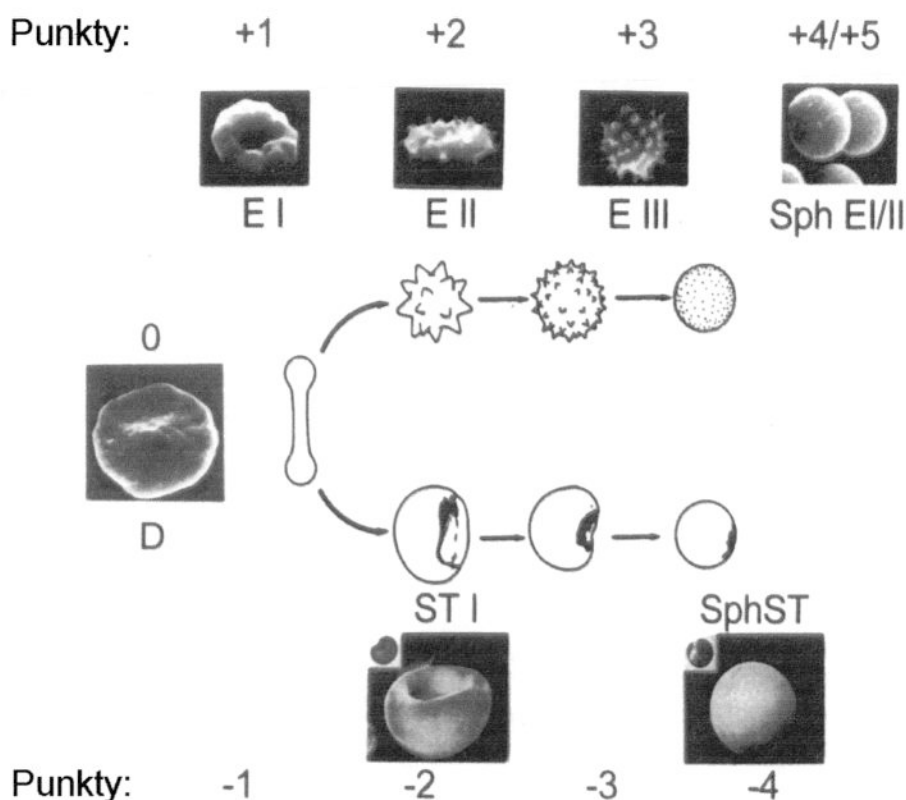
Kształt komórki erytrocytu jest czułym wskaźnikiem zmian zachodzących zarówno w środowisku otaczającym komórkę, jak i wewnątrz komórki. Obecnie wiadomo, że różne kształty dojrzałych komórek są wynikiem statycznych i dynamicznych zmian właściwości błony komórkowej, jej składu chemicznego, organizacji supramolekularnej oraz właściwości fizycznych jej głównych składników tj. lipidów i białek. Wiele współczesnych badań nad zmianami kształtu komórek spowodowanymi różnymi związkami biologicznie aktywnymi rozpatruje wiele możliwych przyczyn tych zmian np.: transformacje kształtu komórek w zależności od stężenia substancji, wpływ substancji na dwuwarstwę i szkielet błonowy oraz ich oddziaływanie z białkami i lipidami [Iglic i inni, 2004; Suwalsky i inni, 1997, 2002, 2003, 2004]. Kształt komórek erytrocytów może zostać zmieniony poprzez:

- modyfikację różnymi substancjami,
- zmiany strukturalne (głównie białek i lipidów),
- stany patologiczne komórki,
- zmiany właściwości mechanicznych komórki i błony komórkowej.

W 1948 Ponder wprowadził główne kryteria klasyfikacji zmian kształtu komórek erytrocytów, modyfikowanych w warunkach laboratoryjnych, które są nadal aktualne [Ponder, 1948]. Zgodnie z tą koncepcją zmiany kształtu erytrocytów są dwójakiego rodzaju: wywołane przez zmiany objętości komórki oraz występujące bez zmian objętości. Zmiana objętości komórki najczęściej wiąże się z formowaniem sferocytów [O'Reilly, 2001]. Drugi rodzaj zmian określony przez Pondera, polega na zmianie kształtu bez zmian w objętości komórki. Ten rodzaj zmian jest obserwowany w różnych warunkach eksperymentalnych i prowadzi do formowania się dwóch kształtów morfologicznych komórek. Procesy formowania kształtów erytrocytu określany jest jako: krenacja (crenated) i tworzenie „kształtu filiżankowego” (cup-shaped), a komórki powstałe w ten sposób nazywane są w literaturze odpowiednio echinocytami i stomatocytami. Taki podział został zaproponowany przez francuskiego hematologa Bessis’a (1977).

Echinocyty i stomatocyty można odróżnić jakościowo opierając się na definicji klas kształtów, scharakteryzowanych przez punkty skali Bessis’a. W ramach tych dwóch

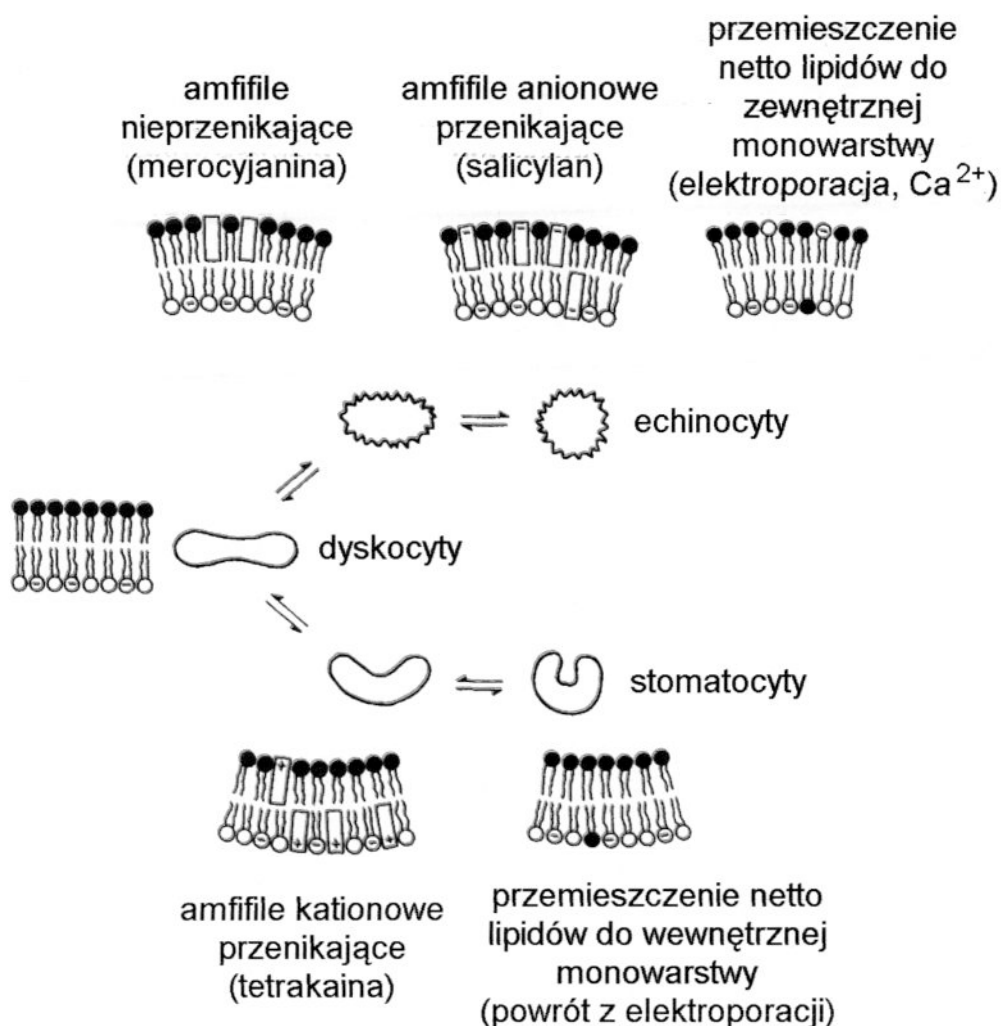
podstawowych rodzajów kształtu tj. stomatocytów i echinocytów zgodnie ze skalą Bessis'a wyróżnia się szereg form krwinek czerwonych, którym przyporządkowano odpowiednie punkty (indeksy morfologiczne): sferostomatocyty (-3), stomatocyty (-2), dyskostomatocyty (-1), dyskocyty (0), dyskoechinocyty (+1), echinocyty (+2), sferoechinocyty (+3), sferocyty (+4).



Rys. 2.12. Klasyfikacja i punktacja zmian kształtu ludzkich erytrocytów. E – echinocyty, ST – stomatocyty [Bernhardt i Ellory, 2003].

Ponder (1948) stwierdził również, że podczas lizy erytrocytów przebiega proces transformacji kształtu komórek dyskocytów, począwszy od procesu krenacji, czyli tworzenia echinocytów aż do powstania sferocytów, a kończąc na cieniach, w wyniku uwolnienia hemoglobiny. Pierwsze etapy krenacji są odwracalne. Tworzenie echinocytów i stomatocytów są procesami antagonistycznymi w tym sensie, że tworzenie jednego rodzaju zmian jest spowalniane lub nawet zahamowane przez czynniki powodujące drugi rodzaj zmian. Ponadto wszystkie związki, które wpływają na zmianę kształtu komórek są amfifilowe tzn. mają część hydrofobową i hydrofilową. Związki powodujące powstawanie echinocytów są w większości anionowe, zaś stomatocytów głównie kationowe [Ponder, 1948; Schwarzwald i in., 1999 a, b]. Według Sheetz'a i Singer'a (1974) związki anionowe powodują powstawanie wypustek w błonie erytrocytów z powodu ich asymetrycznego rozkładu, ponieważ koncentrują się one

głównie w zewnętrznej monowarstwie lipidowej, w wyniku czego zewnętrzna warstwa zwiększa swoją powierzchnię. Ta warstwa jest utrzymywana z daleka od ujemnie naładowanej wewnętrznej warstwy poprzez odpychanie elektrostatyczne. Obie warstwy nie mogą się od siebie oddzielić z powodu łączących je oddziaływań hydrofobowych. Związki wbudowując się do błony powodują zwiększenie powierzchni warstwy zewnętrznej w stosunku do wewnętrznej i tym samym zmianę krzywizny dwuwarstwy, co prowadzi do deformacji błony na zewnątrz i tworzenia wypustek. Wpływ kationowych związków amfifilowych na formowanie stomatocytów był interpretowany jako konsekwencja preferowanej akumulacji tych związków w ujemnie naładowanej warstwie wewnętrznej. Proces ten został nazwany mechanizmem sprzężenia dwuwarstwy, a koncepcja ta okazała się prawdopodobna i bardzo użyteczna dla dalszych interpretacji wyników eksperymentalnych w badaniach kształtu erytrocytów. Ogólnie postuluje się, że wszystkie modyfikacje powierzchni dwóch połączonych warstw prowadzą do zmiany spontanicznej krzywizny dwuwarstwy, co w konsekwencji zmienia dyskocyty albo w echinocyty albo w stomatocyty. Pierwotne obserwacje zostały wzbogacone o wpływ innych czynników takich jak leki czy detergenty na kształt erytrocytów [Ziegler i inni, 2004; Vranic-Mandusic i inni, 2004; Szwarocka i Józwiak, 1999]. W związku z mechanizmem sprzężenia dwuwarstwy pokazano, że amfifilowe związki z identycznymi częściami hydrofobowymi tworzą echinocyty, kiedy są naładowane ujemnie, a stomatocyty, kiedy są naładowane dodatnio. Związki wnika spontanicznie do zewnętrznej warstwy i pozostające w niej tworzą echinocyty nawet, jeśli nie są spolaryzowane. Związki kationowe łatwo wbudowując się do zewnętrznej warstwy i przenikając wolno do wewnętrznej warstwy pierwotnie tworzą echinocyty, następnie indukują powoli dyskocyty i ostatecznie tworzą stomatocyty, w zależności od stężenia związków dyfundujących pomiędzy warstwami [Isomaa i inni, 1987; Iglic i inni, 1998; Tachev i inni, 2004; Wong, 1999; Danieluk i inni, 1998]. Obserwowano również zmiany kształtu erytrocytów pod wpływem promieniowania bliskiej podczerwieni [Komorowska i inni, 2002].



Rys.2.13. Przykłady transformacji kształtu zgodne z mechanizmem sprzężenia dwuwarstwy [Bernhardt i Ellory, 2003].

Zmiany kształtu następują również w następstwie zmian występujących wewnątrz błony komórkowej. Kształt komórki jest więc zdeterminowany również poprzez: skład chemiczny błony erytrocytu głównie dotyczący białek i lipidów, glikokaliks i szkielet membranowy, wewnętrzną organizację błony, właściwości fizyczne i mechaniczne dwuwarstwy lipidowej.

Pewną rolę w tych zmianach odgrywają również parametry cytoplazmatyczne tj.: ilość płynu wewnątrzkomórkowego, który determinuje objętość komórki i wpływa bezpośrednio na kształt komórki, jak również inne składniki cytoplazmy takie jak: ATP, H^+ i inne kationy. Istotną rolę pełni hemoglobina, jej konformacja, ładunek elektryczny i oddziaływania z innymi białkami [Wong i inni, 2004; Gedde i inni, 1999; Rasia i Bollini, 1998].

Decydujący wpływ na kształt komórki ma występująca w błonie komórkowej asymetria lipidowa, dotycząca głównie fizjologicznego składu lipidów błony erytrocytów, fosfolipidów i cholesterolu, oraz ruchliwość wszystkich fosfolipidów, a także stabilizująca rola oddziaływań

białkowo-lipidowych. Przypuszcza się, że usunięcie cholesterolu powoduje powstawanie stomatocytów, a wprowadzenie go powoduje powstawanie echinocytów [Lang-Ming i Wen-Guey, 1990; Moore i inni, 1999]. Ważną rolę stabilizującą dwuwarstwę odgrywa szkielet błonowy, który warunkuje kształt komórki. Bezpośredni wpływ szkieletu na kształt membrany, porównywalny jest do roli dwuwarstwy lipidowej. Ponadto, sieć białek szkieletowych ma dużą zdolność do kompresji, w przeciwieństwie do warstw lipidowych. Liczne badania wykazały, że zmiany w szkielecie błonowym spowodowane przez modyfikację chemiczną lub przez defekty genetyczne wiążą się ze zmianami kształtu. Rozciągliwość szkieletu białkowego jest odpowiedzialna za elastyczność krwinki, ale jest także podstawowym warunkiem stabilności błony i integralności komórki. Niestabilność szkieletu powoduje powstawanie sferocytów [Svetina i inni, 2004]. Na zmianę kształtu komórki znaczący wpływ ma również glikokaliks, wrażliwy na zmiany siły jonowej i pH. Gęstość i przestrzenne rozmieszczenie ładunków ujemnych na jego powierzchni, determinuje ujemny potencjał powierzchni komórki, a ten wpływa na kształt krwinki [Godin i Caprani, 1997]. Białka integralne, podobnie jak lipidy, mogą wpływać na krzywiznę błony dzięki swojej geometrii molekularnej [Devaux, 1992; Yeagle i Lee, 2002; Bernhardt i Ellory, 2003]. Kształt komórki można zmieniać również przez modyfikacje lipidów np. przez traktowanie enzymami, lub też modyfikując białka integralne [Schwartz i inni 1999 b]. Wykazano również, że hormony płciowe zapobiegają deformacji komórki [Zaets i inni, 2003].

Zmiany kształtu komórek erytrocytów, występujące w stanach patologicznych, a w szczególności w chorobach hematologicznych, traktowane są jako dodatkowe rodzaje kształtów, nie objęte podaną wyżej klasyfikacją. Mogą być one związane ze zmianami objętości komórki, jak to ma miejsce w przypadku stomatocytozy, najczęściej spowodowanej zmianami genetycznymi. Zmieniony kształt komórek może też być spowodowany fizycznym stanem konformacyjnym hemoglobiny, jak to ma miejsce w przypadku anemii sierpowatej i w innych chorobach, gdzie komórki przyjmują kształt sierpowaty lub inne kształty, które są wynikiem utraty jonów i wody. Zaburzony metabolizm lipidów, brak niektórych białek błonowych lub enzymów prowadzi do powstania tzw. akanocytów, charakteryzujących się miseczkowatym kształtem z nieregularnymi, różnej wielkości wypustkami, nadającymi komórce odmienny wygląd w porównaniu z echinocytami. Powstają one w wyniku nadmiaru takich lipidów jak; PC, SM lub cholesterolu w błonie, albo w wyniku braku antygenów odpowiedzialnych za grupę krwi, jak również w chorobach neurologicznych [Sawhney i Johal, 2000; Bernhardt i Ellory, 2003].

Na zmianę kształtu komórki mają wpływ ponadto właściwości mechaniczne komórki erythrocytu. Głównym zadaniem erythrocytu, jak wiadomo, jest transport tlenu i dwutlenku węgla. Wypełnia on to zadanie jako bierny transporter w płynącej krwi. Kiedy siły, spowodowane przepływem, działające na błonę erythrocytu są znaczne, erythrocyt zachowuje się podobnie jak kropla cieczy. To zachowanie jest spowodowane faktem, że cytoplazma erythrocytu jest płynna i nie zawiera szkieletu cytoplazmatycznego. Kiedy działające siły są małe, erythrocyt zachowuje się jak ciało stałe. Może obracać się, płynąć, ale jego kształt nie zmienia się, jak przy braku występowania sił zewnętrznych. Powodem takiego zachowania erythrocytu jest sztywność jego błony oraz niesferyczny kształt [Klingen, 2002; Berezina i inni, 2002]. Kształt erythrocytu można opisywać poprzez jego mechaniczne właściwości za pomocą mechaniki ośrodków ciągłych i metody elementów skończonych. Budowane są liczne modele matematyczne służące do opisu sił działających na błonę komórkową erythrocytu w trakcie przepływu przez naczynia krwionośne [Tachev i inni, 2004; Adam, 1998]. Większość zmian kształtów spoczynkowych erythrocytów również może być wyjaśniona przez ogólne właściwości mechaniczne błony komórkowej [Mazeron i inni, 1997; Bazzoni i Rasia, 2001; Scheffer i inni, 2001; Baumann, 2002; Dao i inni, 2003]. Stosując mechanikę ośrodków ciągłych można również opisać proces zwany pęcherzykowaniem, polegający na uwalnianiu pęcherzyków lipidowych z powierzchni membrany erythrocytów różnych kształtów. Echinocyty uwalniają pęcherzyki na zewnątrz komórki, zaś stomatocyty - do wnętrza erythrocytu [Deuticke, 1968; Sheetz i Singer, 1974; Hagerstrandt i Isomaa, 1989, 1991, 1992; Lipowsky i Sackmann, 1995 a, b, c].

II.4. Wybrane związki biologicznie aktywne

II.4.1. Klasyfikacja i właściwości pestycydów

Związki organiczne fosforu prezentowane w pracy, zostały zsyntetyzowane jako potencjalne środki ochrony roślin, czyli pestycydy. Pestycydy są to związki chemiczne, pochodzenia naturalnego (roślinnego) lub syntetycznego stosowane do niszczenia pasożytów człowieka, zwierząt hodowlanych i roślin. Pestycydy powinny charakteryzować się następującymi cechami [Namieśnik i Jaśkowski, 1995]:

- dużą toksycznością w stosunku do organizmów, przeciwko którym są skierowane,
- małą toksycznością w stosunku do pozostałych organizmów,

- odpowiednią trwałością, aby mogły spełnić swoje zadanie w środowisku,
- dużą podatnością na degradację, aby po spełnieniu swojej funkcji szybko traciły aktywność w środowisku.

Istnieją różne kryteria podziału pestycydów, biorące pod uwagę zarówno ich strukturę chemiczną, jak i przeznaczenie. Ze względu na przeznaczenie i sposób działania pestycydy można podzielić na [Rejmer, 1997; Biziuk, 2001]:

Zoocydy - środki do zwalczania szkodników zwierzęcych:

- Insektocydy - owadobójcze,
- Rodentocydy - gryzoniobójcze,
- Moluskocydy - mięczakobójcze,
- Larwicydy - larwobójcze,
- Aficydy - mszycobójcze,
- Akarycydy - roztoczobójcze,
- Owicydy - do niszczenia jaj owadów i roztoczy,
- Bakteriocydy - bakteriobójcze,
- Wirocydy - wirusobójcze,

Fungicydy i fungistatyki - środki grzybobójcze i działające grzybostatycznie,

Herbicydy - środki chwastobójcze,

Regulatory wzrostu - środki stymulujące lub hamujące procesy życiowe roślin:

- Defolianty - środki do odlistniania roślin,
- Desykanty - środki do wysuszania roślin,
- Defloranty - środki do usuwania nadmiernej ilości kwiatów,

Atraktanty - środki zwabiające,

Repelenty - środki odstrasżające.

Istotnym kryterium podziału pestycydów jest również ich klasyfikacja toksykologiczna [Rejmer, 1997; Zakrzewski, 2000; Namieśnik i Jaśkowski, 1995]. W Polsce obowiązuje podział pestycydów na 5 klas według ich toksyczności (tab.2.2.). Przynależność do danej klasy jest określona wartością LD_{50} , czyli dawką śmiertelną wyrażoną w ilości miligramów substancji toksycznej na kilogram ciała, która po jednorazowym podaniu powoduje śmierć 50 % badanej populacji organizmów. Toksyczność związku chemicznego, wyrażona jako LD_{50} , jest wartością umowną i ma znaczenie jedynie przy porównaniu toksyczności różnych związków. Toksyczność pestycydów wobec organizmów żywych jest różna, zależy ona od samego organizmu, warunków środowiskowych oraz rodzaju, formy i sposobu podawania [Zakrzewski, 2000; Dojlido, 1995].

Tab. 2.2. Klasy toksyczności pestycydów w stosunku do ssaków [Rejmer, 1997]

Klasa toksyczności	LD ₅₀ [mg/kg] (szczury)	Stopień zagrożenia
I	do 50	Nadzwyczaj toksyczna
II	51 – 150	Bardzo toksyczna
III	151 – 500	Średnio toksyczna
IV	501 - 5000	Słabo toksyczna
V	Powyżej 5000	Praktycznie nietoksyczna

II.4.2. Związki stosowane w badaniach

W przeprowadzonych badaniach zostały wykorzystane nowo zsyntetyzowane związki organiczne fosforu oraz aktywne składniki znanych i powszechnie stosowanych herbicydów; N-(fosfonometylo)glicyna (FMG) oraz kwas 2,4 dichlorofenoksyoctowy (2,4-D). FMG i 2,4-D jako aktywne składniki herbicydów są powszechnie stosowane w rolnictwie do niszczenia chwastów w uprawach. Aby wzmocnić ich działanie i poszerzyć jego spektrum, wykorzystuje się inne synergicznie działające z nimi związki. W prezentowanej pracy zbadano również czy użyte związki organiczne fosforu mogą działać synergicznie w mieszaninach z FMG i 2,4-D.

II.4.2.1. Związki organiczne fosforu

Aminofosfoniany opisano po raz pierwszy w 1943 r., należą one do związków organofosfonowe (z wiązaniem P-C) i są dość rozpowszechnione w przyrodzie, w tym także w organizmach wyższych, ich rola jednakże nie jest jeszcze do tej pory w pełni wyjaśniona. Wśród aminofosfonianów można wyróżnić:

- dobre inhibitory enzymów,
- substancje o działaniu antybakteryjnym,
- regulatory wzrostu roślin,
- modulatory sygnału nerwowego,
- regulatory metabolizmu wapnia,
- peptydy o właściwościach hipertensyjnych i immunosupresyjnych.

Związki organiczne fosforu, które są przedmiotem badań w tej pracy, zsyntetyzowane zostały na wzór znanych już aminofosfonianów, które zaliczane są do regulatorów wzrostu

roślin. Od roku 1979 zsyntetyzowano cały szereg aktywnych biologicznie aminofosfonianów, w tym szeroko stosowany herbicyd Trakefon, który jest pochodną kwasu cykloheksanoaminofosfonowego, oraz pochodne fluorenu. Te ostatnie zostały po raz pierwszy zsyntezowane na Politechnice Wrocławskiej i od wielu lat są przedmiotem badań zespołu z Politechniki Wrocławskiej i Akademii Rolniczej we Wrocławiu.

Postęp w dziedzinie stosowania środków ochrony roślin wymaga poszukiwania środków coraz bardziej skutecznych, przejawiających swą aktywność przy jak najmniejszych dawkach, aby zminimalizować skażenie środowiska naturalnego tymi związkami chemicznymi oraz zmniejszyć koszty zabiegów. Zatem duże znaczenie mają te herbicydy, które są aktywne w bardzo niskich stężeniach i „przyjazne” środowisku, czyli mało toksyczne dla organizmów, przeciwko którym nie są skierowane, a w szczególności dla ludzi i zwierząt oraz łatwo rozkładane w środowisku naturalnym do związków nietoksycznych.

Dużą zaletą aminofosfonianów jest ich łatwa degradacja w środowisku naturalnym, a wiele z nich wykazuje dobrą aktywność biologiczną dlatego stały się przedmiotem wielu prac badawczych [Garncarz, 1997; Bonarska i inni, 2002, 2003 a i b; Kleszczyńska i inni, 2000 b, c, 2001 a, b, c, 2003; Trela i inni, 2001].

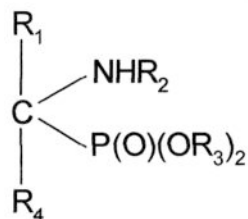
Mimo, iż badania nad sposobem działania tej grupy związków są prowadzone od dawna, do tej pory nie udało się dokładnie określić ich molekularnego mechanizmu działania na błony biologiczne. Aminofosfoniany są związkami lipofilowymi i mogą z łatwością oddziaływać z błoną biologiczną. Jak wskazują dotychczasowe badania, ich aktywność biologiczna związana jest z modyfikacją struktury błony komórkowej, prowadzącą do zmiany jej właściwości, lub do jej niszczenia. Potwierdzają to badania, przeprowadzone na płaskich błonach lipidowych, erytrocytach i glonach [Kleszczyńska i inni, 2000 a, b, c; Sarapuk i inni, 2000 a i b; Trela i inni, 2001].

Przypuszcza się, że uszkodzenie membrany komórkowej może nastąpić w wyniku bezpośredniego oddziaływania substancji biologicznie aktywnych ze składnikami błony, lub może być spowodowane wolnymi rodnikami uwalnianymi w procesie utleniania błony przez te substancje [Bukowska i inni, 1998; Bukowska 2003]. Uszkodzenie błony jest jedną z przyczyn prowadzących do śmierci komórki.

W tej pracy badania podatności hemolitycznej, oporności osmotycznej, płynności błony oraz zmian kształtu komórek erytrocytów były prowadzone dla aminofosfonianów należących do 3 grup: związki acykliczne, związki cykliczne i pochodne fluorenu.

Aminofosfoniany acykliczne

Wśród aminofosfonianów acyklicznych zostały zsyntetyzowane estry kwasu aminofosfonowego różniące się między sobą długościami łańcuchów węglowodorowych w podstawnikach R_1 , R_2 , R_3 i R_4 o następującym wzorze ogólnym:

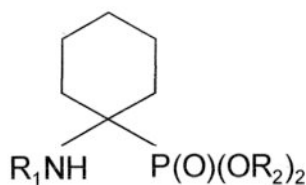


Spośród wielu przebadanych związków tego typu wybranych zostało 7, charakteryzujących się największą aktywnością biologiczną (hemolityczną).

Zasadność wyboru tego typu związków została podyktowana faktem, że wykazują one strukturalne cechy podobieństwa do powszechnie stosowanego i skutecznie działającego herbicydu, jakim jest fosfonometyloglicyna. Wysoką efektywność biologiczną związków tego typu w porównaniu z aktywnością fosfonometyloglicyny, potwierdziły wstępne testy przeprowadzone na roślinach (*Spirodella polyrrhiza*) [Garncarz, 1997].

Aminofosfoniany cykliczne

Aminofosfoniany należące do grupy cyklicznych zostały zsyntetyzowane jako estry kwasu cykloheksanoaminofosfonowego, różniące się między sobą długościami łańcuchów węglowodorowych w podstawnikach R_1 i R_2 o następującym wzorze ogólnym:



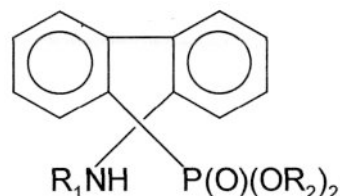
Grupa ta zawiera 5 związków, charakteryzujących się dużą aktywnością w oddziaływaniu z błoną biologiczną.

Są to związki strukturalnie podobne do stosowanego i skutecznie działającego herbicydu, jakim jest Trakefon. Oczekiwano zatem, że część substancji będzie cechowała się równie dobrą lub lepszą aktywnością biologiczną.

Aminofosfoniany pochodne fluorenu

Inną grupą syntetycznych inhibitorów wzrostu są pochodne kwasu fluorenokarboksylowego, które wykazują dużą aktywność biologiczną i stosowane są

komercyjnie jako regulatory wzrostu roślin. Do tej grupy należą badane w tej pracy pochodne kwasu amniofluorenofosfonowego, różniące się między sobą podstawnikami R_1 i R_2 . Wzór ogólny tych związków jest następujący:



Jak podają inni autorzy badający inne związki fluorenowe [Skrabka i Jaskulska, 1987 a i b; Garnarcz, 1997; Kleszczyńska i inni, 2000 c], obok hamowania wzrostu roślin wywołują one silne anomalie rozwojowe objawiające się nadmiernym rozgałęzianiem się pędów i korzeni, zaburzeniami w reakcji korzeni na grawitację (rośnięcie w górę zamiast w dół) itp. Najczęściej obserwowanym efektem działania tych substancji jest obumieranie roślin. Pochodne fluorenu, jak wykazują wcześniejsze badania, działają podobnie jak Trakefon, powodując prawdopodobnie, uszkodzenia błony komórkowej lub zaburzenia jej funkcji, lecz nie blokują enzymów szlaku biosyntezy aminokwasów aromatycznych, jak N-fosfonometyloglicyna. Wydaje się, że aktywność biologiczna tych związków zależy przede wszystkim od ich zdolności przenikania przez błony komórkowe roślin, która jest związana z hydrofobowością związku. Fizjologiczna aktywność pochodnych fluorenu jest zależna od typu podstawnika w pozycji 9 fluorenu. Interesującą właściwością pochodnych fluorenu jest ich synergiczne współdziałanie z herbicydami. Związki te mają więc interesujące właściwości biologiczne i mogą stanowić wzorce do dalszych modyfikacji strukturalnych, w celu optymalizacji aktywności biologicznej.

II.4.2.2. Bioaktywne składniki herbicydów stosowane w mieszaninach

Fosfonometyloglicyna (glifosat, FMG)

Fosfonometyloglicyna (FMG) o zwyczajowej nazwie glifosat jest herbicydem systemicznym, charakteryzującym się dobrą efektywnością biologiczną. Herbicydy systemiczne działają niszcząco na rośliny poprzez ingerencję w procesy metaboliczne roślin. FMG jest głównym składnikiem powszechnie stosowanego preparatu herbicydowego o nazwie Roundup. Właściwości herbicydowe glifosatu zostały opatentowane przez amerykańskich naukowców z firmy Monsanto w 1970 roku. Roundup został wprowadzony do użytku w 1974 roku, a obecnie jest stosowany w ponad 180 krajach świata.

Glifosat jest stosowany jako herbicyd nieselektywny do hamowania wzrostu chwastów, a jego działanie jest związane z hamowaniem syntezy aminokwasów aromatycznych w roślinie, tzw. szlaku szikimowego. Szlak szikimowy to proces 7 reakcji enzymatycznych. W roślinach szlak ten dostarcza prekursorów do syntezy białek fenyloalaniny, tyrozyny i tryptofanu, jak również prekursorów dla różnych innych składników aromatycznych pochodnych choryzmianu m.in.: alkaloidów i flawonoidów [Weaver i Herrmann, 1997].

Pod wpływem glifosatu roślina bardzo szybko umiera, gdyż brak aminokwasów aromatycznych hamuje biosyntezę białek potrzebnych do rozwoju rośliny, szczególnie w tkankach liści i korzenia. Liście bardzo szybko usychają i opadają, usycha też korzeń. Glifosat, działa najbardziej efektywnie, kiedy jest stosowany dolistnie. Bardzo istotną jego cechą, jest jego łatwa degradacja w środowisku. Mikroorganizmy rozkładają FMG do prostych składników. Minimalny okres połowicznego zaniku obserwowany w środowisku wodnym trwa 2 tygodnie. Herbicyd ten spełnia więc wszystkie warunki, jakie winien spełniać idealny środek ochrony roślin - silnie hamuje wzrost chwastów, w tym i tych uznawanych za trudne do zwalczania, nie jest toksyczny dla ludzi i zwierząt, oraz ulega szybkiej biodegradacji w glebie [Amrhein i inni, 1983; Williams i inni, 2000; Pieniążek i inni, 2004]. Jest stosowany głównie w uprawach do niszczenia perzu. Jednakże użycie glifosatu jest ograniczone przez jego niespecyficzność, polegającą na tym, że jest tak samo toksyczny dla chwastów, jak i roślin uprawnych [Dick i inni, 1995; Saenz i inni, 1997; Beltran, 1998; Forlani i inni, 1999; Williams i inni, 2000; Szarek i inni, 2000; Wong, 2000; Hammond i inni, 2004].

Kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy (2,4-D)

Kwas 2,4-D jest herbicydem systemicznym o właściwościach regulatora wzrostu roślin. Herbicydy te są opisane w literaturze również jako herbicydy auksynowe, gdyż pełnią w roślinie rolę auksyn, które są hormonami wzrostu. Kwas 2,4-D został odkryty podczas drugiej wojny światowej przez amerykańskich naukowców, jako jeden z pierwszych selektywnych herbicydów organicznych. Jest on toksyczny wobec roślin dwuliściennych, zaś wywiera mały wpływ lub żadnego na rośliny jednoliścienne, co czyni go znaczącym związkiem w agrochemii do selektywnej kontroli chwastów w uprawach traw i zbóż. Mimo, że herbicydy auksynowe są stosowane już od 60 lat i skutki ich działania na rośliny są znane, jednak mechanizm ich działania na poziomie molekularnym nie jest do końca poznany i jest przedmiotem aktualnie prowadzonych intensywnych badań. Próby wyjaśnienia mechanizmu działania herbicydów auksynowych opierają się głównie na działaniu naturalnych auksyn

[Sterling i Hall, 1997; Bukowska i inni, 1998; Grossman, 2000; Mathur i Hulskamp, 2001; Bukowska 2003; Filkowski i inni, 2003; Zeljezic i Garay-Vrhovac, 2004].

Rośliny posiadają substancje zaliczane do hormonów roślinnych, czyli fitohormonów, należą do nich: auksyny, gibereliny, cytokininy, etylen i kwas abscysynowy. Z punktu widzenia niniejszych badań na uwagę zasługują auksyny. Hormony roślinne to substancje pobudzające lub hamujące wzrost, różnicowanie i rozmnażanie komórek roślinnych. Zgodnie z definicją są to związki organiczne produkowane w określonej części rośliny i przenoszone do innych części, gdzie inicjują reakcję fizjologiczną. Jednak niektóre cechy hormonów roślinnych różnią je od typowych hormonów występujących u zwierząt. W przypadku hormonów roślinnych zarówno ich działanie, jak i budowa chemiczna jest na ogół mało specyficzna.

Najbardziej poznaną auksyną jest kwas indolilo-3-octowy (IAA), skrót pochodzi od angielskiej nazwy indoleacetic acid [za Solomon i inni, 1996]. Biosynteza IAA z aminokwasu tryptofanu odbywa się w stożkach wzrostu pędów roślin i w młodych liściach, skąd transportowana jest do innych części rośliny. Komórki wrażliwe na auksyny wiążą je do receptorów błonowych, co następnie zapoczątkowuje nieznany łańcuch reakcji, które regulują wzrost komórek roślinnych i ich różnicowanie. Receptory auksyn zostały odkryte między innymi w retikulum endoplazmatycznym (receptor ABP1) i w plazmalemmie, która jest uważana za nośnik IAA. Przesyłanie sygnału od receptora do miejsca odpowiedzi jest prawdopodobnie związane z ekspresją genów. Odpowiedzią na działanie auksyn jest wzrost komórek poprzez ich wydłużenie i podział. Auksyny pobudzają wzrost elongacyjny komórek, który zachodzi w merystemach wierzchołkowych tuż za strefą podziałów komórkowych. Auksyny są również czynnikiem indukującym dominację wierzchołkową w roślinie, tworzenie korzeni przybyszowych, stymulują rozwój drewna oraz owoców. Niektóre procesy rozwojowe są hamowane przez auksyny. Hamują one opadanie liści, wzrost wydłużeniowy korzeni oraz rozwój pąków pędowych [Solomon i inni, 1996; Sterling i Hall, 1997; Szwejkowska, 2000].

Znanych jest wiele syntetycznych herbicydów auksynowych o wysokiej aktywności, które nie występują w roślinach. Zaliczamy do nich między innymi herbicydy pochodne kwasów fenoksyalkanokarboksylowych (np. stosowany w tej pracy kwas 2,4-D). Istotnym elementem w klasyfikacji tych związków jest pozycja kwasu karboksylowego względem pierścienia aromatycznego oraz rodzaj grupy aromatycznej. Aktywność tych herbicydów zależy od rodzaju i wielkości ładunku podstawników w pierścieniu aromatycznym, które mają wpływ na oddziaływanie z błoną i receptorami błonowymi. Mechanizmy działania auksyn

naturalnych i syntetycznych zależą od ich struktury stereochemicznej i powinowactwa względem receptorów białkowych.

Kwas 2,4-D jest stosowany głównie dolistnie i transportowany wraz z sokiem roślinnym z liści do korzenia. Koncentruje się głównie w stożkach wzrostu. Rośliny jednoliścienne są mniej wrażliwe na te herbicydy, ponieważ system transportujący soki roślinne – floem, skupiony jest w wiązkach otoczonych przez sklerenchymę, zatem przemieszczanie się herbicydów auksynowych z miejsca aplikacji jest ograniczone.

Podobnie jak w przypadku naturalnych auksyn odpowiedź rośliny na działanie herbicydów auksynowych zależy od ich stężenia. W małych stężeniach działają one pobudzająco na wzrost, a w wysokich wykazują efekt fitotoksyczny. Niektóre herbicydy auksynowe stały się środkiem zastępczym dla IAA, oraz stymulatorami wzrostu dla niektórych kultur komórek roślinnych. Wrażliwość różnych tkanek (korzeni, pąków, merystemów) na działanie tych substancji jest różna na różnym etapie wzrostu.

Mechanizm działania IAA i 2,4-D jest bardzo podobny. Zwiększenie stężenia hormonu hamuje i zatrzymuje wzrost liści. Symptodem działania tych herbicydów jest epinastia, czyli zwinięcie wystających pędów i zwinięcie do środka liści. Następuje również zginanie i rozwarstwianie się łodygi oraz przerost korzenia. Korzenie stają się grube i zostaje zahamowany ich wzrost, gdyż tkanki tej przybywa znacznie więcej niż innych, co w konsekwencji niszczy epidermę tkanek łodygi i roślina wkrótce umiera [Greek i inni, 1987]

Istotnym problemem jest uodparnianie się roślin na herbicydy auksynowe. Odporność tą wykazują rośliny, które mają zdolność do przeżycia przy standardowej dawce herbicydu, podczas gdy wrażliwa roślina jest niezdolna do prowadzenia normalnego cyklu życia pod wpływem tej samej dawki związku. Wyłoniono już przynajmniej 117 klas chwastów na świecie, które uodporniły się na herbicydy auksynowe. Ponadto zaobserwowano zjawisko gatunkowej kompensacji chwastów, które polega na nadmiernym rozwoju chwastów niewrażliwych na 2,4-D na polach uprawnych, na których ten herbicyd był stosowany. Aby to zjawisko ograniczyć stosuje się 2,4-D w mieszaninach z innymi herbicydami, aby poszerzyć spektrum działania mieszaniny w stosunku do pojedynczych herbicydów. Takie mieszaniny są produkowane również w Polsce przez firmę Rokita S.A.

Kwas 2,4-D, jako znany i powszechnie stosowany herbicyd, jest również intensywnie badany, głównie w celu określenia jego toksyczności i mechanizmu działania na poziomie komórkowym. Fenoksyherbicydy plasują się w 3 i 4 klasie toksyczności, stąd powinny być umiarkowanie toksyczne dla ssaków. Średnia dawka śmiertelna LD_{50} dla 2,4-D i jego pochodnych jest określona w granicach 100 -1200 mg na kg masy ciała dla różnych gatunków

badanych zwierząt (dla ludzi wynosi ok. 28 g) [Moody i Nadeau, 1996; Charles i Leeming, 1998].

Toksyczność kwasu 2,4-D jest intensywnie badana, jednak nie ma ostatecznych wniosków, co do jego kancerogenności, mutagenności czy genotoksyczności [Zeljezic i inni, 2004; Arias, 2003; Filkowski i inni, 2003; Cho i inni, 2002; Bushra i inni, 2002; Kaoumowa i inni, 2001].

Szereg badań dotyczących molekularnego mechanizmu działania kwasu 2,4-D prowadzonych jest na erytrocytach ludzkich i zwierzęcych. Na podstawie takich badań stwierdzono, że kwas 2,4-D łączy się z białkiem - albuminą [Rosso i inni, 1998]. Wiele badań wskazuje, że metabolity 2,4-D są bardziej toksyczne niż sam kwas np.: 2,4-dichlorofenol, może być odpowiedzialny, jak się sugeruje, za powstawanie nowotworów [Mehmood i inni, 1996]. Pod wpływem związków 2,4-D i 2,4-dichlorofenolu następują zmiany strukturalne hemoglobiny [Bukowska i inni, 1998, 2003; Bukowska, 2003] i spadek aktywności enzymu katalazy [Bukowska i inni, 2000; Duchnowicz i inni, 2002]. 2,4-D zmienia też płynność błony, co może być spowodowane utlenieniem lipidów [Domenech i inni, 1997; Duchnowicz i Koter, 2003]. 2,4-D może modyfikować dwuwarstwę lipidową błony, a w związku z tym zaburzać prawidłową funkcję błony komórkowej.

2,4-D wywołuje takie choroby jak: anemię, monocytozę, limfocytozę, eosinofilię oraz powoduje zmiany objętości i kształtu erytrocytów [Bukowska i inni, 2000]. Kwas ten jest cząsteczką lipofilową i oddziałuje z zewnętrzną warstwą błony biologicznej, powodując strukturalne zaburzenia w hydrofobowym rejonie błony i wpływa na rozmieszczenie główek polarnych lipidów [Bukowska i Zatorska, 2003]. Wykazano, że 2,4-D powoduje powstawanie echinocytów, w wyniku łączenia się z fosfatydylocholiną (DMPC), która zlokalizowana jest głównie w zewnętrznej monowarstwie błony erytrocytów [Suwalsky i inni, 1996]. Zakłócenia w strukturze błony erytrocytów spowodowane wbudowaniem się 2,4-D do zewnętrznej monowarstwy lipidowej może prowadzić bezpośrednio do utraty integralności membrany (hemolizy), a także w wyniku zmniejszenia oddziaływań między składnikami błony, może ułatwiać penetrację w głąb dwuwarstwy innym związkom, które powodują utlenianie lipidów i indukują hemolizę erytrocytów. Wykazano ponadto, że kwas 2,4-D powoduje silne blokowanie kanałów jonowych w ludzkich komórkach glejowych i aktywację jonów Cl^- [Roy i inni, 1998; Suwalsky i inni, 1999; Ateeq i inni, 2002].

II.4.3. Cele łączenia związków

Interakcje między związkami biologicznie aktywnymi są wykorzystywane w wielu dziedzinach nauk takich jak.: farmakologia, immunologia, toksykologia, fizjologia i nauki o środowisku [Kortenkamp i inni, 1998; Groten i inni, 2001; Belzile i inni, 2000; Fitzmaurice, 2000]. Wiele procesów biologicznych wymaga jednoczesnego działania dwóch lub więcej współpracujących ze sobą związków do otrzymania oczekiwanego efektu [Singh i Singh, 2000].

W przypadku pestycydów łączenie ze sobą różnych związków w mieszaniny dwu lub wieloskładnikowe, ma na celu przede wszystkim podniesienie aktywności biologicznej mieszaniny w stosunku do aktywności pojedynczych jej składników, których działanie jest w większym lub mniejszym stopniu poznane. Pestycydy łączy się w mieszaniny głównie z trzech powodów:

- aby poszerzyć spektrum aktywności biologicznej do kontroli wielu szkodników jednocześnie,
- aby wykorzystać addytywne lub synergiczne oddziaływania między pestycydami, przy których aktywność i wydajność mieszaniny wzrasta, zaś dawki mogą być zredukowane bez utraty aktywności i tym samym przyczynić się do ochrony środowiska,
- aby opóźnić proces selekcji w uzyskiwaniu oporności przez rośliny na jeden ze składników mieszaniny.

Łączenie pestycydów ma więc na celu podniesienie aktywności biologicznej i zmianę innych właściwości znanych i stosowanych na rynku preparatów.

W ostatnich latach wiele badań prowadzi się nad aktywnością mieszanin związków z grupy pestycydów [Pape-Lindstrom i Lydy, 1997; Tripathi i Agarwal, 1997, 1998; Malich i inni, 1998; Oruc i Uner, 2000 a i b; Blumell i Gross, 2001]. Poszukiwanie i tworzenie różnego typu mieszanin jest dzisiaj powszechne, czego przykłady można znaleźć w literaturze. Coraz powszechniejsza staje się bowiem odporność roślin na obecnie produkowane i stosowane herbicydy, co powoduje konieczność poszukiwania nowych związków biologicznie aktywnych lub łączenie dotychczas stosowanych. Mieszaniny są korzystne w przypadku chwastów, które mają dobrze rozwinięty system odpornościowy i zdążyły już uodpornić się na jeden ze składników mieszaniny. Takim przykładem może być zaślaz pospolity i przymiotno kanadyjskie, które uodporniły się na glifosat i jest to poważny problemem dla plantatorów w wielu krajach. W wyniku zastosowania mieszaniny złożonej z glifosatu i innych związków na zaślaz, uzyskano efekty synergiczne w warunkach polowych i w szklarni dla tych samych

dawek mieszaniny, choć w szklarni efekty współdziałania herbicydów były większe [Chorbadijan i Kogan, 2002]. Łączy się też herbicydy z fungicydami, co pozwala na kontrolę chwastów i grzybów jednocześnie, jak również z insektycydami [Gisi, 1996; Groten i inni, 2001; Feron i Groten, 2002].

W przeprowadzonych w tej pracy badaniach łączono aminofosfoniany ze znanymi i stosowanymi już składnikami aktywnymi herbicydów (kwasem 2,4-D i fosfonometyloglicyną), w celu uzyskania wzrostu aktywności biologicznej mieszaniny, w stosunku do aktywności poszczególnych jej składników. Szczególnie istotne jest znalezienie wśród badanych aminofosfonianów, dobrych synergetyków 2,4-D i FMG po to, aby: poszerzyć spektrum ich działania, opóźnić proces selekcji i uodparniania się chwastów na te substancji oraz zmniejszenie ich dawek. Aminofosfoniany natomiast są związkami bezpieczniejszymi dla środowiska naturalnego od 2,4-D i FMG, szybko metabolizowanymi przez mikroflorę glebową do prostych związków nietoksycznych.

III. Cel pracy

Podjęte w tej pracy badania miały na celu ocenę aktywności biologicznej nowych związków z grupy aminofosfonianów oraz określenie molekularnego mechanizmu oddziaływania tych związków z błoną biologiczną. Badania dotyczyły również znanych związków należących do herbicydów, których molekularny mechanizm oddziaływania z błoną biologiczną nie został w pełni wyjaśniony. Ocenie została również poddana aktywność biologiczna dwuskładnikowych mieszanin, utworzonych z jednego związku z grupy aminofosfonianów oraz składnika aktywnego znanych i powszechnie stosowanych w uprawach herbicydów.

Celem badań było również, dzięki wyborowi odpowiednich substancji, określenie zależności między aktywnością biologiczną związków a ich strukturą chemiczną, w szczególności wskazanie wpływu, jaki mają różne grupy funkcyjne badanych substancji na ich aktywność.

Aktywność biologiczną związków określano na podstawie ich oddziaływania z błoną erytrocytów, traktowaną zarówno jako model błony biologicznej, jak również jako przykład takiej błony oraz porównywano ją z aktywnością biologiczną w odniesieniu do roślin wyższych. W szczególności aktywność użytych w pracy substancji określano na podstawie zmian parametrów fizycznych wynikających ze zmiany właściwości i struktury błony erytrocytów takich jak: zmiana oporności osmotycznej erytrocytów, zmiana płynności błony, zmiana kształtu erytrocytów. Parametry te zostały zmierzone przy wykorzystaniu metody: spektroskopii absorpcyjnej, spektroskopii fluorescencyjnej, mikroskopowego badania kształtu erytrocytów, stopnia inhibicji wzrostu roślin wyższych i wydajności kiełkowania nasion. Aktywność związków określano również na podstawie ich zdolności do indukowania hemolizy, która wyrażona jest jako toksyczność hemolityczna związku.

Prezentowane badania odpowiadają następującym celom szczegółowym:

1. Ocena aktywności biologicznej stosowanych substancji w odniesieniu do modelowej błony biologicznej i w odniesieniu do roślin wyższych.
2. Zastosowanie fizycznych metod badawczych, które pozwalają zmierzyć zmiany parametrów fizycznych błony modelowej, w wyniku oddziaływania z nią badanych substancji.
3. Określenie zależności między wielkością zmian parametrów fizycznych a strukturą użytych substancji oraz molekularnego mechanizmu ich działania.

4. Ocena skuteczności działania mieszanin stosowanych związków w porównaniu ze skutecznością działania poszczególnych składników mieszaniny.
5. Sprawdzenie przydatności błony modelowej o poznanych należycie właściwościach i strukturze do testowania związków oddziałujących aktywnie z błonami biologicznymi.

Otrzymane w tej pracy wyniki badań przede wszystkim będą mogły być wykorzystane przy projektowaniu struktur i syntezie nowych związków o właściwościach herbicydów, które wykazywałyby optymalną skuteczność. Z punktu widzenia ochrony środowiska naturalnego, znajomość molekularnego mechanizmu oddziaływania tych związków z błoną biologiczną, może być wykorzystana do ochrony organizmów żywych, przeciwko którym związki te nie są skierowane.

IV. Materiały i metody

IV.1 Materiały

IV.1.1. Erytrocyty i cienie erytrocytów

Badania były prowadzone na erytrocytach i błonach erytrocytów, otrzymywanych ze świeżej krwi świni, pobieranej do soli fizjologicznej z dodatkiem heparyny. Osocze wraz z leukocytami usuwano, natomiast krwinki płukano czterokrotnie w odpowiednim dla danego rodzaju badań roztworze. Cienie otrzymywano według metody Dodge'a [Dodge i inni, 1963]. Zawartość erytrocytów w zawiesinie określano na podstawie mierzonego hematokrytu, natomiast zawartość cieni erytrocytów na podstawie stężenia białka; stężenie to oznaczano metodą Bradford [Bradford, 1976].

IV.1.2. Rośliny wyższe stosowane w testach biologicznych

W badaniach biologicznych służących do oceny aktywności biologicznej potencjalnych herbicydów metodą testu wzrostu i kiełkowania użyto 3 rodzaje nasion roślin wyższych: ogórka, pszenicy i gorczycy.

IV.1.3. Roztwory

W badaniach hemolitycznych i mikroskopowych używany był bufor fosforanowy o pH 7,4 i następującym składzie: 131 mM NaCl; 1,79 mM KCl; 0,86 mM $MgCl_2$; 11,79 mM $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$; 1,80 mM $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$. Do rozpuszczania badanych związków stosowano roztwór soli fizjologicznej (0,9 % NaCl).

Oporność osmotyczną krwinek badano w hipotonicznych roztworach NaCl o stężeniach od 0,5 % do 0,88 %. W badaniach płynności błony erytrocytów, cienie umieszczano w soli fizjologicznej. W eksperymentach dotyczących hamowania wzrostu roślin i kiełkowania nasion stosowano wodę destylowaną.

IV.1.4. Odczynniki

Aldehyd glutarowy – $\text{OHC}(\text{CH}_2)_3\text{CHO}$ stosowany do utrwalania komórek w badaniach mikroskopowych

DMF – dimetyloformamid stosowany do rozpuszczania sond fluorescencyjnych

Odczynnik Bradford - Bio-Rad Protein Assay stosowany do oznaczania stężenia białka w cieniach erytrocytów,

Sondy fluorescencyjne

DPH - 1,6-difenylo-1,3,5-heksatrien

TMA-DPH - p-toluenosulfonian [1-(4-trimetyloamoniofenylo)-6-fenylo-1,3,5-heksatrienu]

TMAP-DPH - p-toluenosulfonian N-[1-propylo-(4-trimetyloamoniofenylo)-6-fenylo-1,3,5-heksatrienu]

Laurdan - 2-dimetyloamino-6-laurylonaftalen

IV.1.5. Substancje stosowane w pracy

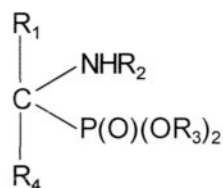
W przedstawionych w tej pracy badaniach użyto związki biologicznie aktywne fosforoorganiczne, o właściwościach potencjalnych herbicydów. Większość z nich to substancje nowe, nieopisane dotychczas w literaturze przez innych autorów, otrzymane na drodze syntezy w Instytucie Chemii Organicznej, Biochemii i Biotechnologii Politechniki Wrocławskiej. Przy użyciu spektrofotometru (Bruker Avance DRX₃₀₀) sprawdzono ich strukturę i czystość na podstawie widm $^1\text{H-NMR}$, otrzymanych w chloroformie deuterowanym.

W pracy użyto także kwas dichlorofenoksyoctowy (2,4-D) i fosfonometyloglicynę (FMG) zakupione w firmie: Sigma Aldrich Chemical Co., które są głównymi składnikami bioaktywnymi znanych i powszechnie stosowanych na rynku preparatów herbicydowych o nazwach: „Aminopielik” (2,4-D) oraz „Roundup” (FMG).

Związki fosforoorganiczne ze względu na budowę chemiczną można podzielić na trzy grupy: acykliczne, cykliczne i pochodne fluorenu.

Związki acykliczne

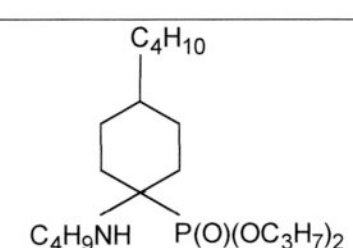
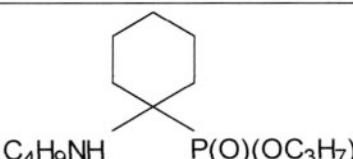
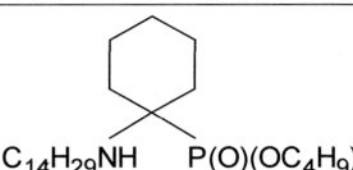
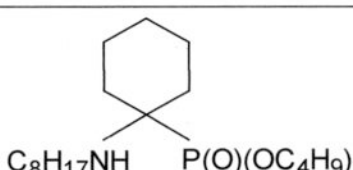
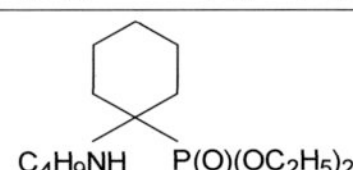
Ze związków acyklicznych fosforoorganicznych wykorzystano aminowe pochodne kwasu aminofosfonowego, które oznaczono symbolem AFa-n, gdzie $n=1,2,3,4,5,6,7$ o następującej strukturze ogólnej:



Symbol	Nazwa	Wzór sumaryczny	Wzór strukturalny
AFa-1	Ester di-n-butyłowy kwasu 2-(N-n- butyloamino) heptanofosfonowego-2	$C_{19}H_{42}NO_3P$ m. cz. 363	$ \begin{array}{c} C_5H_{11} \\ \\ C \begin{array}{l} \nearrow NHC_4H_9 \\ \searrow P(O)(OC_4H_9)_2 \end{array} \\ \\ CH_3 \end{array} $
AFa-2	Ester di-n-butyłowy kwasu 2-(N-n- heksyloamino) heksanofosfonowego-2	$C_{20}H_{44}NO_3P$ m. cz. 377	$ \begin{array}{c} C_4H_9 \\ \\ C \begin{array}{l} \nearrow NHC_6H_{13} \\ \searrow P(O)(OC_4H_9)_2 \end{array} \\ \\ CH_3 \end{array} $
AFa-3	Ester di-etyłowy kwasu 2-(N-n-butyloamino) heptanofosfonowego-2	$C_{15}H_{34}NO_3P$ m. cz. 307	$ \begin{array}{c} C_5H_{11} \\ \\ C \begin{array}{l} \nearrow NHC_4H_9 \\ \searrow P(O)(OC_2H_5)_2 \end{array} \\ \\ CH_3 \end{array} $
AFa-4	Ester di-n-butyłowy kwasu 2-(N-n- propyloamino) heksanofosfonowego-2	$C_{17}H_{38}NO_3P$ m. cz. 335	$ \begin{array}{c} C_4H_9 \\ \\ C \begin{array}{l} \nearrow NHC_3H_7 \\ \searrow P(O)(OC_4H_9)_2 \end{array} \\ \\ CH_3 \end{array} $
AFa-5	Ester di-n-butyłowy kwasu 2-(N-n- oktyloamino) propanofosfonowego-2	$C_{19}H_{42}PO_3N$ m. cz. 363	$ \begin{array}{c} CH_3 \\ \\ C \begin{array}{l} \nearrow NHC_8H_{17} \\ \searrow P(O)(OC_4H_9)_2 \end{array} \\ \\ CH_3 \end{array} $
AFa-6	Ester di-etyłowy kwasu 1-(N-n-pentyloamino) dekanofosfonowego-1	$C_{19}H_{42}PO_3N$ m. cz. 363	$ \begin{array}{c} C_9H_{19} \\ \\ C \begin{array}{l} \nearrow NHC_5H_{11} \\ \searrow P(O)(OC_2H_5)_2 \end{array} \\ \\ H \end{array} $
AFa-7	Ester di-etyłowy kwasu 1-(N-n-pentyloamino) heptanofosfonowego-1	$C_{16}H_{36}PO_3N$ m. cz. 321	$ \begin{array}{c} C_6H_{13} \\ \\ C \begin{array}{l} \nearrow NHC_5H_{11} \\ \searrow P(O)(OC_2H_5)_2 \end{array} \\ \\ H \end{array} $

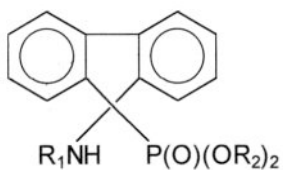
Związki cykliczne

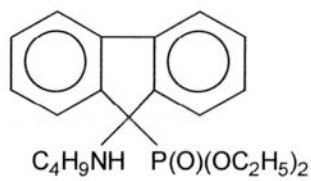
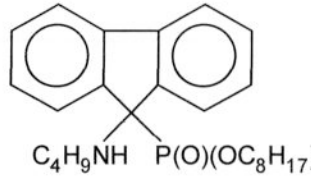
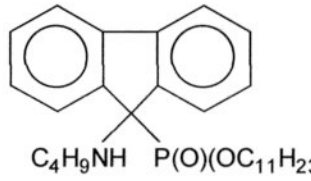
Grupę związków cyklicznych fosforoorganicznych stanowiły aminowe pochodne kwasu cykloheksanoaminofosfonowego o symbolach AFc-n, gdzie n=1,2,3,4,5.

Symbol	Nazwa	Wzór sumaryczny	Wzór strukturalny
AFc-1	Ester di-n-propylowy kwasu 4-n-butylo,1-(n-butyloamino) cykloheksanofosfonowego-1	$C_{22}H_{46}PO_3N$ m. cz. 403	
AFc-2	Ester di-n-izopropylowy kwasu 1(n-butyloamino) cykloheksanofosfonowego-1	$C_{19}H_{34}PO_3N$ m. cz. 355	
AFc-3	Ester di-n-butyłowy kwasu 1-(n-tetradecyloamino) cykloheksanofosfonowego-1	$C_{28}H_{58}PO_3N$ m. cz. 487	
AFc-4	Ester di-n-butyłowy kwasu 1-(n-oktyloamino) cykloheksanofosfonowego-1	$C_{22}H_{41}PO_3N$ m. cz. 398	
AFc-5	Ester di-etyłowy kwasu 1-(n-butyloamino) cykloheksanofosfonowego-1	$C_{12}H_{26}O_3NP$ m. cz. 327	

Związki pochodne fluorenu

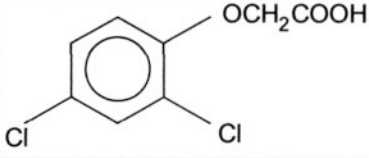
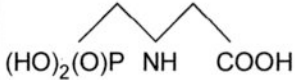
Tą grupę stanowią związki fosforoorganiczne, aminowe pochodne kwasu fluorenofosfonowego o symbolach AFm-n, gdzie n=1,2,3, o strukturze ogólnej:



Symbol	Nazwa	Wzór sumaryczny	Wzór strukturalny
AFm-1	Ester di-etylowy kwasu 9-(n-butyloamino) fluorenofosfonowego-9	$C_{21}H_{27}PO_3N$ m. cz. 372	 $C_4H_9NH \quad P(O)(OC_2H_5)_2$
AFm-2	Ester di-n-oktylowy kwasu 9-(n-butyloamino) fluorenofosfonowego-9	$C_{33}H_{51}PO_3N$ m. cz. 540	 $C_4H_9NH \quad P(O)(OC_8H_{17})_2$
AFm-3	Ester di-n-undecylowy kwasu 9-(n-butyloamino) fluorenofosfonowego-9	$C_{39}H_{63}PO_3N$ m. cz. 624	 $C_4H_9NH \quad P(O)(OC_{11}H_{23})_2$

Aktywne składniki herbicydów

Do badań użyto również aktywne składniki herbicydów stosowanych w uprawach: kwas (2,4-dichlorofenoksy)octowy (2,4-D) i N-(fosfonometylo)glicyna (FMG).

Nazwa	Nazwa chemiczna	Wzór sumaryczny	Wzór strukturalny
2,4-D	kwas (2,4-dichlorofenoksy)octowy	$C_8H_6Cl_2O_3$ m. cz. 220	
FMG	N-(fosfonometylo)glicyna, (glifosat)	$C_3H_8NO_5P$ m. cz. 169	

IV.2. Metody

IV.2.1. Metoda spektroskopii absorpcyjnej

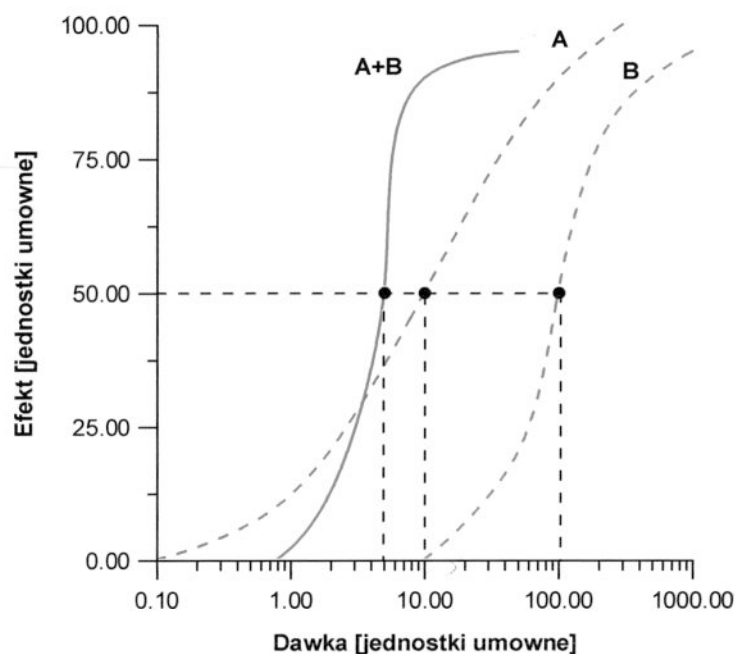
IV.2.1.1. Toksyczność hemolityczna związków

Oddzielone od osocza krwinki czerwone płukano dwukrotnie w soli fizjologicznej a następnie dwukrotnie w buforze fosforanowym o pH 7,4. Wyplukane krwinki zawieszano w roztworze soli fizjologicznej w probówkach pomiarowych zawierających odpowiednie ilości badanych związków. Pomiar stopnia hemolizy przeprowadzano przy 2% wartości hematokrytu. Modyfikacja erytrocytów badanymi związkami trwała 1 godzinę w temperaturze 37 °C. Po jej zakończeniu próbki wirowano w temperaturze pokojowej w czasie 3 minut z przyspieszeniem 3000 g. Stężenie hemoglobiny w supernatancie mierzono spektrofotometrycznie (Specol 11) przy długości fali $\lambda = 540$ nm i traktowano jako miarę ilości zhemolizowanych krwinek, wyrażano ją w procentach, względem stężenia hemoglobiny w próbce kontrolnej całkowicie zhemolizowanej [Ponder, 1948; Kondo, 1979; Raval i inni, 1989; Boyer i inni, 1993; Hamasaki i inni, 1995].

IV.2.1.2. Toksyczność hemolityczna mieszanin równomolarnych

Wyplukane jak wyżej krwinki zawieszano w roztworze soli fizjologicznej rozdzielonym do probówek pomiarowych, zawierających odpowiednie ilości badanych związków i ich równomolarne mieszaniny, powstałe z połączenia każdego z tych związków z kwasem 2,4-D albo z FMG. Pomiar stopnia hemolizy wykonywany był w taki sam sposób jak przy pomiarach przeprowadzonych dla pojedynczych związków.

Na podstawie uzyskanych krzywych hemolitycznych dla pojedynczych związków wyznaczano wartości C_{50} , tj. wartości stężenia powodującego 50% hemolizę erytrocytów modyfikowanych pojedynczymi związkami, jak również C_{50} dla równomolarnej mieszaniny związków. Dla dowolnego procesu na rysunku 4.1. przedstawiono hipotetyczne krzywe dla związków A i B, jak również krzywą A+B dla równomolarnej mieszaniny oraz zaznaczono wartości dające 50 % efekt [Gessner, 1988; Kortenkamp i inni, 1998].



Rys. 4.1. Hipotetyczne krzywe dla związków A i B i ich równomolarnej mieszaniny A+B z zaznaczonym 50 % efektem [Kortenkamp i inni, 1998].

W wyniku połączenia związków mogą zachodzić różne procesy w zależności od właściwości pojedynczych związków, możliwości ich współdziałania, sposobu ich oddziaływania na błony i współdziałania związków ze sobą w oddziaływaniu z błonami. Na klasyfikację efektów powstałych w wyniku działania mieszanin na obiekty biologiczne pozwala następujące addytywne wyrażenie algebraiczne [Berenbaum, 1998]:

$$c_A/C_A + c_B/C_B = 1,$$

gdzie

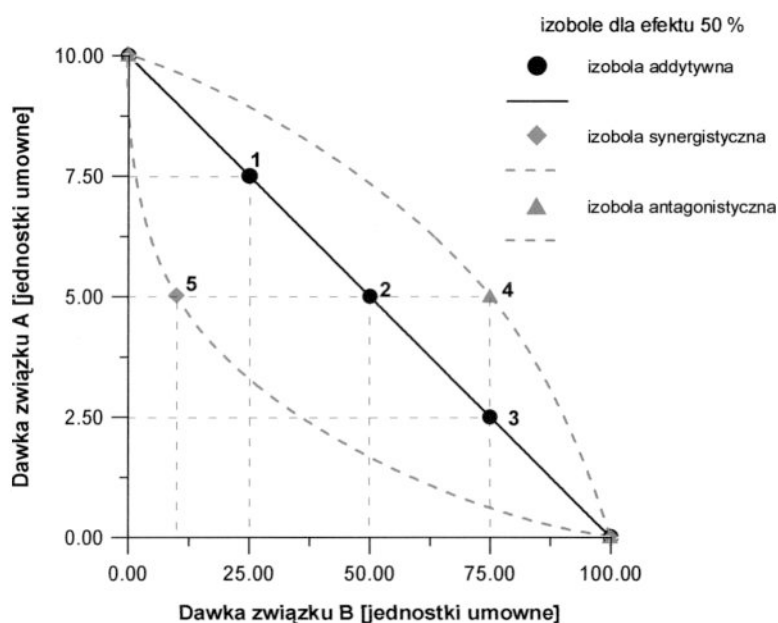
- c_A i c_B są stężeniami związków A i B w mieszaninie, powodującymi określony efekt,
- C_A i C_B są stężeniami związków dającymi pojedynczo określony efekt.

Na podstawie tego wyrażenia algebraicznego można określić 3 rodzaje efektów:

1. Addytywny - brak oddziaływania między związkami, aktywność mieszaniny obu związków jest sumą aktywności jej składników; $c_A/C_A + c_B/C_B = 1$
2. Synergiczny - stężenia związków A i B odpowiedzialnych za określony efekt są niższe w zawiesinie, związki oddziałują z błonami w sposób wzmacniający aktywność mieszaniny; $c_A/C_A + c_B/C_B < 1$
3. Antagonistyczny- stężenia związków A i B odpowiedzialnych za określony efekt są wyższe w zawiesinie, związki oddziałują z błonami w sposób obniżający aktywność mieszaniny; $c_A/C_A + c_B/C_B > 1$.

Do określenia 50 % efektu, spowodowanego mieszaniną dwóch związków, sporządzono tzw. wykresy izobolowe (krzywe łączące punkty o takim samym efekcie). Wartości C_{50}

uzyskane dla każdego związku zostały naniesione na końcach odpowiednio osi X i Y oraz połączone prostą zwaną addytywną. Na otrzymanej prostej addytywnej, która oznacza brak oddziaływania między związkami, każdy punkt tej prostej (np.: 1, 2, 3 na rys.4.2.) pozwala odczytać kombinację stężeń dwóch związków w mieszaninie indukujących efekt 50 %. Następnie w tym układzie naniesiona została wartość C_{50} dla mieszaniny, odczytana z krzywej A+B (rys. 4.2.). Jeśli ta wartość leży na prostej addytywnej, uzyskany efekt dla mieszaniny związków jest addytywny, jeśli pod prostą (punkt 5 na rys. 4.2.) to efekt jest synergiczny, jeśli zaś nad prostą (punkt 4 na rys. 4.2.) to efekt jest antagonistyczny [Kortenkamp i inni, 1998; Tripathi i Agarwal, 1997; Haas i inni, 1997; Boesten, 2000; Alves i inni, 2000].



Rys. 4.2. Izobole wykreślone dla efektu 50 % [Kortenkamp i inni, 1998].

IV.2.1.3. Toksyczność hemolityczna mieszanin nierównomolarnych

Wypłukane krwinki zawieszano w roztworze soli fizjologicznej rozdzielanym do probówek pomiarowych, zawierających odpowiednie ilości poszczególnych związków lub ich dwuskładnikowe mieszaniny, w których związki występowały w różnych stężeniach molarnych. Pomiar stopnia hemolizy wykonywany był w taki sam sposób, jak przedstawiono powyżej dla pojedynczych związków.

W tej metodzie określania aktywności mieszaniny związków wprowadzono pojęcie jednostki toksyczności (toxic unit) i oznaczono ją TU. Wartość 1 TU odpowiada stężeniu molowemu pojedynczego związku (C_{50}) powodującemu efekt 50 % hemolizy. W przypadku

mieszaniny dwóch związków jednostkę toksyczności obliczano z zależności algebraicznej [Pape-Lindstrom i inni, 1997; Berenbaum, 1998]:

$$C_A/C_{50A} + C_B/C_{50B} = TU,$$

gdzie

- C_A to stężenie związku A w mieszaninie dające efekt 50%,
- C_B to stężenie związku B w mieszaninie dające efekt 50%,
- C_{50A} stężenie związku A powodującego 50% efekt pojedynczo,
- C_{50B} stężenie związku B powodującego 50% efekt pojedynczo.

Wartość 2 TU ma mieszanina, w której stężenie związku A wynosi C_{50A} , a stężenie związku B wynosi C_{50B} , stężenia te są różne ze względu na różną aktywność związków. Jeśli taki roztwór rozcieńczymy dwukrotnie to otrzymamy roztwór o wartości 1 TU. Aby określić aktywność mieszaniny należy przygotować roztwory, dla których wartości stężeń wyrażone są w jednostkach TU i wynoszą: 2; 1,75; 1,5; 1,25; 0,75; 0,5. Po inkubacji erytrocytów w tych roztworach mierzymy procent hemolizy i wykreślamy krzywą hemolityczną. Na podstawie tej krzywej wyznaczamy wartość stężenia mieszaniny w jednostkach TU, odpowiedzialnego za 50 % hemolizę. W zależności od wartości tego stężenia określano aktywność mieszaniny związków w oddziaływaniu z błoną erytrocytów następująco:

- dla stężeń związków w roztworze równym 1 TU - addytywność,
- dla stężeń związków w roztworze większym od 1 TU - antagonizm,
- dla stężeń związków w roztworze mniejszym od 1 TU - synergizm.

IV.2.1.4. Oporność osmotyczna erytrocytów

W badaniach oporności osmotycznej erytrocyty poddawano najpierw modyfikacji, w obecności badanych związków, a następnie modyfikator usuwano. Wypłukane erytrocyty zawieszano w buforze fosforanowym o pH 7,4, zawierającym dany związek, o stężeniu niewywołującym żadnej hemolizy w dostatecznie długim czasie. Badane próbki inkubowano w czasie 1 godziny w temperaturze 37 °C. Zawiesinę krwinek następnie wirowano, usuwano roztwór modyfikujący, a krwinki zawieszano w roztworze izotonicznym i w wybranych roztworach hipotonicznych chlorku sodowego. Stężenia NaCl w poszczególnych próbkach różniły się o 0,02 % poczynając od 0,5 % do 0,88 %. W takich roztworach zawieszano również krwinki niemodyfikowane, względem których określano zmiany oporności osmotycznej. Po dokładnym wymieszaniu zawiesiny krwinek i odwirowaniu, mierzono procent hemolizy jak wyżej.

IV.2.2. Metoda spektroskopii fluorescencyjnej

IV.2.2.1. Wyznaczanie polaryzacji i anizotropii fluorescencji

Skutki oddziaływania związków biologicznie aktywnych z błonami erytrocytów określano również na podstawie zmian polaryzacji i anizotropii fluorescencji sond fluorescencyjnych: DPH, TMA-DPH i TMAP-DPH. Polaryzację (P) i anizotropię (A) fluorescencji stacjonarnej obliczano według wzoru [Lakowicz, 1999]:

$$P = \frac{I_{\parallel} - GI_{\perp}}{I_{\parallel} + GI_{\perp}},$$

$$A = \frac{I_{\parallel} - GI_{\perp}}{I_{\parallel} + 2GI_{\perp}},$$

gdzie $I_{\parallel}$, $I_{\perp}$ - natężenia fluorescencji mierzonej odpowiednio w kierunku równoległym i prostopadłym względem kierunku spolaryzowanej wiązki wzbudzającej. G jest stałą aparaturową zależną od długości fali emisji. Wzrost polaryzacji i anizotropii (w porównaniu z ich wartościami dla próbki kontrolnej), wskazuje na wzrost uporządkowania strukturalnego w otoczeniu znacznika fluorescencyjnego (wzrost sztywności błony), zaś ich zmniejszenie świadczy o mniejszym uporządkowaniu (wzroście płynności) [Lakowicz, 1999; Campbell i Dwek, 1984; Lentz, 1988]. Roztwory wyjściowe sond fluorescencyjnych o stężeniach ok. 1 mM przygotowywano w dimetyloformamidzie (DMF). Stężenie sond w próbkach pomiarowych wynosiło ok. 1 μ M, zawartość cieni w próbce badanej określana była poprzez stężenie białka i wynosiło ok. 100 μ g/ml. Długość fali wzbudzenia dla sondy fluorescencyjnej DPH wynosiła 360 nm, długość fali emisji 425 nm. Długość fali wzbudzenia dla sondy fluorescencyjnej TMA-DPH wynosiła 358 nm, zaś emisji 428 nm. Dla sondy fluorescencyjnej TMAP-DPH długość fali wzbudzenia i emisji wynosiły odpowiednio 354 nm i 429 nm. Pomiar spektrofotometryczny wykonywano w temperaturze 25 °C przy użyciu spektrometru firmy Kontron, model SFM 25.

IV.2.2.2. Wyznaczanie uogólnionej polaryzacji

Wpływ związków aktywnych biologicznie na błonę erytrocytów określano również na podstawie zmian uogólnionej polaryzacji fluorescencji (General Polarization - GP) dla sondy fluorescencyjnej Laurdan, która jest amfifilową sondą o dużej wrażliwości widma absorpcji i

emisji na stan fizyczny błony. Fluorescencyjna część cząsteczki Laurdanu przekazuje informacje z hydrofilowej części błony. Przesunięcie spektralne widma fluorescencji sondy Laurdan wyznacza się na podstawie uogólnionej polaryzacji GP, która określa organizację główek polarnych lipidów w błonie erythrocytu i wyraża się zależnością [Suwalsky i inni, 2003; Parasassi i inni, 1994]:

$$GP = \frac{I_b - I_r}{I_b + I_r},$$

gdzie I_b i I_r są natężeniami fluorescencji światła wyemitowanego w zakresie odpowiednio długości fali światła niebieskiego i czerwonego. Intensywności fluorescencji były mierzone przy długości fali pobudzenia $\lambda_{ex} = 360$ nm i długości fal emisji $\lambda_b = 440$ nm i $\lambda_r = 490$ nm odpowiednio dla światła niebieskiego i czerwonego. Odpowiadają one maksimum emisji Laurdanu w przypadku, gdy lipidy błonowe znajdują się w fazie żelu lub w fazie ciekłokrystalicznej. Wzrost uogólnionej polaryzacji GP (w porównaniu z jego wartością dla próbki kontrolnej) wskazuje na wzrost uporządkowania strukturalnego w otoczeniu znacznika fluorescencyjnego, czyli zwiększenie uporządkowania fazy hydrofilowej błony. Mniejsze wartości GP świadczą o wzroście nieuporządkowania w części hydrofilowej błony. Wysokie wartości GP wskazują, że błona znajduje się w fazie żelu zaś niskie, a nawet ujemne, że w fazie ciekłokrystalicznej.

Pomiary spektrofлуorymetryczne wykonywano w warunkach jak dla pozostałych sond.

IV.2.3. Metoda mikroskopowa badania kształtu erythrocytów

Do pomiarów w mikroskopie optycznym oddzielone od osocza krwinki czerwone płukano czterokrotnie w soli fizjologicznej, a następnie zawieszano w soli fizjologicznej w probówkach pomiarowych, zawierających odpowiednie ilości badanych związków. Hematokryt erythrocytów w roztworze modyfikującym wynosił 2 %, modyfikacja erythrocytów trwała 1 godzinę w temperaturze 37 °C. Po modyfikacji erythrocyty były utrwalane w 0,2 % roztworze glutaraldehydu, a następnie obserwowano ich kształt w kontrastowym mikroskopie fazowym (Olympus BH-2), wyposażonym w kamerę wideo. Erythrocyty mogą przyjmować kształty; stomatocytów, kiedy substancje wbudowują się głównie do wewnętrznej warstwy dwuwarstwy lipidowej błony lub echinocytów, jeśli substancje koncentrują się głównie w zewnętrznej warstwie błony komórkowej. W ramach tych dwóch podstawowych rodzajów kształtu tj. stomatocytów i echinocytów zgodnie ze skalą Bessis'a i Brecher'a wyróżniono szereg form krwinek czerwonych, którym przyporządkowano odpowiednie indeksy

morfologiczne. Badania kształtu erytrocytów wykonano w Zakładzie Biofizyki Politechniki Wrocławskiej. Utrwalone na zdjęciach zmodyfikowane erytrocyty różnych kształtów zliczano i wyznaczano procentowy udział różnych form w badanej populacji (ok.400) komórek.

IV.2.4. Badanie stopnia inhibicji wzrostu roślin wyższych

Aktywność biologiczną badanych związków oceniono na podstawie ich wpływu na inhibicję wzrostu roślin. W badaniach tych wykorzystano nasiona roślin pszenicy i ogórka. Taki wybór roślin był związany z użytymi w badaniach aktywnymi składnikami znanych herbicydów, które wykazują największą aktywność w oddziaływaniu z roślinami odpowiednio: glifosat w odniesieniu do roślin jednoliściennych, do których należy pszenica oraz 2,4-D w odniesieniu do roślin dwuliściennych, do których zaliczany jest ogórek.

Stężenia związków w tych badaniach wyrażano w jednostkach toksyczności. Jednostka toksyczności (1 TU) odpowiada takiemu stężeniu związku, które powoduje 50 % zahamowanie wzrostu roślin (EC_{50}). W przypadku mieszaniny dwóch związków wartość jednostki toksyczności obliczana jest ze wzoru [Berenbaum, 1998; Pape-Lindstrom i inni, 1997]:

$$C_A/EC_{50A} + C_B/EC_{50B} = TU,$$

gdzie C_A i C_B oznaczają stężenia związków A i B w mieszaninie, a EC_{50A} i EC_{50B} odpowiadają stężeniom związków A i B powodujących 50 % zahamowanie wzrostu roślin.

Aby określić wartość stężenia EC_{50} w jednostkach TU dla poszczególnych związków przeprowadzano test wzrostowy ogórka (*Cucumis sativus*) i pszenicy (*Triticum*). 15 nasion wykiełkowanych w czasie 48 godzin w temperaturze 25 °C, umieszczano na szalkach Petriego (9 cm) na dwóch warstwach bibuły typu Whatman No. 2, nasączonej wodą destylowaną (kontrola) i pięcioma roztworami badanego związku o różnych stężeniach. Szalki umieszczano w komorze wegetacyjnej SANYO® przy ustalonej wilgotności w temperaturze 25 °C, na 96 godzin w cyklu dobowym przy 9 godzinach bez naświetlania (noc) i 15 godzinach naświetlania (dzień). Po upływie wyznaczonego czasu mierzono długość części naziemnej rośliny, czyli hypokotyl rośliny. Na podstawie uzyskanych rezultatów wykreślano zależność długości hypokotyli od stężenia związku i wyznaczano stężenie powodujące 50 % zahamowanie wzrostu hypokotyli. Doświadczenie powtarzano pięciokrotnie.

Badanie aktywności mieszaniny dwóch związków wykonywano jak wyżej. Stężenia związków w mieszaninie dobierano odpowiednio do wcześniej wyznaczonych wartości EC_{50} dla każdego związku. Były one mniejsze i większe od 1 TU i wynosiły: 0,5; 0,75; 1,5 i 2,0

TU. Na podstawie otrzymanych wyników określano stężenia wyrażone w jednostkach toksyczności mieszaniny powodującej efekt 50 % zahamowania wydłużenia hypokotyła. Jeśli efekt ten obserwowano dla stężenia równego 1 TU wtedy działanie dwóch związków traktowano jako addytywne, stężenie mieszaniny mniejsze od 1 TU oznacza synergizm, a stężenie większe od 1 TU świadczy o antagonizmie w oddziaływaniu mieszanin z roślinami. Badania te zostały wykonane w Katedrze Żywienia Roślin AR we Wrocławiu.

IV.2.5. Badanie wydajności kiełkowania nasion

Aktywność biologiczną związków określano też na podstawie ich wpływu na stopień zahamowania kiełkowania nasion gorczycy.

W badaniach wykorzystano wyselekcjonowane nasiona gorczycy białej, o zdolności kiełkowania 97 – 100 %. Badane aminofosfoniany i ich mieszaniny z aktywnymi składnikami herbicydów przygotowywano w stężeniach indukujących 50 % hemolizę erytrocytów. Do badań użyto szalki Petriego wyłożone sączkami z bibuły, na które zostały wylane po 4 ml roztworu związku i jego mieszaniny. Do każdej z szalek wsypywano po 100 sztuk nasion gorczycy. Próba kontrolna zawierała nasiona w wodzie destylowanej. Każda próbka była czterokrotnie powielona. Szalki umieszczano w termostacie bez dostępu światła w temperaturze 25 °C na 24 godziny, czas liczono od momentu umieszczenia nasion w roztworze. Po zakończeniu inkubacji, szalki z termostatu przenoszono do lodówki na 30 minut, aby zahamować proces dalszego kiełkowania. Następnie liczono nasiona wykiełkowane [Norma branżowa, 1983]. Badania te zostały wykonane w Katedrze Ogólnej Uprawy Roli i Roślin AR we Wrocławiu.

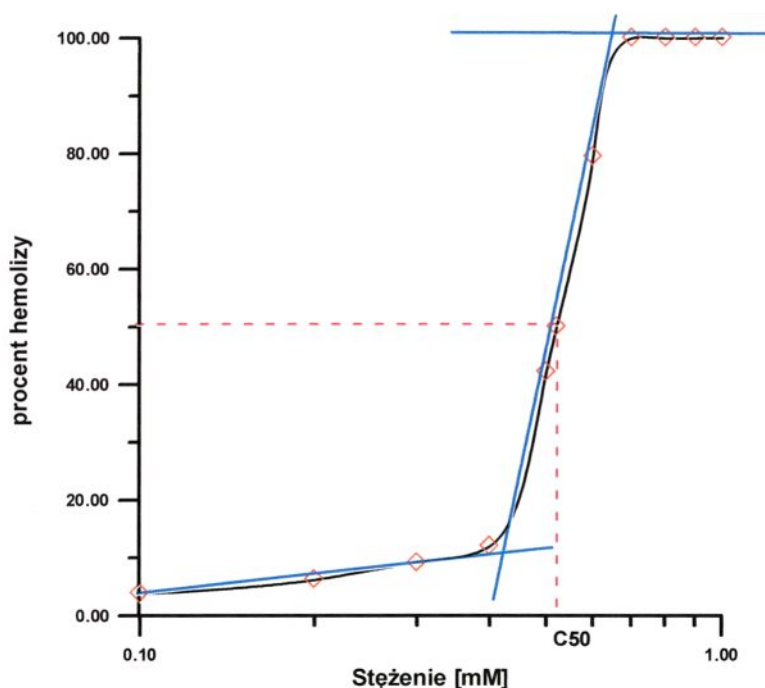
V. Wyniki badań

Wyniki badań przedstawione w pracy zostały opracowane przy użyciu programu Excel z zastosowaniem testu t-Studenta dla 5 pomiarów (n) przy poziomie ufności $p=0,95$.

V.1. Toksyczność hemolityczna związków i ich mieszanin

V.1.1. Toksyczność hemolityczna badanych związków

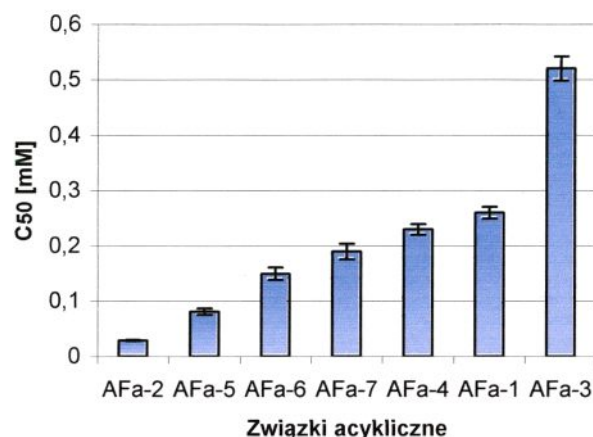
W prezentowanych w tej pracy badaniach za miarę toksyczności hemolitycznej związków przyjęto takie ich stężenia, które powodują hemolizę 50 % erytrocytów (C_{50}), takie kryterium przyjmują inni autorzy dla porównywania aktywności związków biologicznie aktywnych [Sato i inni, 1997]. Na rysunku 5.1. przedstawiono przykładową krzywą hemolityczną z zaznaczonym stężeniem C_{50} .



Rys. 5.1. Przykładowa krzywa hemolityczna dla związku AFa-3 z zaznaczoną wartością C_{50} .

Na rysunku 5.2 przedstawiono w postaci wykresów słupkowych stężenia związków AFa-n, dla $n=1-7$ odpowiedzialne za hemolizę 50 % erytrocytów przy 2 % wartości hematokrytu. Najbardziej toksyczny, jak widać z rysunku, jest związek AFa-2, który indukuje

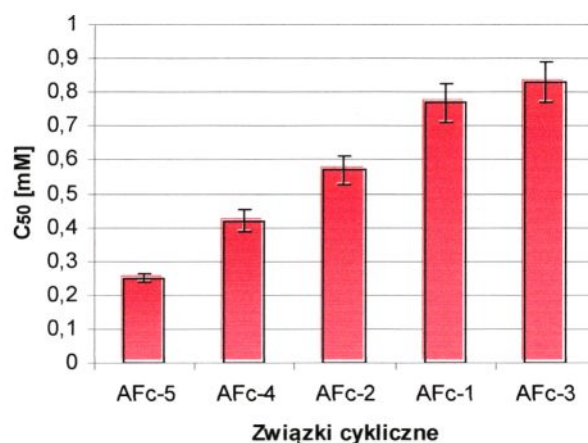
50 % hemolizę przy najniższym stężeniu, w porównaniu ze stężeniami pozostałych związków acyklicznych. Relację między toksycznościami hemolitycznymi tych substancji można zapisać w postaci: AFa-3>AFa-1>AFa-4>AFa-7>AFa-6>AFa-5>AFa-2. Toksyczność hemolityczna tych związków, jak wskazują badania, zmienia się w zależności od rodzaju grup funkcyjnych przy atomach fosforu, azotu i węgla w cząsteczce.



Rys. 5.2. Stężenia związków acyklicznych AFa-n, gdzie n=1, 2, 3, 4, 5, 6 i 7, indukujące 50 % hemolizę erytrocytów w temperaturze 37 °C, przy 2 % hematokrycie, w roztworze fizjologicznym 0,9 % NaCl. Średnie odchylenie procentowe wynosiło 8,06 %.

Podobną zależność dla związków AFc-n, n=1-5, pokazano na rysunku 5.3. Toksyczność związków cyklicznych, podobnie jak acyklicznych, zależy od rodzaju grup funkcyjnych. Toksyczność hemolityczną tych związków można ująć następująco:

AFc-3 > AFc-1 > AFc-2 > AFc-4 > AFc-5.



Rys. 5.3. Stężenia związków cyklicznych AFc-n, gdzie n=1-5, indukujące 50 % hemolizę erytrocytów w temperaturze 37 °C, przy 2 % hematokrycie, w roztworze fizjologicznym 0,9 % NaCl. Średnie odchylenie procentowe wynosiło 8,06 %.

Kolejnymi związkami, dla których zbadano toksyczność hemolityczną, były związki pochodne fluorenu, będące pochodnymi kwasu fluorenofosfonowego. Posiadają one jednakowy, czterowęglowy łańcuch alkilowy przy atomie azotu, różnią się natomiast długościami łańcuchów alkilowych przyłączonych do atomu fosforu. W tabeli 5.1 zestawiono stężenia tych związków odpowiedzialne za hemolizę 50 % krwinek czerwonych. W tabeli tej podano również wartości stężenia C_{50} dla bioaktywnych składników herbicydów (2,4-D i FMG), które były wykorzystane w badaniach aktywności biologicznej mieszanin. Toksyczności związków AFm-2 i AFm-3 o dłuższych łańcuchach alkilowych są podobne, podczas gdy związek AFm-1, posiadający najmniejszy łańcuch, wykazuje wyraźnie mniejszą toksyczność hemolityczną (znacznie większe stężenie C_{50}).

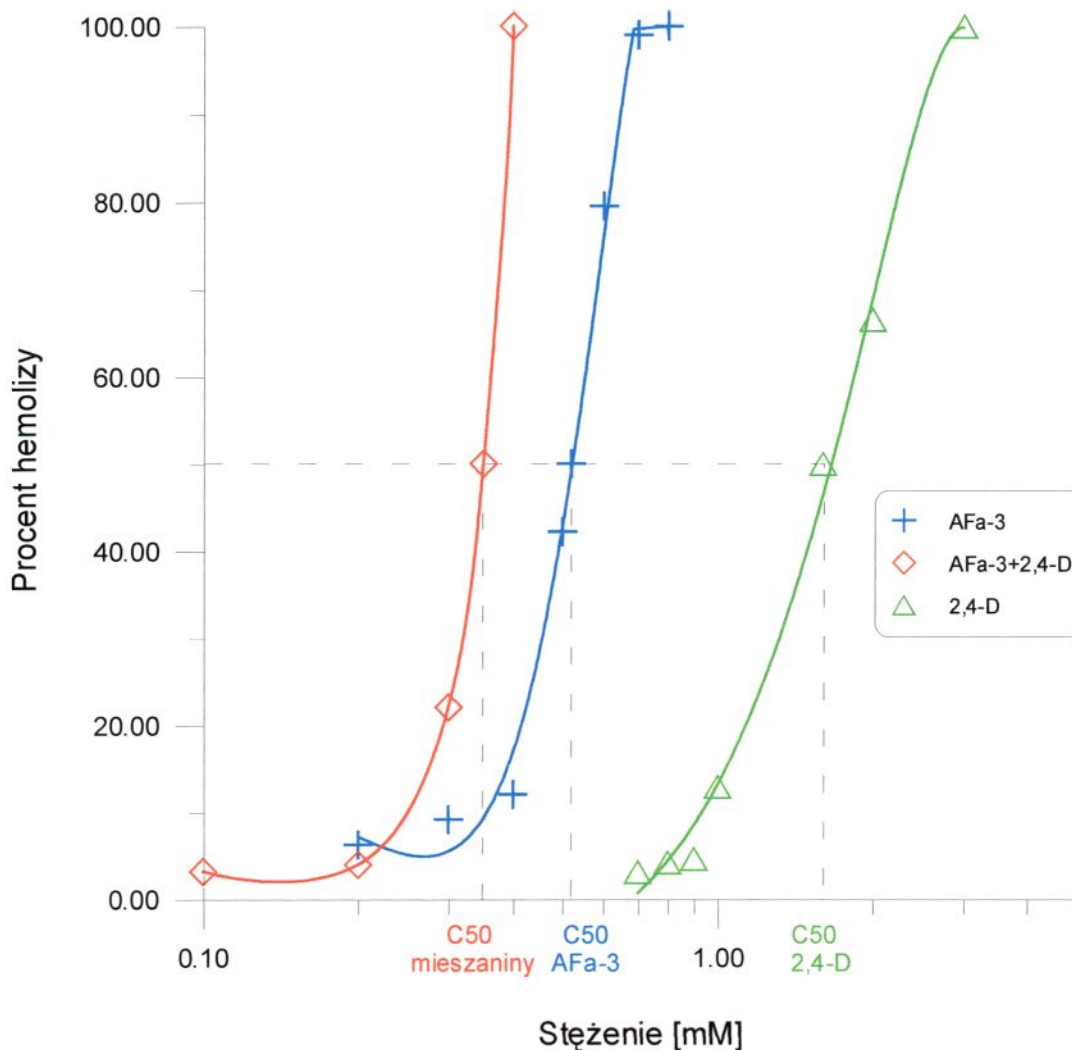
Tab. 5.1 Stężenia związków pochodnych fluorenuowych, FMG i 2,4-D, indukujące 50 % hemolizę erytrocytów w temperaturze 37 °C, przy 2 % hematokrycie, w roztworze fizjologicznym 0,9 % NaCl. Średnie odchylenie procentowe wynosiło 8,06 %.

związek	AFm-1	AFm-2	AFm-3	FMG	2,4-D
C_{50} [mM]	0,36±0,0295*	0,09±0,0074*	0,16±0,0131*	2,50±0,1311*	1,60±0,2049*

* $p=0,95$ dla 5 pomiarów

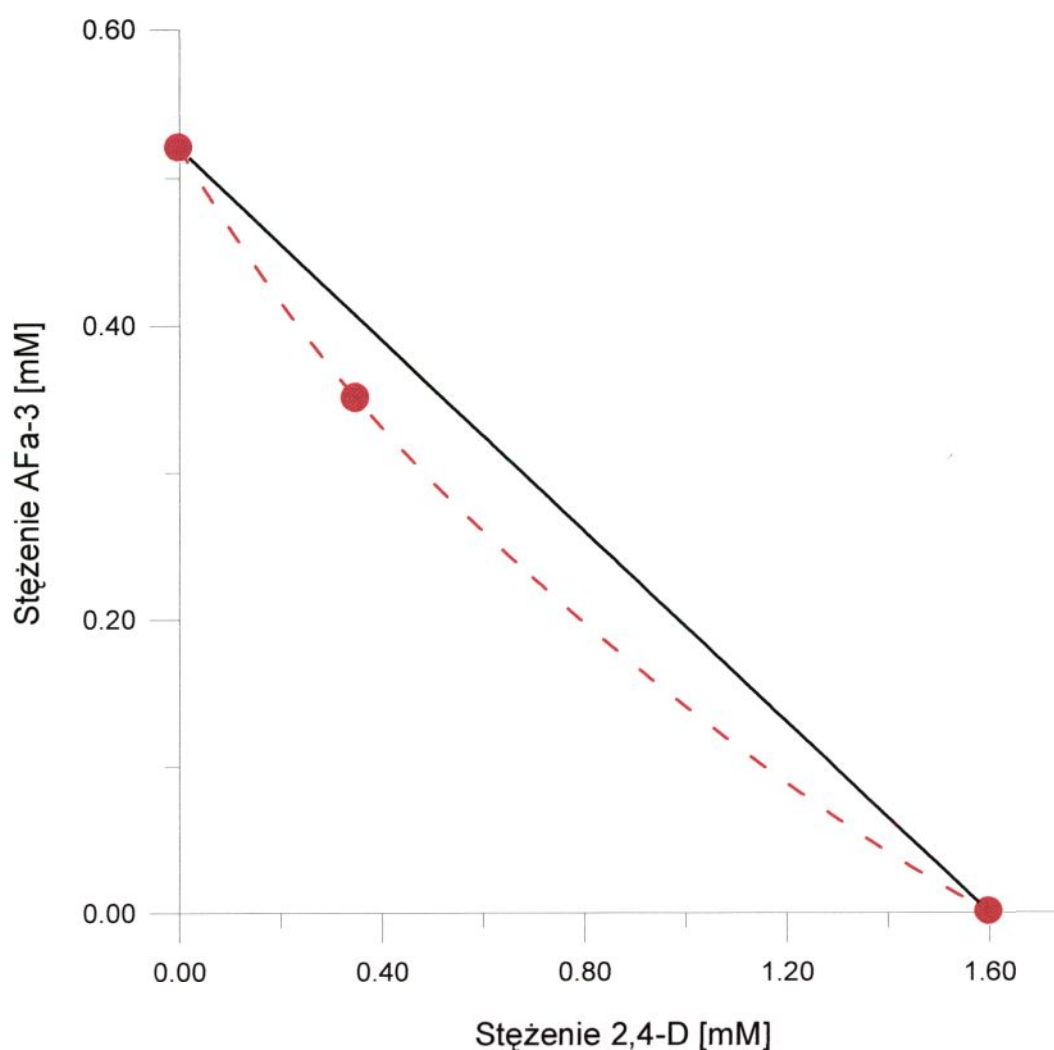
V.1.2. Toksyczność hemolityczna mieszanin równomolarnych badanych związków z 2,4-D i FMG.

Zbadano aktywność hemolityczną poszczególnych związków organicznych fosforu w mieszaninach dwuskładnikowych z 2,4-D lub FMG. Na podstawie otrzymanych doświadczalnie krzywych hemolitycznych dla wybranego aminofosfonianu, herbicydu i dla mieszaniny utworzonej z tych związków, wyznaczono wartości stężeń C_{50} , odpowiedzialnych za 50 % hemolizę krwinek (rys.5.4.).



Rys. 5.4. Krzywe hemolityczne dla mieszaniny związków AFa-3 i 2,4-D z wyznaczonymi wartościami C_{50} , powodującymi hemolizę 50 % erytrocytów dla pojedynczych związków oraz w mieszaninie, przy 2 % hematokrycie, w 0,9 % buforze NaCl i w temperaturze 37 °C.

Badaną mieszaninę tworzyły dwa związki zmieszane w tych samych stężeniach molarnych. Przy danym stężeniu mieszaniny, określano również stężenia pojedynczych związków w mieszaninie odpowiedzialnych za dany efekt. Do określenia aktywności hemolitycznej mieszaniny oraz efektu oddziaływania mieszaniny z błoną erytrocytu posłużono się graficzną metodą izobolową, jak opisano w rozdziale IV.2.1.2.



Rys. 5.5. Izobola dla efektu 50 % hemolizy mieszaniny związków AFa-3 z 2,4-D.

Analogicznie w kolejnych doświadczeniach hemolitycznych określano toksyczność hemolityczną poszczególnych związków i ich mieszanin ze związkami 2,4-D i FMG oraz efekty współdziałania tych związków w mieszaninach. Otrzymane wyniki przedstawiono w tabelach; w tabeli 5.2. dla mieszanin badanych związków z 2,4-D a w tabeli 5.3. dla mieszanin badanych związków z FMG. Uzyskano 3 możliwe rodzaje efektów współdziałania związków w mieszaninach: antagonistyczny, addytywny i synergiczny. Efekt synergiczny, z punktu widzenia niniejszych badań, zasługuje na szczególną uwagę, ponieważ świadczy o wzroście aktywności mieszaniny w porównaniu z aktywnościami poszczególnych jej składników.

Tab. 5.2 Stężenia C_{50} badanych związków i ich równomolarnych mieszanin z 2,4-D indukujące 50 % hemolizę erytrocytów oraz efekty oddziaływania mieszanin z błonami erytrocytów. Średnie odchylenie procentowe wynosi 7,45 %.

Związek	C_{50} [mM]	C_{50} [mM] mieszaniny związku z 2,4-D	Efekt
AFa-1	0,260±0,0094*	0,710±0,0620*	antagonizm
AFa-2	0,029±0,0011*	0,065±0,0057*	antagonizm
AFa-3	0,520±0,0189*	0,350±0,0306*	synergizm
AFa-4	0,230±0,0083*	0,330±0,0288*	antagonizm
AFa-5	0,081±0,0053*	0,095±0,0053*	antagonizm
AFa-6	0,150±0,0097*	0,080±0,0045*	synergizm
AFa-7	0,190±0,0123*	0,190±0,0106*	antagonizm
AFc-1	0,770±0,0499*	0,040±0,0022*	synergizm
AFc-2	0,570±0,0369*	0,400±0,0224*	addytywność
AFc-3	0,830±0,0538*	0,300±0,0168*	synergizm
AFc-4	0,420±0,0272*	0,100±0,0056*	synergizm
AFc-5	0,250±0,0111*	0,325±0,0330*	antagonizm
AFm-1	0,360±0,0295*	0,380±0,0386*	addytywność
AFm-2	0,090±0,0074*	0,330±0,0335*	antagonizm
AFm-3	0,160±0,0131*	0,230±0,0234*	antagonizm
2,4-D	1,600±0,1311*		

*p=0,95 dla 5 powtórzeń

Tab. 5.3 Stężenia C_{50} badanych związków i ich równomolarnych mieszanin z FMG indukujące 50 % hemolizę erytrocytów oraz efekty oddziaływania mieszanin z błonami erytrocytów. Średnie odchylenie procentowe wynosi 7,45 %.

Związek	C_{50} [mM]	C_{50} [mM] mieszaniny związku z FMG	Efekt
AFa-1	0,260±0,0094*	0,48±0,0449*	addytywność
AFa-2	0,029±0,0011*	0,04±0,0037*	antagonizm
AFa-3	0,520±0,0189*	0,35±0,0327*	synergizm
AFa-4	0,230±0,0083*	0,25±0,0234*	antagonizm
AFa-5	0,081±0,0053*	**	antagonizm
AFa-6	0,150±0,0097*	0,07±0,0068*	synergizm
AFa-7	0,190±0,0123*	0,19±0,0183*	addytywność
AFc-1	0,770±0,0499*	0,43±0,0415*	synergizm
AFc-2	0,570±0,0369*	**	antagonizm
AFc-3	0,830±0,0538*	0,30±0,0290*	synergizm
AFc-4	0,420±0,0272*	0,08±0,0077*	synergizm
AFc-5	0,250±0,0111*	0,35±0,0294*	antagonizm
AFm-1	0,360±0,0295*	0,43±0,0362*	antagonizm
AFm-2	0,090±0,0074*	0,25±0,0210*	antagonizm
AFm-3	0,160±0,0131*	0,45±0,0378*	antagonizm
FMG	2,500±0,2049*		

* $p=0,95$ dla 5 powtórzeń

** C_{50} nie wyznaczono ze względu na małą aktywność mieszaniny i brak hemolizy

V.1.3. Toksyczność hemolityczna mieszanin nierównomolarnych badanych związków z 2,4-D i FMG.

Toksyczność hemolityczną mieszanin badanych związków organicznych fosforu z 2,4-D lub FMG określano stosując mieszaniny nierównomolarne. Przy interpretacji wyników skorzystano z metody oznaczania efektów współdziałania związków w mieszaninie zastosowanej przez autorów [Pape-Lindstrom i inni, 1997]. W tabelach poniżej zostały zestawione aktywności mieszanin w odniesieniu do błony erytrocytów i uzyskane efekty współdziałania związków w mieszaninach. Podobnie jak w przypadku mieszanin równomolarnych, uzyskano 3 rodzaje efektów współdziałania związków w mieszaninach: antagonistyczny, addytywny i synergiczny.

Tab. 5.4. Stężenia C_{50} badanych związków i ich nierównomolarnych mieszanin z 2,4-D oraz efekty oddziaływania mieszanin z błonami erytrocytów. Średnie odchylenie procentowe wynosiło 9,5 %.

Związek	C_{50} [mM]	Stężenie mieszaniny związku z 2,4-D[TU]	Efekt
AFa-1	0,260±0,0094*	1,40±0,30*	antagonizm
AFa-2	0,029±0,0011*	0,81±0,17*	synergizm
AFa-3	0,520±0,0189*	1,01±0,21*	addytywność
AFa-4	0,230±0,0083*	1,24±0,27*	antagonizm
AFa-5	0,081±0,0053*	1,14±0,25*	antagonizm
AFa-6	0,150±0,0097*	0,82±0,18*	synergizm
AFa-7	0,190±0,0123*	1,36±0,29*	antagonizm
AFc-1	0,770±0,0499*	0,83±0,18*	synergizm
AFc-2	0,570±0,0369*	>>2,0	antagonizm
AFc-3	0,830±0,0538*	1,17±0,25*	antagonizm
AFc-4	0,420±0,0272*	0,52±0,11*	synergizm
AFc-5	0,250±0,0111*	>>2,0	antagonizm
AFm-1	0,360±0,0295*	1,60±0,34*	antagonizm
AFm-2	0,090±0,0074*	1,11±0,24*	addytywność
AFm-3	0,160±0,0131*	0,94±0,20*	addytywność
2,4-D	1,600±0,172*		

*p=0,95 dla 5 powtórzeń

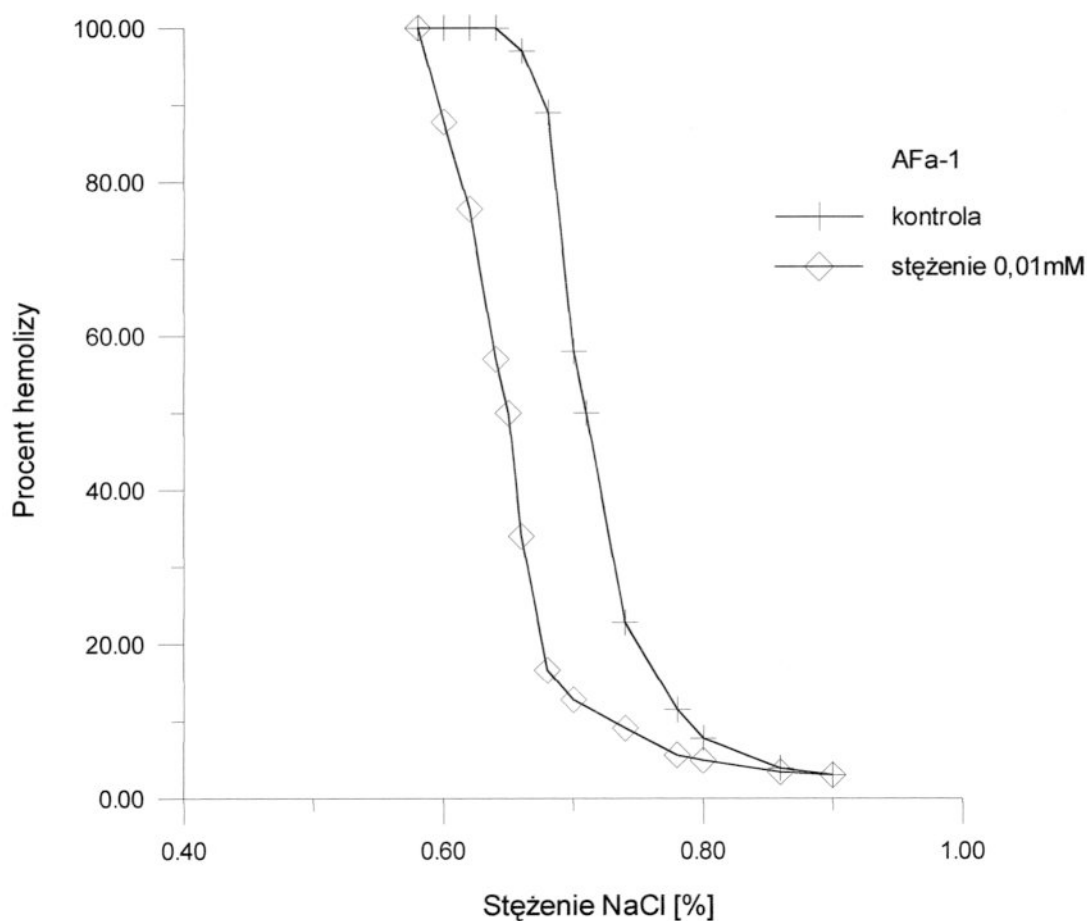
Tab. 5.5. Stężenia C_{50} badanych związków i ich nierównomolarnych mieszanin z FMG oraz efekty oddziaływania mieszanin z błonami erytrocytów. Średnie odchylenie procentowe wynosiło 9,5 %.

Związek	C_{50} [mM]	Stężenie mieszaniny związku z FMG [TU]	Efekt
AFa-1	0,260±0,0094*	1,478±0,318*	antagonizm
AFa-2	0,029±0,0011*	1,331±0,288*	antagonizm
AFa-3	0,520±0,0189*	1,250±0,269*	antagonizm
AFa-4	0,230±0,0083*	1,242±0,267*	antagonizm
AFa-5	0,081±0,0053*	1,486±0,319*	antagonizm
AFa-6	0,150±0,0097*	0,500±0,108*	synergizm
AFa-7	0,190±0,0123*	1,538±0,331*	antagonizm
AFc-1	0,770±0,0499*	0,909±0,196*	addytywność
AFc-2	0,570±0,0369*	1,550±0,333*	antagonizm
AFc-3	0,830±0,0538*	0,769±0,165*	synergizm
AFc-4	0,420±0,0272*	0,220±0,047*	synergizm
AFc-5	0,250±0,0111*	>>2,0	antagonizm
AFm-1	0,360±0,0295*	1,068±0,231*	addytywność
AFm-2	0,090±0,0074*	1,500±0,323*	antagonizm
AFm-3	0,160±0,0131*	1,530±0,329*	antagonizm
FMG	1,600±0,269*		

*p=0,95 dla 5 powtórzeń

V.2. Oporność osmotyczna erytrocytów

Przeprowadzono również badania oporności osmotycznej krwinek poddanych działaniu badanych związków w stężeniu niehemolitycznym, wynoszącym 0,01 mM. Przykładową krzywą oporności osmotycznej krwinek modyfikowanych związkiem AFa-1, przedstawiono na rysunku 5.6. Z rysunku tego można odczytać oporność osmotyczną erytrocytów, której miarą jest stężenie soli fizjologicznej, które powoduje hemolizę 50 % krwinek, zmodyfikowanych użytymi w pracy związkami. Wartości tych stężeń zamieszczono w tabeli 5.6. Otrzymane wyniki wskazują, że związki cykliczne zmieniają oporność osmotyczną erytrocytów, związki acykliczne w mniejszym stopniu, zaś pochodne fluoranu praktycznie tych zmian nie powodują.



Rys. 5.6. Zależność między procentem hemolizy krwinek modyfikowanych związkiem AFa-1 (0,01 mM), a stężeniem procentowym NaCl w roztworze.

Tab. 5.6. a, b, c Stężenia NaCl wywołujące 50 % hemolizę erytrocytów. Średnie odchylenie procentowe wynosiło 5,1%.

Tab. 5.6.a

Związek	AFa-1	AFa-2	AFa-3	AFa-4	AFa-5	AFa-6	AFa-7	Kontrola
C _{NaCl} [%]	65,0	85,0	70,0	70,0	80,0	64,0	83,0	66,5

Tab. 5.6.b

Związek	AFc-1	AFc-2	AFc-3	AFc-4	AFc-5	Kontrola
C _{NaCl} [%]	65,0	59,0	88,0	86,0	59,5	66,5

Tab. 5.6.c

Związek	AFm-1	AFm-2	AFm-3	2,4-D	FMG	Kontrola
C _{NaCl} [%]	59,0	59,0	58,0	61,5	60,0	66,5

V.3. Wpływ badanych związków na płynność błony erytrocytów

Badania fluorymetryczne przy użyciu sond fluorescencyjnych: DPH, TMA-DPH, TMAP-DPH i Laurdan, pozwoliły obliczyć wartość polaryzacji i anizotropii fluorescencji oraz uogólnioną polaryzację GP w błonie erytrocytów modyfikowanej badanymi związkami.

Dla sondy niespecyficznej DPH dyfundującej do różnych rejonów części hydrofobowej błony wszystkie związki powodują spadek polaryzacji fluorescencji.

Tab. 5.7. a, b, c Polaryzacja fluorescencji (P) dla sondy DPH w błonie erytrocytów modyfikowanej badanymi związkami w temperaturze pokojowej (25 °C). Średni błąd procentowy wyniósł 5,3 %.

Tab. 5.7.a

Polaryzacja (P)								
związek	AFa-1	AFa-2	AFa-3	AFa-4	AFa-5	AFa-6	AFa-7	Kontrola
stężenie 5 [μM]	0,317	0,264	0,309	0,313	0,225	0,171	0,242	0,325
stężenie 10 [μM]	0,319	0,246	0,296	0,293	0,208	0,182	0,162	

Tab.5.7.b

Polaryzacja (P)						
związek	AFc-1	AFc-2	AFc-3	AFc-4	AFc-5	Kontrola
stężenie 5 [μ M]	0,337	0,307	0,222	0,277	0,324	0,325
stężenie 10 [μ M]	0,258	0,299	0,148	0,147	0,328	

Tab.5.7.c

Polaryzacja (P)						
związek	AFm-1	AFm-2	AFm-3	2,4-D	FMG	Kontrola
stężenie 5 [μ M]	0,265	0,259	0,213	0,293	0,332	0,325
stężenie 10 [μ M]	0,241	0,274	0,220	0,303	0,273	

Dla sondy TMA-DPH, której emitowana fluorescencja pochodzi z rejonu pierwszych węgli łańcuchów węglowodorowych lipidów, otrzymane wyniki wskazują, że badane związki w różnym stopniu wpływają na płynność błony. Jak pokazuje tabela 5.8. związki AFa-n, AFm-n i kwas 2,4-D powodują wzrost sztywności błony, zaś związki AFc-n i kwas FMG powodują wzrost płynności błony. Rysunek 5.7 pokazuje wartości anizotropii dla 2 stężeń 5 i 10 μ M wybranych związków z badanych grup. Różny wpływ związków na błonę erytrocytów w rejonie pierwszych atomów węgla łańcuchów alkilowych prawdopodobnie świadczy o różnej głębokości, na jaką mogą wbudowywać się związki zróżnicowane strukturalnie.

Tab. 5.8. a, b, c Anizotropia fluorescencji sondy TMA-DPH dla badanych związków w temperaturze 25 °C. Średni błąd procentowy wyniósł 7,4 %.

Tab.5.8.a

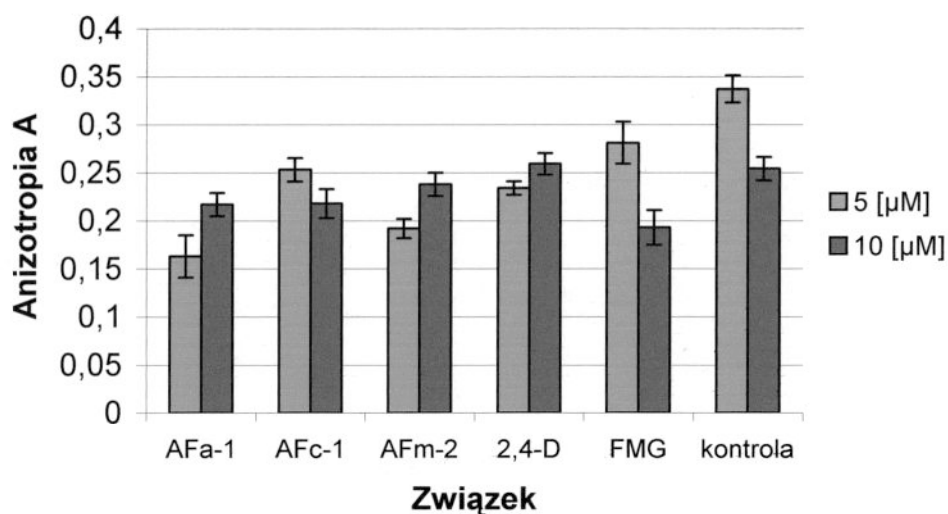
Anizotropia (A)								
związek	AFa-1	AFa-2	AFa-3	AFa-4	AFa-5	AFa-6	AFa-7	Kontrola
stężenie 5 [μ M]	0,163	0,201	0,260	0,245	0,196	0,241	0,192	0,254
stężenie 10 [μ M]	0,217	0,269	0,277	0,190	0,209	0,257	0,208	

Tab. 5.8.b

Anizotropia (A)						
związek	AFc-1	AFc-2	AFc-3	AFc-4	AFc-5	Kontrola
stężenie 5 [μM]	0,253	0,172	0,250	0,255	0,237	0,254
stężenie 10 [μM]	0,218	0,093	0,240	0,237	0,169	

Tab. 5.8.c

Anizotropia (A)						
związek	AFm-1	AFm-2	AFm-3	2,4-D	FMG	Kontrola
stężenie 5 [μM]	0,243	0,192	0,107	0,234	0,281	0,254
stężenie 10 [μM]	0,256	0,238	0,218	0,259	0,193	



Rys. 5.7. Anizotropia fluorescencji (A) dla błon modyfikowanych wybranymi związkami z poszczególnych grup w stężeniach 5 i 10 μM dla sondy TMA-DPH.

Przy użyciu sondy polarnej TMAP-DPH, której grupa aktywna fluorescencyjnie zlokalizowana jest nieco głębiej niż dla sondy TMA-DPH, otrzymane wyniki wykazały, że związki acykliczne AFa-n, cykliczne AFc-n oraz FMG powodują wzrost płynności błony.

Związki pochodne fluorenu i 2,4-D powodują natomiast wzrost polaryzacji fluorescencji, co oznacza, że rośnie sztywność błony.

Tab. 5.9. a, b, c Polaryzacja fluorescencji (P) sondy TMAP-DPH w błonie erytrocytów modyfikowanych badanymi związkami w temperaturze 25 °C. Średni błąd procentowy wyniósł 4,9 %.

Tab.5.9.a

Polaryzacja (P)								
związek	AFa-1	AFa-2	AFa-3	AFa-4	AFa-5	AFa-6	AFa-7	Kontrola
stężenie 5 [μM]	0,351	0,347	0,345	0,344	0,243	0,345	0,212	0,337
stężenie 10 [μM]	0,318	0,345	0,335	0,344	0,308	0,313	0,307	

Tab.5.9.b

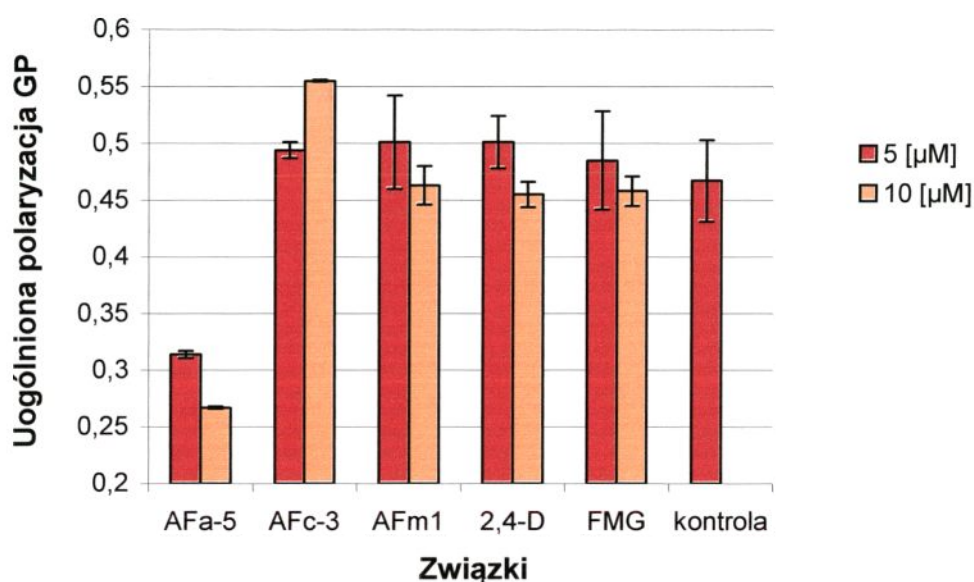
Polaryzacja (P)						
związek	AFc-1	AFc-2	AFc-3	AFc-4	AFc-5	Kontrola
stężenie 5 [μM]	0,271	0,315	0,241	0,279	0,362	0,337
stężenie 10 [μM]	0,231	0,28	0,127	0,217	0,315	

Tab.5.9.c

Polaryzacja (P)						
związek	AFm-1	AFm-2	AFm-3	2,4-D	FMG	Kontrola
stężenie 5 [μM]	0,344	0,277	0,373	0,336	0,423	0,337
stężenie 10 [μM]	0,374	0,357	0,32	0,41	0,328	

W badaniach płynności błony erytrocytów użyto również sondę Laurdan, której fluorescencja pochodzi z części hydrofilowej błony. Obliczone dla tej sondy wartości uogólnionej polaryzacji (GP) wskazują, że niektóre związki powodują wzrost płynności błony, a inne wzrost jej sztywności. Na rysunku 5.8. przedstawiono uogólnioną polaryzację GP dla wybranych związków. Jak wskazują wyniki związki acykliczne powodują wyraźny

wzrost płynności błony. Pochodne fluoranu, 2,4-D i FMG oraz związki cykliczne powodują jej usztywnienie przy stężeniu 5 μM . W tabeli 5.10. zestawiono wartości uogólnionej polaryzacji GP, dla badanych związków.



Rys. 5.8. Uogólniona polaryzacja (GP) sondy Laurdan dla błon modyfikowanych wybranymi związkami z poszczególnych grup użytych w stężeniach 5 i 10 μM w temperaturze pokojowej (25 °C).

Tab. 5.10. a, b, c Uogólniona polaryzacji (GP) sondy Laurdan dla błon erytrocytów modyfikowanych badanymi związkami w temperaturze 25 °C. Średni błąd procentowy wyniósł 4,9 %.

Tab.5.10.a

Uogólniona Polaryzacja (GP)								
związek	AFa-1	AFa-2	AFa-3	AFa-4	AFa-5	AFa-6	AFa-7	Kontrola
stężenie 5 μM	0,444	0,451	0,418	0,420	0,314	0,525	0,508	0,467
stężenie 10 μM	0,425	0,428	0,418	0,396	0,267	0,501	0,497	

Tab.5.10.b

Uogólniona Polaryzacja (GP)						
związek	AFc-1	AFc-2	AFc-3	AFc-4	AFc-5	Kontrola
stężenie 5 [μ M]	0,473	0,489	0,494	0,493	0,510	0,467
stężenie 10 [μ M]	0,494	0,546	0,555	0,489	0,506	

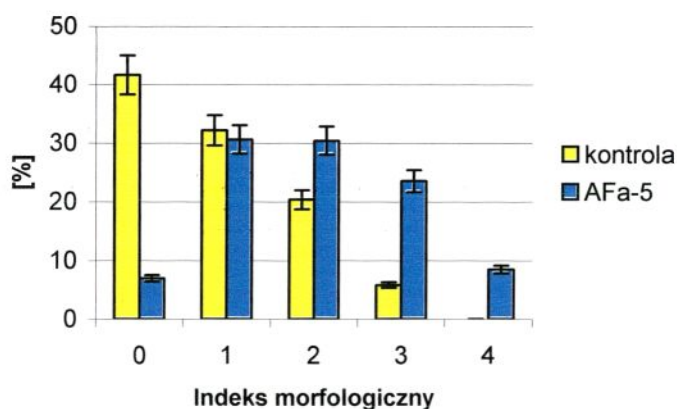
Tab.5.10.c

Uogólniona Polaryzacja (GP)						
związek	AFm-1	AFm-2	AFm-3	2,4-D	FMG	Kontrola
stężenie 5 [μ M]	0,501	0,539	0,520	0,501	0,485	0,467
stężenie 10 [μ M]	0,463	0,533	0,512	0,455	0,458	

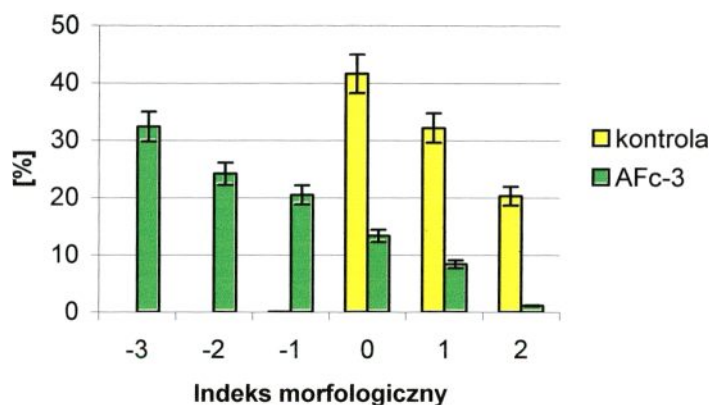
V.4. Wpływ badanych związków na kształt erytrocytów

W wyniku oddziaływania użytych w pracy związków z erytrocytami, komórki zmieniały swój kształt. Kształt erytrocytów określono za pomocą klasyfikacji Bessissa i Brechera. Na rysunku 5.9 zostały przedstawione dwa przykładowe wykresy, które pokazują, dla danej populacji zmodyfikowanych erytrocytów, procentowy udział komórek różnych kształtów o odpowiednich indeksach morfologicznych. Wykresy sporządzono dla 2 związków AFa-5 (acykliczny) rys.5.9. A) i AFc-3 (cykliczny) rys.5.9. B), dla których wyraźnie dominujące były odpowiednio kształty echinocytarne i stomatocytarne.

A)



B)



Rys. 5.9. Procentowy rozkład kształtów erytrocytów modyfikowanych związkami AFa-5 (A) i AFc-3 (B) o stężeniu 100 μM , w temperaturze 37 $^{\circ}\text{C}$ i ich indeksy morfologiczne. Średni błąd procentowy wynosił 8 %.

Otrzymane z obserwacji mikroskopowych wyniki (tabela 5.11) wykazują, że przy stężeniu nielitycznym (dla związku AFa-2 i AFa-4 0,01 mM, a dla pozostałych związków 0,1 mM) związki acykliczne tworzą w większości formy echinocytarne, co świadczy o tym, że wbudowują się one głównie do zewnętrznej warstwy lipidowej błony erytrocytów. Wśród tych związków wyjątek stanowi związek AFa-6, dla którego dominują formy stomatocytarne. Spośród związków cyklicznych, związki: AFc-1, AFc-2, AFc-5 tworzą formy echinocytarne, natomiast związki AFc-3 i AFc-4 formy stomatocytarne. Te ostatnie w odróżnieniu od pozostałych związków cyklicznych mają najdłuższe łańcuchy hydrofobowe (ośmio- i czternastowęglowy) przy grupie aminowej, co prawdopodobnie może sprzyjać ich penetracji do wewnętrznej warstwy lipidowej. Związki pochodne fluorenu AFm-n tworzą różne formy – AFm-1 i AFm-3 indukują echinocyty, zaś AFm-2 – stomatocyty. Związki 2,4-D i FMG indukują formy echinocytarne.

Tab. 5.11. Procentowy udział erytrocytów dla poszczególnych wartości indeksów morfologicznych. Modyfikacja erytrocytów przebiegała w czasie 1 godziny i w temperaturze 37 °C w stężeniu 0,1 mM (dla związków AFa-2 i AFa-5 0,01 mM) Średni błąd procentowy 8 %.

Związek	Indeks morfologiczny							
	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
	stomatocyty			normocyty	echinocyty			
AFa-1	0	0	0	0,25	35,93	21,10	35,18	7,54
AFa-2	0	0	0	20,18	22,52	13,51	27,75	16,04
AFa-3	0	0	0	19,76	23,79	31,65	19,96	4,84
AFa-4	0	0	0	4,12	15,49	47,84	31,76	0,79
AFa-5	0	0	0	6,92	30,63	30,43	23,52	8,5
AFa-6	19,47	65,21	14	0,22	0,44	0,66	0	0
AFa-7	0	0,80	0	5,66	18,79	44,24	21,82	8,69
AFc-1	0	0	9,06	26,06	30,13	25,51	9,24	0
AFc-2	0	0	0	6,1	7,07	41,95	32,2	12,68
AFc-3	32,42	24,18	20,51	13,37	8,42	1,1	0	0
AFc-4	21,27	29,41	37,78	11,54	0	0	0	0
AFc-5	0	1,32	0	19,52	30,48	16,23	21,70	10,75
AFm-1	0	0	0	13,55	26,45	29,62	21,08	9,03
AFm-2	17,38	41,77	23,11	7,95	5,18	0,92	2,77	0,92
AFm-3	1,81	2,95	8,39	2,72	31,07	32,88	14,74	5,44
FMG	0	0	0	15,7	53,16	11,14	20	0
2,4-D	0	0	0	0,43	21,04	35,36	32,1	0
Kontrola	0	0	0,03	41,63	32,2	20,34	5,8	0

V.5. Wpływ badanych związków i ich mieszanin na inhibicję wzrostu roślin wyższych.

Zbadano aktywność biologiczną aminofosfonianów i ich mieszanin z kwasem 2,4-D lub FMG w odniesieniu do ogórka i pszenicy. Aktywność poszczególnych związków i ich mieszanin określono na podstawie testu wzrostu wyżej wymienionych roślin. W badaniach tych wyznaczono stężenia związków EC_{50} odpowiedzialne za 50% inhibicję wzrostu roślin. Dane uzyskane z tych badań dla wybranych związków zebrano w tabelach 5.12. i 5.13.

Tab. 5.12. Wartości stężeń związków powodujące 50 % inhibicję wzrostu hypocotyła ogórka.

Związek	EC_{50} [mM]
2,4-D	$0,0048 \pm 0,00055^*$
AFa-1	$0,550 \pm 0,0275^*$
AFa-2	$1,440 \pm 0,0850^*$
AFa-3	$1,950 \pm 0,1100^*$
AFa-4	$1,060 \pm 0,0700^*$
AFa-5	$0,350 \pm 0,0250^*$
AFc-1	$0,825 \pm 0,0660^*$
AFc-2	$2,100 \pm 0,1300^*$
AFc-3	$1,650 \pm 0,1300^*$
AFc-4	$1,990 \pm 0,1400^*$
AFc-5	$0,270 \pm 0,0260^*$
AFm-1	$0,550 \pm 0,0470^*$
AFm-2	$0,340 \pm 0,0200^*$
AFm-3	$0,460 \pm 0,0300^*$

* $p=0,95$ przy 5 pomiarach

Tab. 5.13. Wartości stężeń związków powodujące 50 % inhibicji wzrostu hypocotyła pszenicy.

Związek	EC₅₀ [mM]
AFa-1	2,000 ± 0,1400*
AFa-2	2,100 ± 0,1575*
AFa-3	1,550 ± 0,0990*
AFa-4	1,750 ± 0,1400*
AFa-5	1,560 ± 0,1000*
AFc-1	1,950 ± 0,1400*
AFc-2	2,100 ± 0,1300*
AFc-3	2,300 ± 0,1400*
AFc-4	3,050 ± 0,2100*
AFm-2	0,700 ± 0,0420*
AFm-3	0,930 ± 0,0555*
FMG	0,480 ± 0,0340*

* p=0,95 przy 5 pomiarach

Przeprowadzono również test wzrostu ogórka w obecności mieszanin wybranych związków z 2,4-D, oraz test wzrostu pszenicy dla mieszanin wybranych związków z FMG, które w obydwu przypadkach dały 3 rodzaje efektów: antagonistyczny, addytywny i synergiczny. Wyniki te zebrano w tabeli 5.14 dla mieszanin wybranych związków z 2,4-D i w tabeli 5.15 z FMG.

Tab. 5.14. Aktywność mieszanin badanych związków z kwasem 2,4-D wyrażona w jednostkach toksyczności (TU) oraz efekty oddziaływania na wzrost hypokotyla ogórka.

Związek + 2,4-D	Stężenie mieszaniny [TU]	Efekt łączenia
AFa-1	0,71±0.048*	Synergizm
AFa-2	0,78±0.06*	Synergizm
AFa-3	0,90±0,06*	Addytywność
AFa-4	0,92±0,06*	Addytywność
AFa-5	0,95±0,08*	Addytywność
AFc-1	1,10±0,13*	Addytywność
AFc-2	2,30±0,14*	Antagonizm
AFc-3	1,60±0,13*	Antagonizm
AFc-4	0,98±0,08*	Addytywność
AFc-5	1,03±0,10*	Addytywność
AFm-1	1,17±0,15*	Addytywność
AFm-2	0,75±0,05*	Synergizm
AFm-3	0,81±0,06*	Synergizm

* p=0,95 przy 5 pomiarach

Tab. 5.15. Aktywność mieszanin badanych związków z FMG wyrażona w jednostkach toksyczności (TU) oraz efekt oddziaływania na wzrost hypokotyla pszenicy.

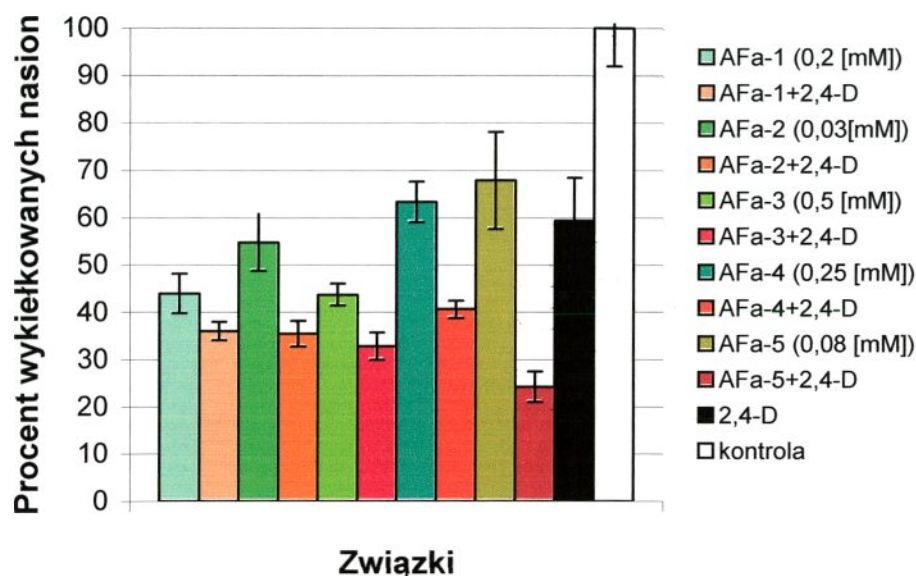
Związek+ FMG	Stężenie mieszaniny [TU]	Efekt łączenia
AFa-1	1,20 ±0,080*	Antagonizm
AFa-2	1,40± 0,105*	Antagonizm
AFa-3	1,70±0,110*	Antagonizm
AFa-4	1,50±0,120*	Antagonizm
AFa-5	1,15±0,060*	Addytywność
AFc-1	0,87±0,050*	Synergizm
AFc-2	2,30±0,140*	Antagonizm
AFc-3	1,60±0,110*	Antagonizm
AFc-4	2,20±0,200*	Antagonizm
AFm-2	0,95±0,060*	Addytywność
AFm-3	1,10±0,090*	Addytywność

* p=0,95 przy 3 pomiarach

V.6. Wpływ badanych związków i ich mieszanin na kiełkowanie roślin wyższych.

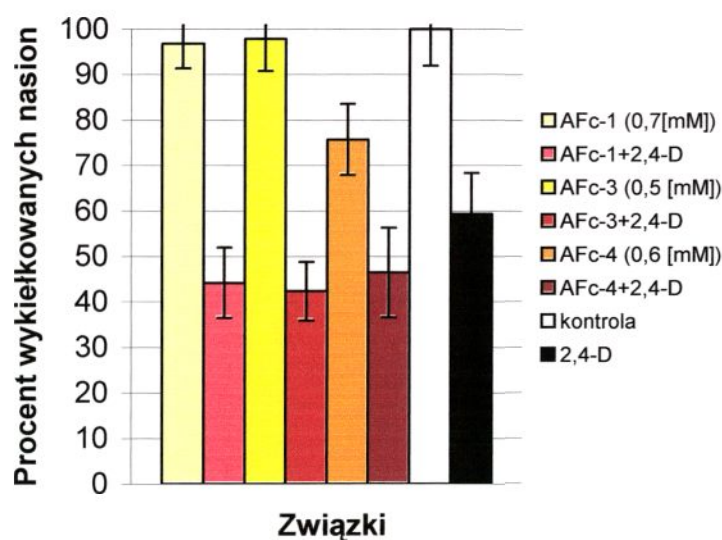
W celu określenia aktywności prezentowanych w pracy związków, jako potencjalnych herbicydów, oraz ich mieszanin z kwasem 2,4-D, zbadano ich wpływ na kiełkowanie nasion. Określono najpierw wpływ pojedynczych związków, w stężeniach analogicznych do stężeń powodujących 50 % hemolizę erytrocytów, na hamowanie kiełkowania nasion gorczycy. Dane uzyskane z tych badań dla pojedynczych związków i ich mieszanin z kwasem 2,4-D pokazują rysunki 5.10. i 5.11. Na rysunku 5.10. przedstawiono wyniki dla mieszanin związków acyklicznych z kwasem 2,4-D. Aktywność tych związków oraz ich mieszanin jest

zdecydowanie mniejsza niż w przypadku związków cyklicznych. Relację między tymi aktywnościami można zapisać następująco: AFa-4>AFa-1>AFa-2>AFa-3>AFa-5.



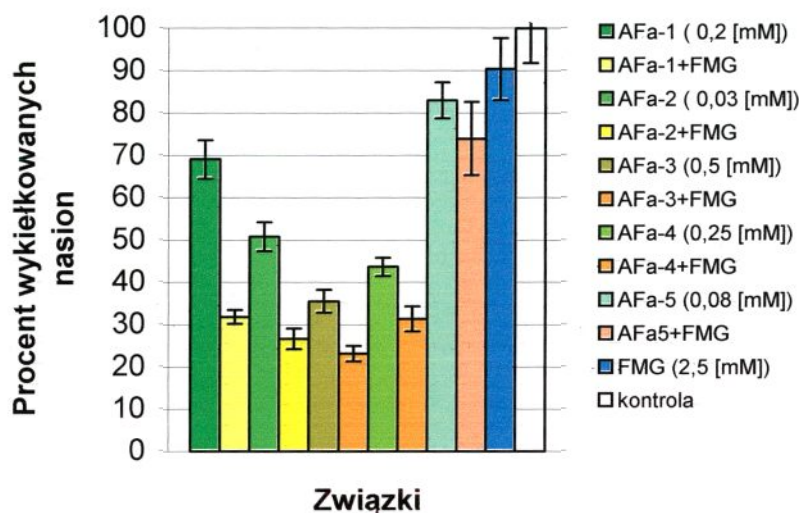
Rys. 5.10. Procent wykiełkowanych nasion gorczycy dla błon modyfikowanych związkami AFa-n, n=1-5. Poziom ufności dla 5 pomiarów wynosi 0,95.

Na rysunku 5.11. przedstawiono wyniki badań dla wybranych związków cyklicznych, dla których aktywności mieszanin są znacznie mniejsze niż pojedynczych związków, aktywność mieszanin zmienia się zgodnie z relacją: AFc-4 > AFc-1 > AFc-3.



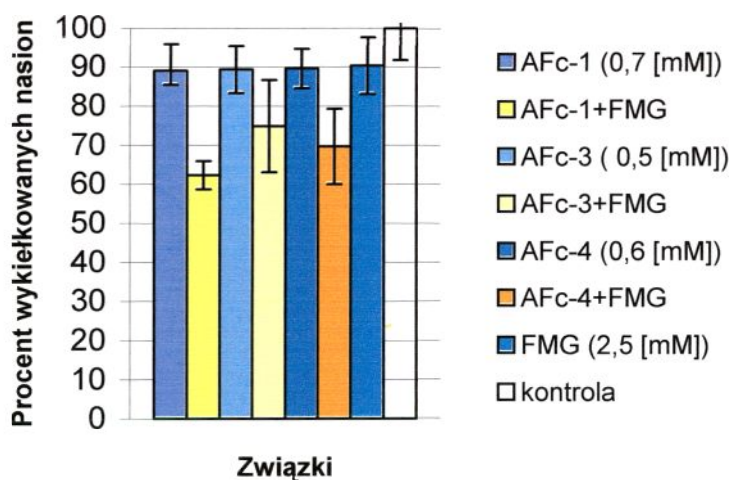
Rys. 5.11. Procent wykiełkowanych nasion gorczycy dla błon modyfikowanych związkami AFc-1, AFc-3 i AFc-4 i ich mieszanin z 2,4-D. Poziom ufności dla 5 pomiarów wynosi 0,95.

Wyniki badań wpływu wybranych związków i ich mieszanin z FMG na kiełkowanie nasion gorczycy pokazują rysunki 5.12. dla związków acyklicznych i 5.13. dla związków cyklicznych. Dla mieszanin związków acyklicznych z FMG aktywność tych związków oraz ich mieszanin jest zdecydowanie mniejsza niż związków cyklicznych i można ją zapisać zależnością: AFa-3>AFa-2>AFa-4>AFa-1>AFa-5.



Rys. 5.13. Procent wykiełkowanych nasion gorczycy dla błon modyfikowanych związkami AFa-n, n=1-5. Poziom ufności dla 5 pomiarów wynosi 0,95.

Mieszaniny związków cyklicznych z FMG wykazują mniejszy wpływ na kiełkowanie roślin niż mieszaniny związków z 2,4-D i można ją zapisać według następującej relacji: AFc-1> AFc-3>AFc-4.



Rys. 5.13. Procent wykiełkowanych nasion gorczycy dla błon modyfikowanych związkiem AFc-1, AFc-3 i AFc-4. Poziom ufności dla 5 pomiarów wynosi 0,95.

V.7. Zestawienie efektów uzyskanych z oddziaływania mieszanin związków z erytrocytami.

Aby ocenić aktywność mieszaniny badanych związków, należy wziąć pod uwagę efekty, jakie uzyskano w wyniku oddziaływania tych mieszanin z błonami erytrocytów. Najbardziej interesującym jest efekt synergizmu, który świadczy o większej aktywności mieszaniny w porównaniu z aktywnością pojedynczych związków. W tabeli 5.16. zostały zestawione badane związki i ich mieszaniny z uwzględnieniem ich aktywności hemolitycznej, od najbardziej do najmniej aktywnych, oraz uzyskane efekty oddziaływania mieszanin z błonami erytrocytów lub roślin wyższych.

Tab. 5.16. Zestawienie uzyskanych wyników badań, wykonanych na erytrocytach, według aktywności hemolitycznej pojedynczych związków oraz aktywności mieszanin i efektów współdziałania związków w mieszaninie.

Badanych związków	Aktywność hemolityczna							
	Mieszanin związków z kwasem 2,4-D				Mieszanin związków z kwasem FMG			
	równomolarnych		nierównomolarnych		równomolarnych		nierównomolarnych	
AFa-2	AFa-6	synergizm	AFa-2	synergizm	AFa-6	synergizm	AFa-6	synergizm
AFa-5	AFa-3	synergizm	AFa-6	synergizm	AFa-3	synergizm	AFa-4	antagonizm
AFa-6	AFa-7	addytywność	AFa-3	addytywność	AFa-1	addytywność	AFa-3	antagonizm
AFa-7	AFa-5	antagonizm	AFa-5	antagonizm	AFa-7	addytywność	AFa-2	antagonizm
AFa-4	AFa-4	antagonizm	AFa-4	antagonizm	AFa-4	antagonizm	AFa-1	antagonizm
AFa-1	AFa-2	antagonizm	AFa-7	antagonizm	AFa-2	antagonizm	AFa-5	antagonizm
AFa-3	AFa-1	antagonizm	AFa-1	antagonizm	AFa-5	antagonizm	AFa-7	antagonizm
AFc-5	AFc-1	synergizm	AFc-4	synergizm	AFc-4	synergizm	AFc-4	synergizm
AFc-4	AFc-4	synergizm	AFc-1	synergizm	AFc-3	synergizm	AFc-3	synergizm
AFc-1	AFc-3	synergizm	AFc-3	antagonizm	AFc-1	synergizm	AFc-1	addytywność
AFc-3	AFc-2	antagonizm	AFc-5	antagonizm	AFc-5	antagonizm	AFc-2	antagonizm
AFc-2	AFc-5	antagonizm	AFc-2	antagonizm	AFc-2	antagonizm	AFc-5	antagonizm
AFm-2	AFm-1	addytywność	AFm-3	addytywność	AFm-1	antagonizm	AFm-2	addytywność
AFm-3	AFm-3	antagonizm	AFm-2	antagonizm	AFm-3	antagonizm	AFm-3	antagonizm
AFm-1	AFm-2	antagonizm	AFm-1	antagonizm	AFm-2	antagonizm	AFm-1	antagonizm

Na podstawie powyższego zestawienia można zauważyć, że mieszaniny związków acyklicznych (AFa-n) i cyklicznych (AFc-n) wykazują większą aktywność hemolityczną w

mieszaninach z 2,4-D i FMG niż związki pochodne fluorenu (AFm-n), które w mieszaninach dają efekty addytywne lub antagonistyczne. Wśród związków acyklicznych na uwagę zasługuje związki AFa-6, który w mieszaninach równomolarnych i nierównomolarnych z 2,4-D i FMG daje efekt synergiczny oraz związek AFa-3, który daje efekt synergiczny w mieszaninach równomolarnych z 2,4-D i FMG. W grupie związków cyklicznych AFc-n, na uwagę zasługują związki: AFc-4, który daje efekt synergiczny dla mieszanin równomolarnych i nierównomolarnych z 2,4-D i FMG; związek AFc-3, który daje efekt synergiczny dla mieszanin z FMG i mieszaniny równomolarnej z kwasem 2,4-D oraz związek AFc-1 dający efekt synergiczny z 2,4-D i w mieszaninie równomolarnej z FMG.

VI. Dyskusja

Na całym świecie prowadzone są intensywne badania mające na celu poszukiwanie skuteczniejszych herbicydów, ponieważ dotychczas stosowane często tracą swoją aktywność w wyniku uodparniania się organizmów, przeciwko którym są skierowane. Oprócz wysokiej aktywności biologicznej oczekuje się, że nowe herbicydy nie będą stanowiły zagrożenia dla innych organizmów żywych. Przeprowadzone w tej pracy badania dotyczą aktywności biologicznej nowej grupy aminofosfonianów o właściwościach potencjalnych herbicydów. Oczekiwano, że strukturalne podobieństwo do znanych ze swej aktywności innych związków fosforoorganicznych, wyłoni nową grupę substancji, charakteryzujących się równie dobrą lub wyższą aktywnością biologiczną. Użyte w badaniach aminofosfoniany nie stanowią zagrożenia dla środowiska naturalnego dzięki temu, że są rozkładane na związki nietoksyczne [Garncarz, 1997].

Celem prezentowanych badań było określenie molekularnego mechanizmu działania badanych związków na błony biologiczne oraz ocena ich aktywności biologicznej. Aktywność biologiczną nowych aminofosfonianów, zróżnicowanych strukturalnie, określano głównie na podstawie oddziaływania tych substancji z błoną erytrocytów, traktowaną jako dobry model błony biologicznej, a następnie na roślinach wyższych. W szczególności, aktywność związków względem błony erytrocytów, oceniano na podstawie wielkości zmian parametrów fizycznych błony takich jak.: podatność na hemolizę, oporność osmotyczna i zmiana kształtu erytrocytów oraz płynność ich błony, które wynikały ze zmian jej właściwości fizycznych.

W procesie hemolizy, wywołanej przez badane substancje, istotne są głównie dwa czynniki, które decydują o aktywności związku: ilość cząsteczek związku wbudowanego do błony oraz głębokość, na jaką związek się wbuduje. Jak wykazały badania przeprowadzone przez innych autorów nad hemolizą indukowaną przez substancje biologicznie aktywne [Kondo, 1976; Boyer i inni, 1993; Hamasaki i inni, 1995; Silva i inni, 2000; Bazzoni i Rasia, 2001; Kleszczyńska i inni, 2000 a, b, c, 2001 a, b, c, 2003; Sarapuk i inni, 2000; Sarapuk, 2000], obydwa czynniki zależą od geometrycznego kształtu cząsteczek. Na kształt cząsteczki ma wpływ zarówno wielkość części hydrofobowej związku, która zależy od długości łańcuchów alkilowych podstawników, jak również rozmiary części hydrofilowej związku, które mogą wpływać na rozkład ładunku na powierzchni błony.

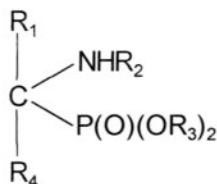
Użyte w badaniach strukturalnie różne grupy aminofosfonianów (acykliczne, cykliczne i pochodne fluorenu), umożliwiły powiązanie aktywności biologicznej tych substancji z ich

strukturą chemiczną. W obrębie każdej grupy związku różniły się między sobą liczbą atomów węgla w podstawnikach przy atomach: węgla, fosforu i azotu.

W tej pracy dyskutowana zatem będzie aktywność poszczególnych związków, w odniesieniu do modelowej błony biologicznej, w zależności od rodzaju pierścienia (cykloheksanowego i fluorenowego), a także od lokalizacji i rodzaju podstawników, w których zmieniały się długości łańcuchów alkilowych. Rodzaj podstawników ma wpływ na lipofilowość użytych w tej pracy aminofosfonianów, co z kolei wpływa na wbudowywanie się cząsteczek związków do błony erytrocytów. Wbudowane do błony cząsteczki w obszarze hydrofilowym błony oddziałują z nią elektrostatycznie, zaś w jej wnętrzu hydrofobowo. Wielkość tych oddziaływań decyduje m. in. o głębokości, na jaką cząsteczka aminofosfonianu może wnikać do błony.

Związki acykliczne

Badane aminofosfoniany acykliczne różnią się między sobą podstawnikami przy atomie węgla R_1 i R_4 , atomie azotu R_2 i atomie fosforu R_3 .



Związki acykliczne mają charakter amfifilowy; część hydrofobową związku stanowią podstawniki R_1 i R_4 przy atomie węgla zaś grupa aminowa i fosfonowa są polarnymi fragmentami związku. Polarność związku zależy od długości łańcuchów węglowodorowych przyłączonych do części polarnych. Dla łańcuchów zawierających 4 lub więcej atomów węgla w podstawnikach R_2 i R_3 , części polarne stają się bardziej zasadowe, a związek bardziej hydrofobowy. Na hydrofobowość związku mają wpływ również długości łańcuchów alkilowych w podstawnikach R_1 i R_4 przy atomie węgla. Wzrost hydrofobowości związku sprzyja wnikanii łańcuchów w obszar hydrofobowy i powoduje wzrost oddziaływań hydrofobowych w tym obszarze. Związki acykliczne mogą zatem oddziaływać elektrostatycznie z częścią hydrofilową błony, jak również hydrofobowo.

Aktywność hemolityczna związków acyklicznych poddanych badaniom układu się następująco: AFa-2>AFa-5>AFa-6>AFa-7>AFa-4>AFa-1>AFa3.

Najaktywniejszy hemolitycznie jest związek AFa-2 ($C_{50} = 0,029$ mM), którego podstawniki zawierają od 1 do 6 atomów węgla, a cząsteczka związku posiada w sumie 20 atomów węgla. Mniejszą aktywność hemolityczną posiada związek AFa-5 ($C_{50} = 0,081$ mM),

zawierający 19 atomów węgla w cząsteczce. W części hydrofobowej związek AFa-5 posiada dwie grupy metylowe, a związek AFa-2 grupę metylową i łańcuch czterowęglowy. W części polarnej związek AFa-5 posiada łańcuch alkilowy ośmiowęglowy i czterowęglowy, a AFa-2 sześć i czterowęglowy. Chociaż związki te różnią się w sumie tylko jednym atomem węgla, to związek AFa-5 posiada aktywność ponad 2,5 razy niższą, prawdopodobnie z powodu mniejszej części hydrofobowej związku.

Wysoką aktywnością hemolityczną charakteryzują się dwa kolejne związki AFa-6 i AFa-7, związki te różnią się jedynie długościami łańcuchów alkilowych w podstawniku R_1 , posiadają natomiast jednakowe łańcuchy w części polarnej, przy grupie aminowej i fosfonowej oraz atom wodoru jako podstawnik R_4 . Wyższą aktywność wykazuje związek AFa-6 ($C_{50} = 0,15$ mM) z dziewięciowęglowym łańcuchem alkilowym w podstawniku R_1 w stosunku do aktywności związku AFa-7 ($C_{50} = 0,19$ mM), którego podstawnik R_1 jest łańcuchem sześciowęglowym. Wyższa aktywność AFa-6 jest prawdopodobnie związana z większą hydrofobowością tego związku w stosunku do związku AFa-7.

Wpływ jaki mają na aktywność związków podstawniki R_2 i R_3 , zlokalizowane w części hydrofilowej, można przedyskutować porównując aktywność związków AFa-1 i AFa-3 oraz AFa-2 i AFa-4. Związki AFa-1 i AFa-3 różnią się podstawnikiem przy atomie fosforu (R_3). Aktywniejszy hemolitycznie jest związek AFa-1 ($C_{50} = 0,26$ mM), który posiada dłuższy łańcuch (czterowęglowy), zaś związek AFa-3 ($C_{50} = 0,52$ mM) zawierający krótszy łańcuch (dwuwęglowy), ma aktywność dwukrotnie mniejszą. O roli podstawnika R_2 przy atomie azotu można mówić porównując aktywności związków AFa-2 i AFa-4, z których AFa-2 zawiera przy atomie azotu łańcuch sześciowęglowy, natomiast AFa-4 posiada łańcuch dwa razy krótszy w tym samym podstawniku. Jak wskazują otrzymane wyniki badań długości łańcuchów alkilowych w podstawnikach R_2 i R_3 , które stanowią część hydrofilową związku, mają wyraźny wpływ na ich aktywność. Porównując ze sobą wyniki otrzymane dla związków AFa-1 i AFa-3 oraz AFa-2 i AFa-4 można zauważyć, że aktywność związku wyraźnie zależy od długości łańcuchów węglowodorowych podstawników R_2 i R_3 . Ponadto większy wpływ na aktywność związków ma podstawnik R_2 przy grupie aminowej, ponieważ dwukrotnie krótszy łańcuch tego podstawnika powoduje ośmiokrotne zmniejszenie aktywności związku AFa-4 ($C_{50} = 0,23$ mM) w porównaniu z aktywnością związku AFa-2 ($C_{50} = 0,029$ mM).

Autorzy prac, w których badane były podobne związki fosforoorganiczne acykliczne [Gancarz, 1997; Sarapuk, 2000; Sarapuk i inni, 2000, 2003] podkreślają, że na aktywność związków mają wpływ podstawniki przy atomie węgla, fosforu i azotu, które decydują o wielkości części hydrofobowej i hydrofilowej związku. Badania przeprowadzone wcześniej

dla czwartorzędowych soli amoniowych, które są amfifilowymi związkami biologicznie aktywnymi [Kleszczyńska i inni, 1997, 1998], wykazały, że przy jednakowej części polarnej związku o jego aktywności decyduje jedynie długość łańcuchów alkilowych. Aktywność hemolityczna aminofosfonianów acyklicznych zależy zarówno od struktury części hydrofilowej, jak i od długości łańcuchów alkilowych w części hydrofobowej. Na podstawie wyników badań uzyskanych w tej pracy wykazano, że aktywność hemolityczna związku nie zależy jedynie od części hydrofobowej związku, ale jest wypadkową oddziaływania związku zarówno z częścią hydrofobową jak i hydrofilową błony erytrocytów.

W zakresie stężeń nielitycznych, obserwowano niewielkie zmiany oporności osmotycznej erytrocytów dla związków acyklicznych, np. związki AFa-2, AFa-5 i AFa-7 powodowały niewielkie zmiany, zwiększając oporność osmotyczną erytrocytów (tab.5.6.). Można przypuszczać, że wbudowane do błony erytrocytów niewielkie ilości związków powodują jej uszczelnienie, a tym samym wpływają na zwiększenie oporności osmotycznej erytrocytów, na co zwracają uwagę autorzy prac dotyczących innych związków [Mosior i Gomułkiewicz, 1989; Schrier i inni, 1992].

Przeprowadzone badania płynności błony i kształtu erytrocytów wykazały, że związki te oddziałują z błoną biologiczną i lokują się w różnych jej rejonach, zmieniając jej płynności. Badając płynność błony za pomocą różnych znaczników otrzymano informację o głębokości, na jaką związki wbudowują się do błony.

Badania wykonane przy użyciu sondy Laurdan, która dostarcza informacji z części hydrofilowej błony na poziomie reszt glicerolowych (strefa I i II, rys.2.7.), wykazały wzrost płynności błony w tym rejonie dla większości związków z wyjątkiem AFa-6 i AFa-7 (tab.5.10.a). Dla tych związków, które mają najdłuższe łańcuchy w podstawnikach R_1 obserwuje się wzrost uogólnionej polaryzacji GP, czyli wzrost sztywności błony. Pozostałe związki o krótszych łańcuchach powodują zmniejszenie GP, czyli wzrost płynności błony. Jakościowo różne zmiany, jakie rejestruje sonda Laurdan [Haris i inni, 2002], w dynamicznych właściwościach błony erytrocytów na granicy fazy hydrofilowej i hydrofobowej, są spowodowane, jak należy przypuszczać, różną głębokością wbudowania się do błony tej grupy związków.

W badaniach wykonanych sondą DPH, która daje sygnał z części hydrofobowej błony w rejonie łańcuchów lipidowych (strefa III i IV, rys.2.7), otrzymano zmniejszone, w stosunku do kontroli, wartości polaryzacji i anizotropii fluorescencji dla wszystkich związków, największe zmiany wywołują związki AFa-6 i AFa-7 przy stężeniu 10 μ M (tab.5.7.a). Wyniki te

wskazują, że związki acykliczne zwiększają płynność w tym rejonie błony, jednak największe zmiany wprowadzają związki o najdłuższych łańcuchach alkilowych w podstawnikach R₁.

Badania przy użyciu sondy TMA-DPH, która daje sygnał z rejonu łańcuchów lipidowych w pobliżu rdzenia błony (strefa I, II, III, rys.2.7.), również wskazują na wzrost płynności błony (tab.5.8.a) Na podstawie tych badań można przypuszczać, że związki acykliczne wbudowują się do błony powodując zmiany zarówno w części hydrofilowej, jak i w części hydrofobowej. Badania przy użyciu sondy TMAP-DPH, zlokalizowanej nieco głębiej niż sonda TMA-DPH, wykazały wzrost polaryzacji i anizotropii fluorescencji przy stężeniu 5 μ M wyłączając związki AFa-5 i AFa-7. Przy większym stężeniu związków wynoszącym 10 μ M anizotropia i polaryzacja maleją, czyli rośnie płynność błony (tab.5.9.a). Przy niższym stężeniu wbudowane do błony związki zmniejszają ruchliwość cząsteczek lipidowych i zmniejszają jej płynność, zaś przy większym stężeniu powodują zmniejszenie oddziaływań pomiędzy składnikami błony, zwiększając jej płynność. Inni autorzy zwracają uwagę na taką możliwość, że związki błonoaktywne przy różnych stężeniach mogą dawać jakościowo różne zmiany płynności błony [Campbell i Dwek 1984; Devaux, 2002].

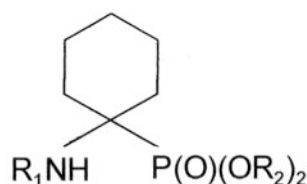
Wyniki otrzymane w tej pracy z badań płynności błony przy zastosowaniu różnych sond dla związków acyklicznych oraz spostrzeżenia innych autorów [Suwalsky i inni, 2004; Michalak, 1996] pozwalają przypuszczać, że większość związków lokuje się w pobliżu reszt glicerolowych cząsteczek fosfolipidów, zaś związki o dłuższych łańcuchach alkilowych w podstawnikach przy atomach węgla wnikają do obszaru hydrofobowego błony.

Badania kształtu erytrocytów dowodzą również, że aminofosfoniany acykliczne wbudowują się do błony i w stężeniach nielitycznych indukują głównie formy echinocytarne erytrocytów. Jak wynika z badań szeroko prowadzonych przez innych autorów dla różnych związków jeśli związki lokują się głównie w warstwie zewnętrznej błony tworzą echinocyty, jeśli zaś w warstwie wewnętrznej to tworzą stomatocyty [Ponder, 1948; Sheetz, Singer, 1974; Iglic i inni, 1998; Bernhardt i Ellory, 2003]. Jak wskazują prezentowane w tej pracy badania (tab.5.11.), tylko związek acykliczny AFa-6 o długim łańcuchu alkilowym przy atomie węgla, czyli o dużej hydrofobowości, indukuje formy stomatocytarne erytrocytu, co świadczy o tym, że jest obecny również w monowarstwie wewnętrznej. Dyfuzja tego związku z jednej monowarstwy do drugiej świadczy o większych jego oddziaływaniach hydrofobowych z błoną, dzięki czemu może on wnikać do wewnętrznej monowarstwy błony komórkowej. Jak sugerują inni autorzy [Vinardell, 1999; Kleszczyńska, 1999, 2001, 2003] o toksyczności hemolitycznej związku decyduje między innymi ilość związku, który wbudowując się do błony przy, odpowiednio dużym stężeniu, powoduje jej zniszczenie. Uzyskane w tej pracy

wyniki wykazały, że najaktywniejszy hemolitycznie jest związek acykliczny AFa-2, który tworzy echinocyty, a zatem jego cząsteczki kumulują się głównie w warstwie zewnętrznej. Aby wywołać odpowiedni efekt hemolityczny wymagane jest mniejsze stężenie tego związku, w porównaniu ze stężeniem związku, który kumuluje się tylko zarówno w zewnętrznej, jak i w wewnętrznej monowarstwie. Fakt wbudowywania się związku AFa-6 do obu monowarstw, wymaga większego stężenia, odpowiedzialnego za 50 % hemolizę, w stosunku do stężenia związku AFa-2, dającego ten sam efekt.

Związki cykliczne

Związki cykliczne posiadają pierścień cykloheksanowy i różne podstawniki przy grupie aminowej R_1 i fosfonowej R_2 , ponadto jeden ze związków posiada czterowęglowy łańcuch przy czwartym atomie węgla w pierścieniu.



Toksyczność hemolityczna tej grupy związków stanowi następujący szereg aktywności: AFc-5>AFc-4>AFc-2>AFc-1>AFc-3.

Podobnie, jak w przypadku związków acyklicznych, częściami polarnymi cząsteczki są grupa aminowa i fosfonowa, których polarność maleje w miarę wzrostu długości łańcuchów przyłączonych do tych grup. Pierścień cykloheksanowy stanowiący hydrofobowy fragment cząsteczki, nie jest strukturą płaską i może występować głównie w dwóch stanach konformacyjnych [Stryer, 1997]. Konformacja „krzesłkowa” jest bardziej symetryczna i trwalsza w porównaniu z konformacją „łódkową”, w której niektóre atomy wodoru są do siebie bardziej zbliżone, a powstające między nimi siły odpychania zmniejszają jej trwałość. Należy wobec tego się spodziewać, że aktywność hemolityczna, związana z możliwością wbudowywania się do błony erytrocytów związków cyklicznych, zależy nie tylko od wielkości oddziaływań hydrofilowych i hydrofobowych, lecz także od struktury przestrzennej cząsteczki związku. Toksyczność hemolityczna poszczególnych substancji tej grupy nie różni się tak znacznie, jak w przypadku związków acyklicznych, pomimo dużych różnic w budowie podstawników R_1 , które zawierają od czterech do czternastu atomów węgla w łańcuchu.

Najaktywniejszy z tej grupy związek AFc-5 ($C_{50} = 0,25$ mM) posiada odpowiednio w podstawnikach R_1 i R_2 cztero- i dwuwęglowe łańcuchy alkilowe. Mniejsze aktywności posiadają związki o dłuższych łańcuchach w tych podstawnikach, co świadczy o tym, że nie

ma prostej relacji między hydrofobowością związku i jego aktywnością w tej grupie. O roli łańcucha węglowodorowego przyłączonego do czwartego atomu węgla w pierścieniu można dyskutować porównując związek AFc-1 i AFc-2. Porównując aktywności hemolityczne związków AFc-3 i AFc-4, można dyskutować wpływ podstawnika R_1 , zaś w przypadku związków AFc-2 i AFc-5 podstawnika R_2 .

Jak wykazały badania hemolityczne związek cykliczny AFc-1 ($C_{50} = 0,77$ mM) jest nieco mniej aktywny niż związek AFc-2 ($C_{50} = 0,57$ mM), nie posiadający dodatkowego podstawnika w pierścieniu, co może sugerować, że struktura przestrzenna związku AFc-1 zmniejsza jego możliwości wbudowania się do błony. Porównując z kolei wyniki otrzymane dla związków AFc-3 i AFc-4, można stwierdzić, że długość łańcucha alkilowego przy grupie aminowej nieznacznie wpływa na toksyczność hemolityczną obu związków. Związek AFc-3 zawierający czternastowęglowy łańcuch alkilowy posiada niższą toksyczność hemolityczną ($C_{50} = 0,83$ mM) niż związek AFc-4 z ośmiowęglowym łańcuchem ($C_{50} = 0,42$ mM). W przypadku związków AFc-2 i AFc-5 różniących się podstawnikiem R_2 przy grupie fosfonowej, wyniki wskazują na duży wpływ tego podstawnika na toksyczność hemolityczną. Związek o krótszym łańcuchu alkilowym o jeden atom węgla posiada trzykrotnie większą toksyczność hemolityczną. Z analiz i porównań wynika także, że związki acykliczne wykazują mniejszą aktywność niż związki cykliczne.

Związki cykliczne nie zmieniają w zasadzie oporności osmotycznej błony erytrocytu. Niewielkie zmiany powodują jedynie związki AFc-3 i AFc-4, które posiadają długie łańcuchy węglowodorowe w podstawnikach R_1 , co świadczy o tym, że w niewielkich stężeniach uszczelniają błonę komórkową, zwiększając jej oporność osmotyczną (tab.5.6.b).

Badania fluorymetryczne wykonane przy użyciu sondy DPH (tab.5.7.b) wykazały, że polaryzacja i anizotropia fluorescencji zmniejsza się dla związków AFc-3 i AFc-4, które posiadają długie łańcuchy węglowodorowe w podstawniku R_1 , co świadczy o wzroście płynności i ich wbudowywaniu się do błony głębiej niż ma to miejsce w przypadku pozostałych związków cyklicznych, które w niewielkim stopniu zmieniają płynności błony. Zmiany płynności uzyskane za pomocą tej sondy świadczą o tym, że związki cykliczne mogą penetrować do części hydrofobowej błony [Kaiser i London 1998].

Badania wykonane przy użyciu sondy TMA-DPH (tab.5.8.b) nie wykazały znaczących zmian w polaryzacji i anizotropii. Anizotropia i polaryzacja fluorescencji wyznaczone z kolei za pomocą sondy TMAP-DPH wskazuje, że związki cykliczne zwiększają płynność błony, zaś związek AFc-5, najbardziej aktywny hemolitycznie, powoduje usztywnienie błony, co świadczy o lokalizacji tego związku właśnie w części hydrofobowej.

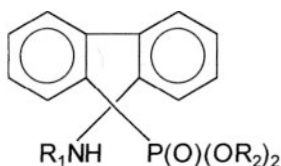
Lokalizację związków cyklicznych na granicy faz hydrofilowo-hydrofobowej potwierdzają badania przy użyciu sondy Laurdan, gdzie uogólniona polaryzacja GP dla poszczególnych związków rosła w stosunku do kontroli i miała najwyższą wartość dla związku AFc-5 (tab.5.10.b).

Badania kształtu erytrocytów w obecności związków cyklicznych wykazały, że związki AFc-1, AFc-2 i AFc-5 indukują głównie formy echinocytarne, zaś związki AFc-3 i AFc-4 formy stomatocytarne (tab.5.11.). Te ostatnie (AFc-3 i AFc-4) posiadają długie łańcuchy węglowodorowe w podstawnikach R_1 , co ułatwia im przenikanie do warstwy wewnętrznej błony komórkowej, i indukowanie stomatocytów.

Można przypuszczać, że podobnie jak w przypadku AFa-6, związki te mogą dyfundować do wewnętrznej monowarstwy błony. Długie łańcuchy węglowodorowe przy podstawnikach R_1 w tych związkach prawdopodobnie powodują zwiększone oddziaływanie w rejonie hydrofobowym błony, co ułatwia im wnikanie do wewnętrznej monowarstwy i bardziej równomierne rozlokowanie się związku w obu monowarstwach błony. Podobnie jak związek AFa-6, są one mniej aktywne hemolitycznie od związku najbardziej aktywnego AFc-5, który kumuluje się głównie w zewnętrznej monowarstwie indukując powstawanie echinocytów.

Aminofosfonowe pochodne fluorenu

Pochodne fluorenu posiadają dwa pierścienie fluorenowe, czterowęglowy łańcuch alkilowy w podstawniku R_1 -C₄H₇ przy grupie aminowej i różne podstawniki R_2 przy grupie fosfonowej. Podstawniki te zawierają dwu-, ośmio- lub jedenastowęglowy łańcuch węglowodorowy.



Aktywność hemolityczna związków z tej grupy jest porównywalna z aktywnością aminofosfonianów acyklicznych i układa się w następującą sekwencję: AFm-2>AFm-3>AFm-1.

Najwyższą aktywność hemolityczną posiada związek AFm-2 z ośmiowęglowym podstawnikiem R_2 przy grupie fosfonowej, który indukuje hemolizę 50 % erytrocytów przy najmniejszym stężeniu wynoszącym 0,09 mM. Aminofosfonowe pochodne fluorenu posiadają płaskie pierścienie hydrofobowe, które mogą penetrować w głąb hydrofobowego wnętrza błony erytrocytów na głębokość, która prawdopodobnie zależy od polarności grupy aminowej

i fosfonowej wraz z podstawnikami. Charakter tych grup uzależniony jest od długości łańcuchów alkilowych przyłączonych do nich. Odpowiednio długie łańcuchy zmniejszają ich właściwości polarne, a tym samym zmniejszają oddziaływania elektrostatyczne cząsteczek związków w błonie. W konsekwencji wysoką aktywność posiadają związki o długich łańcuchach alkilowych tj. ośmio- i jedenastowęglowym. Toksyczność hemolityczna związku jedenastowęglowego (AFm-3), bardziej hydrofobowego, który może łatwiej wnikać do obszaru hydrofobowego błony jest mniejsza jednak niż związku ośmiowęglowego (AFm-2). Można to wytłumaczyć w podobny sposób jak w przypadku związków AFa-2 i AFa-6, biorąc pod uwagę wyniki mikroskopowego badania kształtu erytrocytów. Wykazały one bowiem, że najbardziej hydrofobowe związki przenikają również do wewnętrznej monowarstwy lipidowej błony, zatem ich stężenia rozkładają się między obie monowarstwy. Dotyczy to również związków AFm-1 i AFm-3, które indukują echinocyty, czyli wbudowują się głównie do zewnętrznej warstwy błony erytrocytów. Podstawnik przy atomie fosforu ma zatem duży wpływ na zdolności związku do wbudowywania się do błony erytrocytów, ponadto ze wzrostem długości łańcucha alkilowego pochodne fluorenu łatwiej wnikają w głąb błony erytrocytów. O dużej aktywności związków pochodnych fluorenu, które zaburzają funkcje błony komórkowej lub powodują jej uszkodzenie świadczyły badania przeprowadzone wcześniej przez autorów Skrabka i Jaskulska (1987).

Badania oporności osmotycznej erytrocytów w zakresie stężeń nielitycznych wykazały, że oporność erytrocytów wzrosła nieznacznie dla poszczególnych związków w stosunku do komórek kontrolnych (tab.5.6.c).

Fakt wbudowania się pochodnych fluorenu do błony erytrocytów potwierdziły badania płynności błony, które wykazały zmiany płynności błony erytrocytów.

Przy użyciu sondy Laurdan wykazano wzrost uogólnionej polaryzacji GP (tab.5.10.c), świadczącej o wzroście sztywności membrany w cieniach erytrocytów na poziomie glicerolu dwuwarstwy lipidowej. Wbudowane do błony pochodne fluorenu powodują wzrost uporządkowania w części polarnej błony. Taki wynik badań został również potwierdzony przy zastosowaniu znacznika fluorescencyjnego TMAP-DPH (tab.5.9.c). Wzrost polaryzacji i anizotropii świadczy o wzroście sztywności błony w rejonie łańcuchów lipidowych w pobliżu części polarnej błony.

Wyniki badań uzyskane przy użyciu sondy DPH świadczą o wzroście płynności błony (strefa III i IV rys.2.7.) w obszarze łańcuchów węglowodorowych (tab.5.7.c). Wbudowane do zewnętrznej monowarstwy cząsteczki pochodnych fluorenu, prawdopodobnie powodują rozsuniecie główek polarnych lipidów, co wpływa na zwiększenie odległości między

łańcuchami alkilowymi lipidów i w efekcie prowadzi do wzrostu płynności. Zmiany w części hydrofobowej błony mogą się jednak lokalnie zmieniać w zależności od ilości wbudowanych cząsteczek pochodnych fluorenowych, jak również od głębokości wbudowania się ich do błony. Wzrost płynności i sztywności błony erytrocytów uzyskano przy użyciu sondy TMA-DPH dla różnych związków tej grupy (tab.5.8.c). Oznaczać to może, że wzrost płynności powodowały związki AFm-2 i AFm-3, które łatwiej łączą się z błoną, ze względu na większą hydrofobowość, natomiast związek AFm-1 wpływał na wzrost sztywności błony.

Aktywne składniki preparatów herbicydowych

Glifosat (FMG) i kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy (2,4-D) są aktywnymi składnikami stosowanych powszechnie herbicydów, które podlegają ciągłym badaniom w celu zrozumienia ich molekularnego mechanizmu działania na rośliny. Przeprowadzone w tej pracy badania hemolityczne wykazały, że substancje te indukują hemolizę erytrocytów w stężeniach rzędu kilku milimoli (tab.5.1), która jest spowodowana, jak należy przypuszczać, absorpcją tych związków do fazy lipidowej błony. Potwierdzają to wyniki badania kształtu erytrocytów, zamieszczone w tej pracy, jak również otrzymane innych autorów [Suwalsky i inni, 1996], które wykazały, że związki te tworzą echinocyty, co świadczy o ich wbudowywaniu się głównie do zewnętrznej monowarstwy błony erytrocytów. Badania płynności błony przedstawione w tej pracy, wykazały że 2,4-D powoduje wzrost płynności błony zarówno w części hydrofilowej, jak i w części hydrofobowej, glifosat z kolei powodował usztywnienie błony erytrocytów. Obydwa związki powodują zatem zmiany w dynamice składników błony, które są jednocześnie dowodzą o obecność cząsteczek tych związków głównie w warstwie zewnętrznej błony.

Wyniki badań hemolitycznych dobrze korelują z badaniami przeprowadzonymi dla tych związków w podobnych warunkach przez innych autorów [Bukowska, Zatorska 2003; Duchnowicz i inni, 2003; Pieniążek i inni, 2004]. Badania kształtu erytrocytów przeprowadzone przez autorów pracy [Suwalsky i inni, 1996] wskazują, podobnie jak niniejsze badania, że związek 2,4-D indukuje powstawanie echinocytów. Inni autorzy wykazali także zmiany płynności błony erytrocytów wywołane przez 2,4-D i jego pochodne [Bukowska i inni, 1998, 2000, 2002, 2003]. Ponadto autorzy wielu prac sugerują, że oba herbicydy 2,4-D i glifosat indukują zmiany stanów konformacyjnych białek błonowych, wpływają na oddziaływania białko-lipid i na funkcjonowanie kanałów jonowych [Suwalsky i inni, 1999; Duchnowicz i Koter, 2000].

Mieszaniny związków

W prezentowanej pracy wykonano również badania pozwalające określić toksyczność hemolityczną mieszanin herbicydowych, składających się z badanych aminofosfonianów i aktywnych składników znanych i stosowanych na rynku herbicydów, 2,4-D i glifosatu (FMG). Uzyskane wyniki pozwoliły na ocenę aktywności mieszanin oraz na porównanie jej z aktywnościami pojedynczych składników, zarówno w oddziaływaniu z modelową błoną erytrocytów, jak i w odniesieniu do roślin wyższych: ogórka, pszenicy i gorczycy.

Badania aktywności mieszanin aminofosfonianów z kwasem 2,4-D i glifosatem przeprowadzone na erytrocytach wykazały, że mieszaniny utworzone ze związkami cyklicznymi i acyklicznymi charakteryzuje się wyższą aktywnością aniżeli z pochodnymi fluorenu. Ponadto na skuteczność działania mieszanin ma wpływ sposób łączenia związków w mieszaninie, mianowicie to czy tworzyły one mieszaniny równomolarne czy też nierównomolarne.

Jak wynika z eksperymentów, błonoaktywne aminofosfoniany w mieszaninach z glifosatem lub 2,4-D, w działaniu na błony erytrocytów i w oddziaływaniu z roślinami wyższymi dają efekty addytywne, synergiczne lub antagonistyczne.

Jak wynika z eksperymentów zjawisko synergizmu w odniesieniu do erytrocytów, wystąpiło dla niektórych związków acyklicznych i cyklicznych, zaś pochodne fluorenu w mieszaninach wykazały działanie addytywne i antagonistyczne.

Wysoką aktywność w odniesieniu do błony erytrocytów posiadały mieszaniny utworzone z aminofosfonianami AFa-6, AFa-3 i AFc-4 z glifosatem i 2,4-D, które osobno wykazywały również dużą aktywność (tab.5.16). Związki te charakteryzują się dużym powinowactwem do błony erytrocytów; wbudowując się do niej oraz dyfundując do monowarstwy wewnętrznej, jak wynika z mikroskopowych badań kształtu. Można więc przypuszczać, że do zmodyfikowanej przez aminofosfoniany błony erytrocytów łatwiej wbudowują się cząsteczki związków 2,4-D i FMG. Zatem przy określonym stężeniu tych substancji w zawiesinie erytrocytów, większa liczba cząsteczek obydwu herbicydów wbudowuje się do błony, przyczyniając się do zwiększenia procentu hemolizy w porównaniu niż w przypadku pojedynczych związków w mieszaninie. Takie wyjaśnienie zjawiska synergizmu wydaje się być racjonalne, ponieważ wiadomo, że stężenia aktywnych składników herbicydów w roztworze, aby spowodować określony efekt hemolityczny, są znacznie wyższe niż stężenia aminofosfonianów.

Zjawisko antagonizmu występujące dla mieszanin utworzonych ze związkami: AFa-1, AFa-4, AFc-2 i AFm-1, może być związane z tworzeniem się soli tych związków w wyniku

reakcji chemicznej aminofosfonianu z cząsteczkami związków 2,4-D lub glifosatu. Powstanie dużej cząsteczki soli o określonej polarności prawdopodobnie zmniejsza możliwości jej wbudowywania się do warstwy lipidowej błony, lecz nie wyklucza oddziaływań elektrostatycznych z hydrofilową powierzchnią erytrocytu.

W przypadku wpływu związków i ich mieszanin na kiełkowanie i wzrost roślin wyższych, należy wziąć pod uwagę destrukcyjny wpływ tych substancji zarówno w odniesieniu do samej błony, jak również w stosunku do wnętrza komórki. W przeciwieństwie do erytrocytów, gdzie oddziaływanie z błoną dotyczy głównie fazy lipidowej, w odniesieniu do roślin działanie toksyczne związane jest z wpływem tych substancji zarówno na błonę komórek roślinnych, jak również na białka enzymatyczne, po wnikięciu ich do wnętrza komórki.

Związki AFa-1, AFa-3, AFa-2, AFa-4, AFa-5, AFc-1 oraz pochodne fluorenu (tab.5.12., 5.13) wykazały wysoką aktywność w odniesieniu do procesu inhibicji wzrostu i kiełkowania roślin wyższych.

Synergiczne działanie mieszanin utworzonych z aminofosfonianów i aktywnych składników herbicydów: AFa-1, AFa-2, AFm2 i AFm-3 z 2,4-D w odniesieniu do inhibicji hypokotyla ogórka oraz AFc-1 z glifosatem w odniesieniu do hypokotyla pszenicy (tab.5.14 i 5.15.), można prawdopodobnie wiązać się z modyfikacją błony przez te aminofosfoniany. Zmiany wywołane w błonie komórek roślinnych ułatwiają wnikanie do ich wnętrza aktywnych składników herbicydów, odpowiednio: glifosatu do komórek roślin jednoliściennych (pszenica) i 2,4-D do komórek roślin dwuliściennych (ogórek). Obniżenie aktywności mieszaniny w odniesieniu do roślin może być spowodowane, na co zwróciliśmy uwagę wcześniej, oddziaływaniem obydwu składników ze sobą, w wyniku czego dochodzi do powstawania nieaktywnych kompleksów.

VII. Wnioski

Otrzymane wyniki badań, dotyczące wpływu związków organicznych fosforu i ich mieszanin na fizyczne właściwości modelowej błony biologicznej oraz na rośliny wyższe (na wzrost i kiełkowanie roślin), pozwalają sformułować następujące wnioski:

1. Wykazano, że najwyższą aktywność hemolityczną posiadają związki acykliczne i pochodne fluorenu, zaś mniej aktywne są związki cykliczne zawierające pierścień cykloheksanowy. W obrębie zaś grupy najaktywniejsze są związki o najdłuższych łańcuchach alkilowych w podstawnikach znajdujących się przy atomach: węgla, azotu i fosforu.
2. Wykazano, że im większa jest aktywność hemolityczna badanych związków, tym większe zmiany, przy stężeniach nielitycznych (0,1 i 0,01 mM), wywołują one we właściwościach błony erytrocytów, zmieniając jej płynność oraz kształt i oporność osmotyczną krwinek.
3. Stwierdzono, że badane związki przy stężeniach nielitycznych (5 i 10 μ M) zmieniają płynność błony erytrocytów w dwojaki sposób (usztywniają ją lub upłynniają), zarówno w części hydrofilowej, jak i hydrofobowej. Zmiany w stopniu uporządkowania błony zależą od rodzaju związku, jego stężenia i od głębokości penetracji do błony.
4. Wykazano, że badane związki wbudowują się zarówno do zewnętrznej monowarstwy błony erytrocytów, indukując kształty echinocytów, jak i do warstwy wewnętrznej tworząc stomatocyty. Większość związków jednak tworzy echinocyty, koncentrując się głównie w warstwie zewnętrznej. Związki o najdłuższych łańcuchach przy atomach: węgla (AFa-6), azotu (AFc-3 i AFc-4) i fosforu (AFm-2 i AFm-3) dyfundują do wewnętrznej monowarstwy erytrocytów tworząc stomatocyty.
5. Wykazano, że związki posiadające większą aktywność w odniesieniu do modelowej błony erytrocytów wykazują również większy wpływ na inhibicję wzrostu hypokotyla ogórka i pszenicy oraz większy na kiełkowanie nasion gorczycy. W szczególności pochodne fluorenu w odniesieniu do inhibicji wzrostu roślin wykazały identyczną sekwencję aktywności, jak w odniesieniu do modelowej błony erytrocytów.
6. Stwierdzono, że aktywność niektórych mieszanin związków fosforoorganicznych z 2,4-D i FMG w odniesieniu do modelowej błony erytrocytów była wyższa niż aktywność pojedynczych jej składników (zjawisko synergizmu). Podobnie jak w odniesieniu do błony erytrocytów, wyższą aktywność w stosunku do roślin wyższych

wykazano dla mieszanin pochodnych fluorenu z 2,4-D. Aktywność pozostałych mieszanin kształtowała się inaczej niż w odniesieniu do błony modelowej.

Przeprowadzone w tej pracy badania pozwoliły na zrealizowanie celu pracy.

Wykazane zmiany parametrów fizycznych błony erytrocytów, jako modelu błony biologicznej, pozwoliły na wyznaczenie aktywności biologicznej użytych do badań związków fosforoorganicznych oraz były podstawą do określenia molekularnego mechanizmu ich działania. Dobra zgodność uzyskanych wyników dla błony erytrocytów i w odniesieniu do roślin wyższych umacnia w przekonaniu, że błona krwinki jest dobrym modelem błony biologicznej, a badania wielkości wybranych parametrów fizycznych na niej przeprowadzone stanowią podstawę do określenia aktywności związków biologicznie aktywnych.

VIII. Streszczenie

Zamieszczone w tej pracy badania dotyczą wpływu nowych związków organicznych fosforu na błonę erytrocytów i na rośliny wyższe. Zbadano wpływ wyżej wymienionych związków na właściwości fizyczne błony erytrocytów, traktowanej jako model błony biologicznej oraz na kiełkowanie nasion gorczycy i hamowanie wzrostu ogórka i pszenicy.

Nowa grupa syntetycznych związków organicznych fosforu użytych w pracy to związki acykliczne, cykliczne z pierścieniem cykloheksanowym i pochodne fluorenu z podwójnym pierścieniem fluorenowym. Związki te, jak oczekiwano mogą stanowić potencjalnie nową grupę herbicydów. Wszystkie badane związki mają charakter amfifilowy i wykazują działanie toksyczne, oddziałując z częścią hydrofilową i hydrofobową błony erytrocytów.

Wyniki badań wpływu użytych związków na błonę erytrocytów miały na celu ocenę aktywności biologicznej nowych związków z grupy aminofosfonianów, oraz określenie mechanizmu tego oddziaływania na poziomie molekularnym i komórkowym. Celem badań było również określenie zależności między aktywnością biologiczną związków a ich strukturą chemiczną, a w szczególności wskazanie wpływu, jaki mają różne grupy funkcyjne badanych substancji na ich aktywność. W badaniach tych określono aktywność biologiczną organicznych związków fosforu na podstawie wielkości zmian parametrów fizycznych błony erytrocytów. W szczególności zbadano proces hemolizy erytrocytów indukowanej przez badane substancje, oporność osmotyczną i zmiany kształtu erytrocytów oraz płynność ich błony.

Badaniom aktywności biologicznej poddano również mieszaniny dwuskładnikowe, powstałe z połączenia jednego związku organicznego fosforu i aktywnego składnika stosowanych powszechnie herbicydów. Niektóre mieszaniny w oddziaływaniu z erytrocytami i roślinami wyższymi wykazywały aktywność wyższą niż poszczególne jej składniki.

Uzyskane wyniki przeprowadzonych badań można podsumować następująco:

1. Wykazano, że najwyższą aktywność hemolityczną posiadają związki acykliczne i pochodne fluorenu, zaś mniej aktywne są związki cykliczne zawierające pierścień cykloheksanowy. W obrębie zaś grupy najaktywniejsze są związki o najdłuższych łańcuchach alkilowych w podstawnikach znajdujących się przy atomach: węgla, azotu i fosforu.
2. Wykazano, że im większa jest aktywność hemolityczna badanych związków, tym większe zmiany, przy stężeniach nielitycznych (0,1 i 0,01 mM), wywołują one we właściwościach błony erytrocytów, zmieniając jej płynność oraz kształt i oporność osmotyczną krwinek.

3. Stwierdzono, że badane związki przy stężeniach nielitycznych (5 i 10 μM) zmieniają płynność błony erytrocytów w dwojaki sposób (usztynwiają ją lub upłynniają), zarówno w części hydrofilowej, jak i hydrofobowej. Zmiany w stopniu uporządkowania błony zależą od rodzaju związku, jego stężenia i od głębokości penetracji do błony.
4. Wykazano, że badane związki wbudowują się zarówno do zewnętrznej monowarstwy błony erytrocytów, indukując kształty echinocytów, jak i do warstwy wewnętrznej tworząc stomatocyty. Większość związków jednak tworzy echinocyty, koncentrując się głównie w warstwie zewnętrznej. Związki o najdłuższych łańcuchach przy atomach: węgla (AFa-6), azotu (AFc-3 i AFc-4) i fosforu (AFm-2 i AFm-3) dyfundują do wewnętrznej monowarstwy erytrocytów tworząc stomatocyty.
5. Wykazano, że związki posiadające większą aktywność w odniesieniu do modelowej błony erytrocytów wykazują również większy wpływ na inhibicję wzrostu hypokotyla ogórka i pszenicy oraz większy na kiełkowanie nasion gorczycy. W szczególności pochodne fluorenu w odniesieniu do inhibicji wzrostu roślin wykazały identyczną sekwencję aktywności, jak w odniesieniu do modelowej błony erytrocytów.
6. Stwierdzono, że aktywność niektórych mieszanin związków fosforoorganicznych z 2,4-D i FMG w odniesieniu do modelowej błony erytrocytów była wyższa niż aktywność pojedynczych jej składników (zjawisko synergizmu). Podobnie jak w odniesieniu do błony erytrocytów, wyższą aktywność w stosunku do roślin wyższych wykazano dla mieszanin pochodnych fluorenu z 2,4-D. Aktywność pozostałych mieszanin kształtowała się inaczej niż w odniesieniu do błony modelowej.

Wnioski z powyższych badań sugerują, że wysoką aktywność biologiczną posiadają związki o odpowiedniej części hydrofilowej, jak również posiadające odpowiednią strukturę części hydrofobowej związku. Część hydrofilową związków stanowią grupy aminowa i fosfonowa wraz z podstawnikami, zaś część hydrofobową tworzą łańcuchy alkilowe w podstawnikach przy atomie węgla dla związków acyklicznych oraz pierścienie dla związków cyklicznych i pochodnych fluorenu. Jak pokazują uzyskane wyniki najaktywniejszymi związkami są związki acykliczne nieposiadające pierścienia oraz pochodne fluorenu. Aktywność biologiczna związków w odniesieniu do błony modelowej dość dobrze koreluje z aktywnością w odniesieniu do roślin wyższych. Użyte w przeprowadzonych badaniach modelowych metody pomiarowe parametrów fizycznych błon erytrocytów pozwalają na wyciągnięcie jednoznacznych wniosków. Wyniki tych badań, które pokazują korelację między aktywnością badanych związków a ich strukturą, mogą być wykorzystane przy syntezie nowych związków tego typu, o optymalnej skuteczności, zgodnie z przeznaczeniem.

IX. Literatura

- Adam J.** (1998): (A Note on)² the shape of the erythrocyte. *Mathl. Comput. Modelling* 27, 73-77
- Akahroni A., Jóźwiak Z., Gabryelak T., Gondko R.** (1999): Effect of zinc (*Cyprinus carpio* L) erythrocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 123, 209-215
- Alves D., Campos A., Silva A.T.C., Fontanari J.F.** (2000): Group selection models in prebiotic evolution. *Physical Review E* 63, 011911
- Ambrosini A., Zolese G., Balercia G., Bertoli E., Amaldi G., Mantero F.** (2001): Laurdan fluorescence: a simple method to evaluate sperm plasma membrane alterations. *Fertility and Sterility* 76, 501-505
- Amrhein N., Johanning D., Schab J., Schulz A.** (1983): Biochemical basis for glyphosate-tolerance in bacterium and plant tissue culture. *FEBS* 157, 191-196
- Andrade C.T., Barros L.A.M., Lima M.C.P., Azero E.G.** (2004): Purification and characterization of human hemoglobin: effect of hemolysis conditions. *International Journal of Biological Macromolecules* 34, 233-240
- Arias E.** (2003): Sister chromatid exchange induction by the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in chick embryos. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 55, 338-343
- Ateeq B., Abul Farah M., Niamat M.A., Ahmad W.** (2002): Induction of micronuclei and erythrocyte alterations in the catfish *Calais batrachus* by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and butachlor. *Mutation Research* 518, 135-144
- Bandorowicz-Pikuła J.** (1995): Domains in biological membranes and their physiological importance. *Postępy Biochemii* 41, 247-255
- Bartosz G.** (2003): *Druga twarz tlenu*. PWN, Warszawa
- Baumann M.** (2002): Cell fusion generates an inhomogeneous distribution of elasticity and rigidity in plasma membranes. *Journal of Membrane Biology* 187, 27-35
- Baumeister W., Buse G., Deuticke B., Kuhn H.** (1981): Membrane proteins: analysis of molecular and supramolecular structure. *FEBS Letters* 131 (1), 1-6
- Bazzoni G., Rasia M.** (2001): Effect of tetracaine chlorhydrate on mechanical properties of erythrocyte membrane. *Blood Cells, Molecules and Diseases* 27, 391-398
- Beltran J., Gerritse R.G., Hernandez F.** (1998): Effect of flow rate on the adsorption and desorption of glyphosate, simazine and atrazine in columns of sandy soils. *European Journal of Soil Science* 49, 149-156
- Belzile A.S., Majerus S.L., Podeszinski C., Guillet G., Durst T., Arnason J.T.** (2000): Dillapiol derivatives as synergists: structure-activity relationship analysis. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 66, 33-40
- Benga G., Holmes R.P.** (1984): Interaction between components in biological membranes and their implications for membrane function. *Prog. Biophys.molec.Biol.* 43, 195-257
- Berenbaum M.C.** (1998): What is synergy? *Pharmacol Rev* 41, 93-141.

- Berezina T.L.**, Zeats S.B., Morgan C., Spillert Ch.R., Kamiyama M., Spolaric Z., Deitch E.A., Machiedo G.W. (2002): Influence of storage on red blood cell rheological properties. *Journal of Surgical Research* 102, 6-12
- Bernhardt I.**, Ellory J.C. (2003): *Red Cell Membrane Transport in Health and Disease*. Springer-Verlag Berlin-Heidelberg
- Bessis M.** (1977): La forme et la deformabilite des erythrocytes normaux et dans certaines anemies hemolytiques congenitales. *Nouvelle Revue Francaise d'Hematologie* 18, 75-94
- Białas W.**, Dryjańska A., Gomułkiewicz J. (2001): Effect of O₂/O₃ atmosphere on the rate of osmotic hemolysis of bovine erythrocytes in the presence of some antioxidants. *Toxicology in vitro* 15, 163-168
- Biochim. Biophys. Acta*, 982, 179-186
- Biziuk M.** (2001): *Pestycydy, występowanie, oznaczanie i unieszkodliwianie*, Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa
- Blasiak J.** (1995): Changes in membrane fluidity evoked by organophosphorous insecticide bromfeninfos and its methylated analogue. *Comp. Biochem. Physiol.* 110C, 15-21
- Blumel S.**, Gross M. (2001): Effect of pesticide mixtures on the predatory mite *Phytoseiulus persimilis* A.H. (Acarina, Phytoseiidae) in the laboratory. *J. Appl. Ent.* 125, 201-205
- Boesten J.** (2000): From laboratory to field: uses and limitations of pesticide behaviour models for the soil/plant system. *Weed Research* 40, 123-138
- Bogner P.**, Sipos K., Ludany A., Somogyi B., Miseta A. (2002): Steady-state volumes and metabolism independent osmotic adaptation in mammalian erythrocytes. *European Biophysics Journal* 31, 145-152
- Bolodon V.N.**, Krutko Yu V., Rozin V.V., Chernitskii Ye.A. (1994): Influence of the structure of erythrocyte membranes on the dose dependence of photohemolysis. *Biophysics* 41, 405-408
- Bonarska D.**, Kleszczyńska H., Sarapuk J (2002): Antioxidative Activity of some phenoxy and organophosphorous compounds. *Cellular&Molecular Biology Letters* 7, 929-935
- Bonarska D.**, Kleszczyńska H., Gancarz R., Sarapuk J. (2003 a): Interaction of some herbicide aminophosphonates with biological membrane. *Surfactants and dispersed systems in theory and practice* p. 337 (materiały konferencyjne)
- Bonarska D.**, Sarapuk J., Kleszczyńska H. (2003 b): Biological activity of new aminophosphonates. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 12/53, SI2, 17-19
- Boyer M. J.**, Horn I., Firestone R.A., Stecle-Norwood D. and Tannock I.F. (1993): pH dependently cytotoxicity of N-dodecylimidazole: a compound that acquires detergent properties under acidic conditions. *Br. J. Cancer* 67, 81-87
- Bradford M.** (1976): Rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254
- Bryszewska M.** (1983): Zastosowanie znaczników fluorescencyjnych do badania dynamicznych właściwości błon biologicznych. *Zagadnienia Biofizyki współczesnej* 8, 103-115
- Bryszewska M.**, Leyko W. (1983): Effect of insulin on human erythrocyte membrane fluidity in diabetes mellitus. *Diabetologia* 24, 311-313

- Bryszewska M.**, Koter M., Epand R.M. (1991): Effect of cholesterol sulphate on haemolysis of human erythrocytes. *Med. Sci. Res.* 19, 791-792
- Bukowska B.**, Reszka E., Duda W. (1998): Influence of phenoxyherbicides and their metabolites on the form of oxy- and deoxyhemoglobin of vertebrates. *Biochemistry and Molecular Biology International* 45, 47-59
- Bukowska B.**, Chajdys A., Duda W., Duchnowicz P. (2000): Catalase activity in human erythrocytes: effects of phenoxyherbicides and their metabolites. *Cell Biology International* 24, 705-711
- Bukowska B.**, Goszczyńska K., Duda W. (2003): Effect of 4-chloro-2-methylphenoxiacetic acid and 2,4-dimethylphenol on human erythrocytes. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 77, 92–98
- Bukowska B.**, Zatorska A. (2003): The prehemolytic changes in human erythrocytes treated with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). *Current Topics in Biophysics* 27, 11-15
- Bukowska B.** (2003): Effects of 2,4-D and its metabolite 2,4-dichlorophenol on antioxidant enzymes and level of glutathione in human erythrocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 135, 435-441
- Bukowska B.** (2004): 2,4,5-T and 2,4,5-TCP induce oxidative damage in human erythrocytes: the role glutathione. *Cell Biology International* 28, 557-563
- Bukowska B.**, Kowalska S. (2004): Phenol and catechol induce prehemolytic and hemolytic changes in human erythrocytes. *Toxicology Letters* 152, 73-84
- Bushra A.**, M. Abul farah, M. Niamat Ali, Waseem Ahmad (2002): Induction of mikronuklei and erythrocyte alterations in the catfish *Clarias batrachus* by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and butachlor. *Mutation Research* 518, 135-144
- Campbell L.D.**, Dwek R.A. (1984): Fluorescence. W: *Fluorescence in Biological Spectroscopy* 91-120. The Benjamin Cummings Publishing Company Inc. Menlo Park, London
- Charles J.M.**, Leeming N.M. (1998): Chronic dietary toxicity study on 2,4-dichlorophenoxybutyric acid in the dog. *Toxicological sciences* 46, 134-142
- Cho Yun-Seok**, Kahng Hyung-Yeel, Kim Chi-Kyung, Kukor Jerome J., Oh Kye-Heon (2002): Physiological and cellular responses of the 2,4-D degrading bacterium, *Burkholderia cepacia* YK-2, to the Phenoxyherbicides 2,4-D and 2,4,5-T. *Current Microbiology* 45, 415-422
- Chong P.**, Sugar I. (2002): Fluorescence studies of lipid regular distribution in membranes. *Chemistry and Physics of Lipids* 116, 153-175
- Chorbadjian R.**, Kogan M. (2002): Interaction between glyphosate and fluroxypyr improve mallow control. *Crop Protection* 21, 698-692
- Danieluk M.**, Hagerstrand H., Jezierska A., Jezierska J., Sikorski A.F. (1998): The effect of polyethylene glycol on some properties of the erythrocyte membrane. *Cellular&Molecular Biology Letters* 3, 133-143
- Dao M.**, Lim C.T., Suresh S. (2003): Mechanics of human red blood cell deformed by optical tweezers. *Journal of the Mechanics and Physics of Solids* 51, 2259-2280
- Deuticke B.** (1968): Transformation and restoration of biconcave shape of human erythrocytes induced by amphiphilic agents and changes of ionic environment. *Biochim. Biophys. Acta* 163, 494-500

- Deuticke B.** (1977): Properties and structural basis of simple diffusion pathways in the erythrocyte membrane. *Rev.Physiol.Biochem. Pharmacol.* Vol. 78, 2-79
- Devaux P.F.** (1988): Phospholipid flippases. *FEBS Letters* 234(1), 8-12
- Devaux P.F.** (1991): Static and Dynamic lipid asymmetry in cell membranes. *Biochemistry* 30, 1163-1173
- Devaux P.F.** (1992): Protein involvement in transmembrane lipid asymmetry. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 21, 417-439
- Devaux P.F.** (2000): Is lipid translocation involved during endo- and exocytosis? *Biochimie* 82, 497-509
- Devaux P.F., Fellmann P., Herve P.** (2002): Investigation on lipid asymmetry using lipid probes comparison between spin-labeled lipids and fluorescent lipids. *Chemistry and Physics of Lipids* 116, 115-134
- Dick R.E., Quinn J.P.** (1995): Control of glyphosate uptake and metabolism in *Pseudomonas* sp. 4ASW. *FEMS Microbiology Letters* 134, 177-182
- Dodge J.T., Mitchel C., Hanahan D.J.** (1963): The preparation and chemical characteristics of hemoglobin – free ghosts of erythrocytes. *Arch. Biochem. Biophys.*, 100, 119-130
- Dojlido J.R.** (1995): *Chemia wód powierzchniowych.* Wydawnictwo Ekonomia i Środowisko, Białystok
- Dołowy K., Szewczyk A., Piśula S.** (2003): *Błony biologiczne.* "Śląsk" Sp.z o.o. Wydawnictwo Naukowe, Katowice-Warszawa
- Domenech C.E., Machado de Domenech E.E., Balegno H.F.** (1997): Pesticide action and membrane fluidity. *Febs Letters* 74, 243-246
- Duchnowicz P., Koter M., Duda W.** (2002): Damage of erythrocyte by phenoxyacetic herbicides and their metabolites. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 74, 1-7
- Duchnowicz P., Koter M.** (2003): Damage to the erythrocyte membrane caused by chlorophenoxyacetic herbicides. *Cellular&Molecular Biology Letters*, 8, 25-33
- Dumas D., Muller S., Gouin F., Baros F., Viriot M-L, Stoltz J.F.** (1997): Membrane fluidity and oxygen diffusion in cholesterol-enriched erythrocyte membrane. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 341, 34-39
- Edidin M.** (1997): Lipid microdomains in cell surface membranes. *Current Opinion in Structural Biology* 7, 528-532
- Feron V.J., Groten J.P.** (2002): Toxicological evaluation of chemical mixtures. *Food and Chemical Toxicology* 40, 825-839
- Filkowski J., Besplug J., Burke P., Kovalchuk I., Kovalchuk O.** (2003): Genotoxicity of 2,4-D and dicamba revealed by transgenic *Arabidopsis thaliana* plants harboring recombination and point mutation markers. *Mutation Research* 542, 23-32
- Fitzmaurice G.** (2000): The meaning and interpretation of interaction. *Nutrition* 16, 313-314
- Forlani G., Mangiagalli A., Nielsen E., Suardi C.M.** (1999): Degradation of the phosphonate herbicide glyphosate in soil: evidence for possible involvement of unculturable microorganisms. *Soil Biology and Biochemistry* 31, 991-997
- Fumiyoshi Ishii, Yoshihide Nagasaka** (2004): Interaction between erythrocytes and free phospholipids as an emulsifying agent in fat emulsions or drug carrier emulsions for intravenous injections. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 37, 43-47

- Gabrielska J.**, Kleszczyńska H., Przestalski S. (1995): Protective effect of amphiphilic salts on the oxidation of lecithin liposomes. *Z. Naturforsch.*, 50c, 840-844
- Gabrielska J.**, Oszmiański J., Lamer-Zarawska E. (1997): Protective effect of plant flavonoids on the oxidation of lecithin liposomes. *Pharmazie*. 52, 170-172
- Gabrielska J.**, Soczyńska-Kordala M., Przestalski S. (2005): Antioxidative effect of kempferol and its equimolar mixture with phenyltin compounds on UV-irradiated liposome membranes. *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53, 76-83
- Gallet P.F.**, Zachowski A., Julien R., Fellmann P., Devaux P.F., Maftah A. (1999): Transbilayer movement and distribution of spin-labelled phospholipids in the inner mitochondrial membrane. *Biochimica et Biophysica Acta* 1418, 61-70
- Gancarz R.** (1997): Reakcja Kabaczniaka-Fieldsa synteza biologicznie aktywnych aminofosfonianów. *Prace Naukowe Instytutu Chemii Organicznej, Biochemii i Biotechnologii Politechniki Wrocławskiej* Nr 39
- Gedde M.M.**, Yang E., Huestis W.H. (1999): Resolution of the paradox of red cell shape changes in low and high pH. *Biochimica et Biophysica Acta* 1417, 246-253
- Gennis R.B.** (1989): *Biomembranes, Molecular Structure and Function*. Springer-Verlag
- Gessner P.K.** (1988): A straightforward method for study of drug interactions: an isobolographic analysis primer. *J. Am. Coll. Toxicol.* 7; 987-1012
- Gisi U.** (1996): Synergistic interaction of fungicides in mixtures. *Phytopathology* 86, 1273-1279
- Godin Ch.**, Caprani A. (1997): Effect of blood storage on erythrocyte/wall interactions: implications for surface charge and rigidity. *European Biophysical Journal* 26, 175-182
- Good W.**, Rose S.M. (1968): The kinetics of hemolysis of human erythrocytes in hypotonic solution of glucose. *Biochimica et Biophysica Acta* 163, 483-493
- Gordiyenko O.I.**, Linnik T.P., Gordiyenko E.O. (2004): Erythrocyte membrane permeability for series of diols. *Bioelectrochemistry* 62, 115-118
- Greek M.B.**, Hartley G.S., West T.F. (1987): *Chemical for Crop Improvement and Pest Management*, Pergamon Press,
- Gregg V.A.**, Reithmeier R.A.F. (1983): Effect of cholesterol on phosphate uptake by human red blood cells. *Febs Letters* 157, 159-164
- Grossman K.** (2000): Mode of action of auxin herbicides: a new ending to a long, drawn out story. *Trend in Plant Science* 5, 506-508
- Groten J.P.**, Feron V.J., Suhnel J. (2001): Toxicology of simple and complex mixtures. *Trends in Pharmacological Sciences* 22, 316-322
- Gwoździński K.** (1995): Paraquat-induced changes in the structure of erythrocyte membranes are not caused by lipid peroxidation. *Current Topic in Biophysics* 18, 126-131
- Haas Ch.N.**, Kersten S.P., Wright K., Frank M.J., Cidambi K. (1997): Generalization independent response model for toxic mixtures. *Chemosphere* 34, 699-710
- Haest C.W.M.**, Kamp D., Deuticke B. (1997): Transbilayer reorientation of phospholipid probes in the human erythrocyte membrane. Lessons from studies on electroporated and resealed cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 1325, 17-33
- Hagerstrand H.**, Isomaa B. (1989): Vesiculation induced by amphiphiles in erythrocytes.

- Hagerstrand H.**, Isomaa B. (1991): Amphiphile-induced antihaemolysis is not causally related to shape changes and vesiculation. *Chem. Biol. Interactions*, 79, 335-347
- Hagerstrand H.**, Isomaa B. (1992): Morphological characterization of exovesicles and endovesicles released from human erythrocytes following treatment with amphiphiles. *Biochim. Biophys. Acta*, 1109, 117-126
- Hamasaki T.**, Masumoto H., Sato T., Nagase H., Kito H. and Yoshioka Y. (1995): Estimation of hemolytic effects of various organotin compounds by structure-activity relationships. *Appl. Organomet. Chem.* 9, 95-104
- Hammond B.**, Dudek R., Lemen J., Nemeth M. (2004): Results of 13 week safety assurance study with rats fed grain from glyphosate tolerant corn. *Food and chemical Toxicology* 42, 1002-1014
- Hansen T.G.**, Sproge-Jakobsen U., Pedersen C.M., Olsen K.S., Kristensen S.R. (1998): Hemolysis following rapid experimental red blood cell transfusion. *Acta Anaesth. Scand.* 42, 57-62
- Harris F.M.**, Best K.B., Bell J.D. (2002): Use of Laurdan fluorescence intensity and polarization to distinguish between changes in membrane fluidity and phospholipid order. *Biochimica et Biophysica Acta* 1565, 123-128
- Haugland R.P.** (2002): Handbook of Fluorescent Probes and Research Products. Molecular Probes, 2002
- Hendrich A.B.**, Wesołowska O., Michalak K. (2001): Trifluoperazine induces domain formation in zwitterionic phosphatidylcholine but not in charged phosphatidylglycerol bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta* 1510, 414-425
- http://cellbio.utmb.edu/cellbio/membrane_intro.htm
- Huijbregts R.P.H.**, Tapalof L., Bankaitis V.A. (2000): Lipid Metabolism and Regulation of Membrane Trafficking. *Traffic* 1, 195-202
- Iglic A.**, Brumen M., Svetina S. (1996): Determination of the inner surface potential of erythrocyte membrane. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 43, 97-103
- Iglic A.**, Kralj-Iglic V., Hagerstrand (1998): Amphiphile induced echinocyte-spherocyte transformation of red blood cell shape. *Eur. Biophys. J.* 27, 335-339
- Iglic A.**, Veranic P., Jezernik K., Fosnric M., Kamin B., Hagerstrand H., Kralj-Iglic V. (2004): Spherocyte shape transformation and release of tubular nanovesicles in human erythrocytes. *Bioelectrochemistry* 62, 159-161
- Isomaa B.**, Hagerstrand H., Paatero G. (1987): Shape transformations induced by amphiphiles in erythrocytes. *Biochimica et Biophysica Acta* 899, 93-103
- Jabłoński A.** (1935): *Ueber den Mechanismus der Photolumineszenz Moleküle*, Academic Press, New York
- Kaestner L.** (2004): Red blood cell ghosts and intact red blood cells as complementary models in photodynamic cell research. *Bioelectrochemistry* 62, 123-126
- Kaioumova D.**, Kaioumov F., Opelz G., Susal C. (2001): Toxic effects of herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on lymphoid organs of the rat. *Chemosphere* 43, 801-805
- Kaiser R.D.**, London E. (1998): Location of diphenylhexatriene (DPH) and its derivatives within membranes: comparison of different fluorescence quenching analyses of membrane depth. *Biochemistry* 37, 8180-8190

- Kitagawa S.**, Matsubayashi M., Kotani K., Usui K., Kametani F. (1991): Asymmetry of membrane fluidity in lipid bilayer of blood platelets: fluorescence study with diphenylhexatriene and analogs. *J. Membrane Biol.* 119, 221-227
- Kleszczyńska H.**, Łuczyński J., Witek S., Przestalski S. (1997): Effect of some lysosomotropic substances on erythrocytes membrane. *Polish J. Environ. Studies*, 6, 21-24
- Kleszczyńska H.** and Sarapuk J. (1998 a). The role of counterions in the protective action of some antioxidants in the process of red cell oxidation. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 46 (2) 385-390
- Kleszczyńska H.**, Oświęcimska M., Witek S., Przestalski S. (1998 b): Inhibition of lipid peroxidation in the erythrocyte membrane by quaternary morpholinium salts with antioxidant function. *Z. Naturforsch.*, 53c, 425-430
- Kleszczyńska H.**, Łuczyński J., Witek S., Przestalski S. (1998 c): Hemolytic activity of aminoethyl-dodecanoates. *Z. Naturforsch.*, 53c, 101-106
- Kleszczyńska H.** (1999): Toksyczność hemolityczna niektórych związków biologicznie aktywnych. *Zeszyty Naukowe*, 355, 1-116, Akademii Rolniczej we Wrocławiu.
- Kleszczyńska H.**, Bielecki K., Sarapuk J., Dziamska A., Przestalski S. (2000 a): Influence of triphenyllead chloride on biological and model membranes. *Z. Naturforsch.* 55c, 764-769
- Kleszczyńska H.**, Sarapuk J. and Różycka-Roszak B. (2000 b). Modification of mechanical properties of model membranes by some bifunctional surfactants. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 5, 67-73
- Kleszczyńska H.**, Sarapuk J., Bielecki K., Grześ E., Witek S. (2000 c): Physiological activity of some organophosphorous compounds and their effects on the physico-chemical properties of model membranes. *Folia Microbiol* 45, 204-206
- Kleszczyńska H.** and Sarapuk J. (2001 a): New Aminophosphonates with antioxidative activity. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 6, 83-91
- Kleszczyńska H.**, Bonarska D., Sarapuk J., Bielecki K. (2001 b): Physiological activity of some organophosphorous compounds and their influence on mechanical properties of erythrocytes. *Z. Naturforsch.* 56c, 999-1002
- Kleszczyńska H.**, Sarapuk J., Bonarska D. (2001 c): The hemolytic toxicity of some new aminophosphonates. *Cellular&Molecular Biology Letters* 6, 271-275
- Kleszczyńska H.**, Bonarska D., Bielecki K., Sarapuk J. (2003): The hemolytic and physiological activities of mixtures of some phenoxy and organophosphorous herbicides. *Cellular&Molecular Biology Letters* 8, 55-61
- Klingen S.P.** (2002): Wells in focus. Red blood cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 34, 1513-1518
- Komorowska M.**, Cuissot A., Czarnoleski A., Białas W. (2002): Erythrocyte response to near-infrared radiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 68, 93-100
- Kondo T.** (1976): Mechanism of hemolysis by surface active agents. *Adv. Colloid Interface Sci.* 6, 139-172
- Kortenkamp A.**, Altenburger R. (1998): Synergisms with mixtures of xenoestrogens: A reevaluation using the method of isoboles. *The Science of the Total Environment* 221, 59-73

- Krasnowska E.K.**, Bagatolli L.A., Gratton E., Parasissi T. (2001): Surface properties of cholesterol-containing membranes detected by Prodan fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta* 1511, 330-340
- Kuczera J.**, Kleszczyńska H., Przestalski S., Witek S. (1982). Influence of some fungicides on erythrocyte and lecithin membrane. *Esna Newsletter*, Brno Czechslovakia WG 7, 21-28
- Kuczera J.**, Gabrielska J., Kral T.E., Przestalski S. (1997): A synergistic effect of select organotin compounds and ionic surfactants on liposome membranes. *Appl. Organomet. Chem.*, 11, 591-600
- Kumari A.**, Tandon J., Singh R. (1993): Antimicrobial effects of newly synthesized organotin (IV) and organolead (IV) derivatives. *Appl. Organomet. Chem.*, 7, 373-380
- Kuypers F.A.**, Linde-Sibenius Trip M., Roelofsen B., Op den Kamp J.A.F., Tanner M.J.A., Anstee D.J. (1985): The phospholipids organization in the membranes of McLeod and Leach phenotype erythrocytes. *FEBS Letters* 184, 20-24
- Lachowicz T. M.**, Witek S., Łuczyński J., Witkowska R., Kleszczyńska H., Przestalski S. (1997). N-Substituted Aminoethylesters of Fatty Acid as Lysosomotropic Substances. *Folia Microbiol.* 42, 231-232
- Lakowicz J.R.** (1999): Fluorescence polarization. W: Principles of fluorescence spectroscopy, Kluwer Academic/Plenum Press. New York, London.
- Lang-Ming Chi**, Wen-Guey Wu (1990): Effective bilayer expansion and erythrocyte shape change induced by monopalmitoyl phosphatidylcholine. *Biophys.J* 57, 1225-1232
- Langner M.**, Sarapuk J. (1997): Nowe spojrzenie na dwuwarstwę lipidową. *Zeszyty Naukowe Akademii Rolniczej we Wrocławiu* 316, 137-158
- Leifert W.R.**, Jahangiri A., McMurchie E.J. (2000): Membrane fluidity changes are associated with the antiarrhythmic effects of docosahexaenoic acid in adult rat cardiomyocytes. *J. Nutr. Biochem* 11, 38-44
- Lentz B.R.** (1988): Membrane "Fluidity" from fluorescence anisotropy measurements W: Spectroscopic Membrane Probes. (red. Leslie M. Loew) CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida., vol.1, 13-41
- Lentz B.R.** (1989): Membrane "fluidity" as detected by diphenylhexatriene probes. *Chemistry and Physics of Lipids* 50, 171-190
- Lentz B.R.** (1993): Use of fluorescent probes to monitor molecular order and motions within liposome bilayers. *Chemistry and Physics of Lipids* 64, 99-116
- Leśniak W.**, Porębska Z. (1993): Budowa i funkcja błony komórkowej. *Polskie Towarzystwo Biochemiczne Warszawa*.
- Lipowsky R.**, Sackmann E. (1995 a): Structure and Dynamics of Membranes. Morphology of Vesicles. Elsevier Science B.V., chapter 8
- Lipowsky R.**, Sackmann E. (1995 b): Structure and Dynamics of Membranes. Interaction in membrane assemblies. Elsevier Science B.V., chapter 13
- Lipowsky R.**, Sackmann E. (1995 c): Structure and Dynamics of Membranes. The evolution of membranes. Elsevier Science B.V., chapter 2
- Loew L.M.** (1988): Spectroscopic membrane probes. CRC Press. Inc. Boca Raton, Florida
- Loewe S.**, Muischnek H. (1926): Über Kombinationswirkungen. 1.Mittelung: Hilfsmittel der Fragestellung. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Exp Pathol Pharmacol*, 114; 313-326

- Malich G.**, Markovic B., Winder C. (1998): Human cell line toxicity of binary and ternary chemical mixtures in comparison to individual toxic effects of their components. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 35, 370-376
- Marczak A.**, Łubgan D., Robak T., Józwiak Z. (2004): Influence of 2-chlorodeoxyadenosine (cladribine) on human erythrocytes. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 36, 1645-1654
- Mathur J.**, Hulskamp M. (2001): Cell growth: How to grow and where to grow. *Current Biology* 11, R402-R404
- Mazeron P.**, Muller S., Azouzi H.El. (1997): On intensity reinforcement in small-angle light scattering patterns of erythrocytes under shear. *European Biophysic Journal* 26, 247-252
- McMullen T.P.W.**, Lewis R.N.A.H, McElhaney R.N. (2004): Cholesterol-phospholipid interaction, the liquid-ordered phase and lipid rafts in model and biological membranes. *Current Options in Colloid and Interface Science* 8, 459-468
- Mehmood Z.**, Williamson M.P., Kelly D.E., Kelly S.L. (1996): Human cytochrome P450 3A4 is involved in the biotransformation of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2, 397-401
- Michalak K.** (1996): Zastosowanie fluorescencji naturalnych chromoforów białkowych oraz wybranych znaczników fluorescencyjnych w badaniach oddziaływań peryferyjnych białek błon komórkowych z lipidami. *Akademia Medyczna we Wrocławiu*, 11, 1996
- Moody R.P.**, Nadeau B. (1996): In vitro dermal absorption of two commercial formulations of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid dimethylamine (2,4-D amine) in rat, guinea pig and human skin. *Toxicology in Vitro* 11, 251-262
- Moore D.J.**, Gioioso S., Sills R.H., Mendelshon R. (1999): Some relationships between membrane phospholipids domains, conformational order, and cell shape in intact human erythrocytes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1415, 342-348
- Mosior M.**, Gomulkiwicz J. (1989): Effect of phosphate ions on heat-induced changes of osmotic properties of bovine erythrocytes. *Studia Biophysica* 133, 199-208
- Namieśnik J.**, Jaśkowski J. (1995): *Zarys ekotoksykologii*. EKO-Pharma, Gdańsk
- Norma Branzowa**, Agrotechnika (1983): Testy biologiczne, Ocena aktywności biologicznej herbicydów metodą testu hamowania kiełkowania gorczycy. BN-83/9180-26
- O'Reily M.**, McDonnell L., O'Mullane J. (2001): Quantification of red blood cells using atomic force microscopy. *Ultramicroscopy* 86, 107-112
- Obsil T.**, Amler E., Obsilova V., Pavlicek Z. (1999): Effect of aminophospholipid glycation on order parameter and hydration of phospholipid bilayer. *Biophysicl Chemistry* 80, 165-177
- Oruc E.O.**, Uner N. (2000 a): Combined effects of 2,4-D and azinphosmethyl on antioxidant enzymes and lipid peroxidation in liver of *Oreochromis niloticus*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 127, 291-296
- Oruc E.O.**, Uner N. (2000 b): Effectsn of 2,4-Diamin on some parameters of protein and carbohydrate metabolisms in the serum, muscle and liver of *Cyprinus carpio*. *Environmental Pollution* 105, 267-272
- Pape-Lindstrom P. A.** and Lydy M. J. (1997): Synergistic toxicity of atrazine and organophosphate insecticides contravenes the response addition mixture model. *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 2415-2420.

- Parasassi T.**, Stefano M., Loiero M., Ravagnan G., Gratton E. (1994): Influence of cholesterol on phospholipid bilayers phase domains as detected by Laurdan fluorescence. *Biophysical Journal* 66, 120-132
- Parasassi T.**, Giusti A.M., Raimondi M., Ravagnan G., Saporita O., Gratton E. (1995): Cholesterol protects the phospholipid bilayer from oxidative damage. *Free Radical Biology & Medicine* 19, 511-516
- Parasassi T.**, Weiming Yu, Durbin D., Kuriashkina L., Gratton E., Maeda N., Ursini F. (2000): Two-photon microscopy of aorta fibers shows proteolysis induced by LDL hydroperoxides. *Free Radical Biology & Medicine* 28, 1589-1597
- Pasternak C.A.** (1985): Cell surface. *Interdisciplinary science reviews* 10, 42-55
- Pawelski S.** (1977): Diagnostyka laboratoryjna w hematologii, 76-82, PZWL, Warszawa
- Pawlaczyk I.**, Kleszczyńska H., Bonarska D., Czerchawski L., and Gancarz R. (2003) Natural oligosaccharides with anticoagulant activity and their interactions with model biological membranes. *Polish Chemical Society, Suruz, Wrocław.* 333-336
- Pieniążek D.**, Bukowska B., Duda W. (2004): Comparison of effect of Roundup Ultra 360 SL pesticide and its active compound glyphosate on human erythrocytes. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 79, 58-63
- Pomorski T.**, Hrafnisdottir S., Devaux P.F., van Meer G. (2001): Lipid distribution and transport across cellular membranes. *Cell&Developmental Biology* 12, 139-148
- Ponder E.** (1948): Hemolysis and related phenomena. Churchill J.A., LTD, London
- Przestalski S.** (1988): Biofizyka błon. *Kosmos* 27, 177-195
- Przestalski S.**, Kuczera J., Gabrielska J., Schara M., Witek S., Żyłka R. (1993): Interaction between lipid membranes and quaternary ammonium salts. *Periodicum Biologorum* 85, 116-120
- Przestalski S.**, Hładyszowski J., Kuczera J., Różycka-Roszak B., Trela Z., Chojnicki H., Witek S., Fisić E. (1996): Interaction between model membranes and new class of surfactants with antioxidant function. *Biophysical Journal* 70, 2203-2211
- Przestalski S.**, Kuczera J., Kleszczyńska H., Gabrielska J., Sarapuk J., Hładyszowski J., Kral T., Trela Z. (1997): Wpływ organicznych związków cyny i ołowiu na błony biologiczne. *Kosmos*, 46, 185-192
- Pułaski Ł.** (1995): Flipazy – białka transportujące fosfolipidy. *Postępy biochemii* 41, 131-138
- Rasia M.**, Bollini A. (1998): Red blood cell shape as a function of medium's ionic strength and pH. *Biochimica et Biophysica Acta* 1372, 198-204
- Raval P.J.**, Carter D.P., Fairbanks G. (1989) Relationship of hemolysis buffer structure, pH and ionic strength to spontaneous contour smoothing of isolated erythrocyte membranes. *Biochim. Biophys Acta* 983, 230-240
- Rejmer P.** (1997): Podstawy ekotoksykologii. Wydawnictwo Ekoinżyniera. Lublin
- Repina S.V.**, Nardid O.A., Marchenko V.S., Shilo A.V. (2004): Temperature-dependent changes in erythrocytes' cytosol state during natural and artificial hypobiosis. *Bioelectrochemistry* 62, 187-190
- Rosso S.B.**, Gonzalez M., Bagatolli L.A., Duffard R.O., Fidelio G.D. (1998): Evidence of strong interaction of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid herbicide with human serum albumin. *Life Sciences* 63, 2343-2351

- Roy G.**, Bernatchez G., Sauve R. (1998): Halide and alkyl phenols block volume-sensitive chloride channels in human glial cells (U-138MG). *J. Membrane Biol.* 162,191-200
- Sackmann E.** (1995): Structure and Dynamics of Membranes. Biological Membranes architecture and function. Elsevier Science B.V., chapter 1.
- Saenz M.E.**, Di Marzio W.D., Alberdi J.L., Tortorelli M.del Carmen (1997): Effects of technical grade and a commercial formulation of glyphosate on algal population growth. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 59, 638-644
- Sarapuk J.** (2000): Bifunctional surfactants - their potential application as pesticides. *Int. Agrophys.* 14, 319-325
- Sarapuk J.**, Kleszczyńska H., Radecka H., Oświęcimska M. (2000). Potential pesticide efficiency of new bifunctional surfactants. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 5, 349-356
- Sarapuk J.**, Bonarska D., Kleszczyńska H. (2003): Biological activity of binary mixtures of 2,4-D with some aminophosphonates. *Journal of Applied Biomedicine* 1, 169-173
- Sato T.**, Masumoto H., Nagase H., Kito H., Niikawa M. (1997): Relationship between hemolytic toxicity and signal intensity of various organotin compounds by a spin-labeling technique. *Appl. Organomet. Chem.*, 11,231-235
- Sawhney A.K.**, Johal M.S. (2000): Erythrocyte alternations induced by malathion in *Channa punctatus* (Bloch). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 64, 398-405
- Scheffer L.**, Bitler A., Ben-Jacob E., Korenstein R. (2001): Atomic force pulling: probing the local elasticity of the cell membrane. *European Biophysic Journal* 30, 83-90
- Schneider E.**, Haest C.W.M., Deuticke B. (1986): Transbilayer reorientation of platelet-activating factor in the erythrocyte membrane. *FEBS Letters* 198 (2), 311-314
- Schrier S.L.**, Zachowski A., Herve P., Kader J.C., Devaux P.F. (1992): Transmembrane redistribution of phospholipids of human red membrane during hypotonic hemolysis. *Biochimica et Biophysica Acta* 1105, 170-176
- Schroit A.J.**, Zwaal R.F.A. (1991): Transbilayer movement of phospholipids in red cell and platelet membranes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1071, 313-329
- Schwarz S.**, Deuticke B., Haest C.W.M. (1999 a): Passive transmembrane redistribution of phospholipids as a determinant of erythrocyte shape change. *Studies on electroporated cells. Mol. Membr. Biol.* 16, 247-255
- Schwarz S.**, Haest C.W.M., Deuticke B. (1999 b): Extensive electroporation abolishes experimentally induces shape transformations of erythrocytes: a consequence of phospholipid symmetrization? *Biochimica et Biophysica Acta* 1421, 361-379
- Sheetz M.P.**, Singer S.J. (1974): Biological membranes as bilayer couples. A molecular mechanism of drug-erythrocyte interactions. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 71, 4457-4461
- Sheetz M.P.**, Dai J. (1996): Modulation of membrane dynamics and cell motility by membrane tension. *Trends in Cell Biology* 6, 85-89
- Shinitzky M.**, Barenholz Y. (1978): Fluidity parameters of lipid regions determined by fluorescence polarization. *Biochimica et Biophysica Acta* 515, 367-394
- Sikorski A.F.**, Diakowski W., Kuczek M. (1993): Szkielet błony erytrocytu. *Postępy biologii komórki* 20, 93-110

- Silva C.M.M.**, Madeira V.M.C., Almeida L.M., Custodio J.B.A. (2000): Hemolysis of human induced by tamoxifen is related to disruption of membrane structure. *Biochimica et Biophysica Acta* 1464, 49-61
- Singh K.**, Singh D.K. (2000): Effect of different combinations of MGK-264 or piperonyl butoxide with plant-derived molluscicides on snail reproduction. *Arch. Environ. Contam. Toxicol* 38, 182-190
- Skrabka H.**, Jaskulska E. (1987 a): An Evaluation of the physiological activity of 9-amine-fluorene phosphonic acid derivatives. *Acta Agrobotanica* 40, 53-57
- Skrabka H.**, Jaskulska E. (1987 b): The interaction of 9-amine-9-fluorene phosphonic acid derivatives (new morphactins) with some herbicides in toxicity towards *Spirodela*. *Acta Agrobotanica* 40, 59-63
- Solomon E.P.**, Berg L.R., Martin D.W., Villee C.A. (1996): *Biologia, Mulico Oficyna Wydawnicza*, Warszawa 1996
- Song L.Y.**, Ankong Q.F., Baldwin J.M., O'Reilly R., Lucy J.A. (1993): Divalent cations phospholipids asymmetry and osmotic swelling in electrically-induced lysis, cell fusion and giant cell formation with human erythrocytes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1148, 30-38
- Sterling T.M.**, Hall J.Ch. (1997): Mechanism of action of natural auxins and the auxinic herbicides. *Herbicide activity: Toxicology, Biochemistry and molecular Biology*, IOS Press. 1997
- Stryer L.** (1997): *Biochemia*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 761- 787
- Suwalsky M.**, Benites M., Villena F., Aguilar F., Sotomayor C.P. (1996): Interaction of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) with cell and model membranes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1285, 267-276
- Suwalsky M.**, Benites M., Villena F., Aguilar F., Sotomayor C.P. (1997): The organochlorine pesticide heptachlor disrupts the structure of model and cell membranes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1326, 115-123
- Suwalsky M.**, Norris B., Villena F., Benites M., Quevedo L. (1998 a): The organochlorine herbicide chloridazon interacts with cell membranes. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 120, 29-15
- Suwalsky M.**, Rodriguez C., Villena F., Aguilar F., Sotomayor C.P. (1998 b): The organochlorine pesticide lindane interacts with human erythrocyte membrane. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 62, 87-95
- Suwalsky M.**, Quevedo L., Norris B., Benites M. (1999): Toxic action of the herbicide 2,4-D on neuroepithelial synapse and on the nonstimulated skin of the frog *Caudiverbera caudiverbera*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 62, 570-577
- Suwalsky M.**, Benites M., Norris B., Sotomayor C.P. (2000 a): Toxic effects of the fungicide benomyl on cell membranes. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 120, 111-119
- Suwalsky M.**, Ungerer B., Villena F., Cuevas F., Sotomayor C.P. (2000 b): HgCl₂ disrupt the structures of the human erythrocyte membrane and model phospholipid bilayers. *Journal of Inorganic Biochemistry* 81, 267-273
- Suwalsky M.**, Ramos P., Villena F., Cardenas H., Norris B., Cuevas F., Sotomayor C.P. (2001): The organophosphorous insecticide parathion changes properties of natural and model membranes. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 70, 74-85

- Suwalsky M.**, Schneider C., Villena F., Norris B., Cardenas H., Cuevas F., Sotomayor C.P. (2002): Structural effects of the local anesthetic bupivacaine hydrochloride on the human erythrocyte membrane and molecular models. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 29, 14-23
- Suwalsky M.**, Villena F., Norris B., Cuevas F., Sotomayor C.P., Zatta C.P. (2003): Effects of lead on the human erythrocyte membrane and molecular models. *Journal of Inorganic Biochemistry* 97, 308-313
- Suwalsky M.**, Schneider C., Villena F., Norris B., Cardenas H., Cuevas F., Sotomayor C.P. (2004): Effects of the local anesthetic benocaine on the human erythrocyte membrane and molecular models. *Biophysical Chemistry* 109, 189-199
- Svetina S.**, Kuzman D., Waugh R.E., Ziherl P., Zeks B. (2004): The cooperative role of membrane skeleton and bilayer in the mechanical behaviour of red blood cells. *Bioelectrochemistry* 62, 107-113
- Szarek J.**, Siwicki A., Andrzejewska A., Terech-Majewska E., Banaszkiewicz T. (2000): Effects of herbicide RoundupTM on the ultrastructural pattern of hepatocytes in carp (*Cyprinus carpio*). *Marine Environmental Research* 50, 263-266
- Szawrocka A.**, Joźwiak Z. (1999): The effect of daunorubicin and glutaraldehyde treatment on the structure of erythrocyte membrane. *International Journal of Pharmaceutics* 181, 117-123
- Szweykowska A.** (2000): *Fizjologia Roślin*. Wydawnictwo Naukowe UAM, Poznań
- Tachev K.D.**, Danov K.D., Krachevsky P.A. (2004): On the mechanism of stomatocyte-echinocyte transformations of red blood cells: experiment and theoretical model. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 34, 123-140
- Teti D.**, Venza I., Crupi M., Busa M., Loddo S., Romano L. (2002): Anion transport in normal erythrocytes, sickle red cells, and ghosts in relation to hemoglobins and magnesium. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 403, 149-154
- Trela Z.**, Kleszczyńska H. and Sarapuk J. (2001): Physiological and Hemolytic Toxicity of Some Aminophosphonates. *Z. Naturforsch.* 53c, 838-842
- Tripathi A.M.**, Agarwal R.A. (1997): Synergism in tertiary mixtures of pesticides. *Chemosphere* 35, 2365-2374
- Tripathi A.M.**, Agarwal R.A. (1998): Molluscicidal and anti-AchE activity of tertiary mixtures of pesticides. *Arch. Environ. Contam. Toxicol* 34, 271-274
- Vareesangthip K.**, Nimmannit S., Chuawattana D., Mingkam S., Haniakorn P., Ong-Aj-Yooth L. (2001): Impairment of erythrocyte membrane fluidity in cyclosporine-treated renal transplant patients. *Transplantation Proceedings* 33, 1198-1200
- Videira R.A.**, Antunes-Madeira M.C., Lopes V.I.C.F., Madeira V.M.C. (2001): Changes induced by malathion, methylparathion and parathion on membrane lipid physicochemical properties correlate with their toxicity. *Biochimica et Biophysica Acta* 1511, 360-368
- Vinardell M.P.**, Infante M.R. (1999): The relationship between the chain length of non-ionic surfactants and their hemolytic action on human erythrocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 124, 117-120
- Vranić-Manduscić V.**, Subota V., Savovski K., Medić L., Dramićanin T., Jozanov-Stankov O., Popov-Celeketić D., Jokanović M., Dimitrijević B. (2004): Erythrocytotoxicity of tiazofurin in vivo and in vitro detected by scanning probe microscopy. *Toxicology Letters* 146, 275-284

- Weaver L.M.**, Herrmann K.M. (1997): Dynamics of the shikimate pathway in plants. Trends in Plant Science reviews 2, 346-350
- Weng X.**, Cloutier G., Bibarot P., Durand L.G. (1996): Comparison and simulation of different levels of erythrocyte aggregation with pig, horse, sheep, calf and normal human blood. Biorhology 33, 365-377
- White-Stevens R.** (1977): Pestycydy w środowisku. Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, Warszawa
- Williams G.M.**, Kroes R., Munro I.C. (2000): Regulatory Toxicology and Pharmacology 31, 117-165
- Wong P.** (1999): A basis of echinocytosis and stomatocytosis in the disc-sphere transformations of the erythrocytes. J. theor. Biol. 196, 343-361
- Wong P.K.** (2000): Effect of 2,4-D, glyphosate and paraquat on growth, photosynthesis and chlorophyll-a synthesis of *Scenedesmus quadricauda* Berb 614. Chemosphere 41, 177-182
- Wong P.** (2004): A hypothesis on the role of the electrical charge of haemoglobin in regulating the erythrocyte shape. Medical Hypotheses 62, 124-129
- Yeagle P.L.**, Lee A.G. (2002): Membrane protein structure. Biochimica et Biophysica Acta 1565, 143
- Zaets S.B.**, Berezina T.L., Da-Zhong Xu, Qi Lu, Ricci J., Cohen D., Ananthakrishnan P., Deitch E.A., Machiedo G.W. (2003): Burn-induced red blood cell deformability and shape changes are modulated by sex hormones. The American Journal of Surgery 186, 540-546
- Zakrzewski S.F.** (2000): Podstawy toksykologii środowiska. PWN, Warszawa
- Zavodnik I.B.**, Lapshina E.A., Zavodnik L.B., Bartosz G., Soszyński M., Bryszewska M. (2001) : Hypochlorous acid damages erythrocyte membrane proteins and alters lipid bilayer structure and fluidity. Free Radical Biology & Medicine 30, 363-369
- Zeljezic D.**, Garaj-Vrhovac V. (2004): Chromosomal aberrations, micronuclei and nuclear buds induced in human lymphocytes by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid pesticide formulation. Toxicology 200, 39-47
- Ziegler H.L.**, Franzyk H., Sairafianpour M., Tabatabai M., Tehrani M.D., Bagherzadeh K., Hagerstrand H., Staerk D., Jaroszewski J.W. (2004): Erythrocyte membrane modifying agents and the inhibition of *Plasmodium falciparum* growth: structure-activity relationships for betulinic acid analogues. Bioorganic & Medical Chemistry 12, 1190127
- Zimmermann U.**, Pilwat G., Holzapfel C., Rosenheck K. (1976): Electrical hemolysis of human and bovine red blood cells. J. Membrane Biol. 30, 135-152