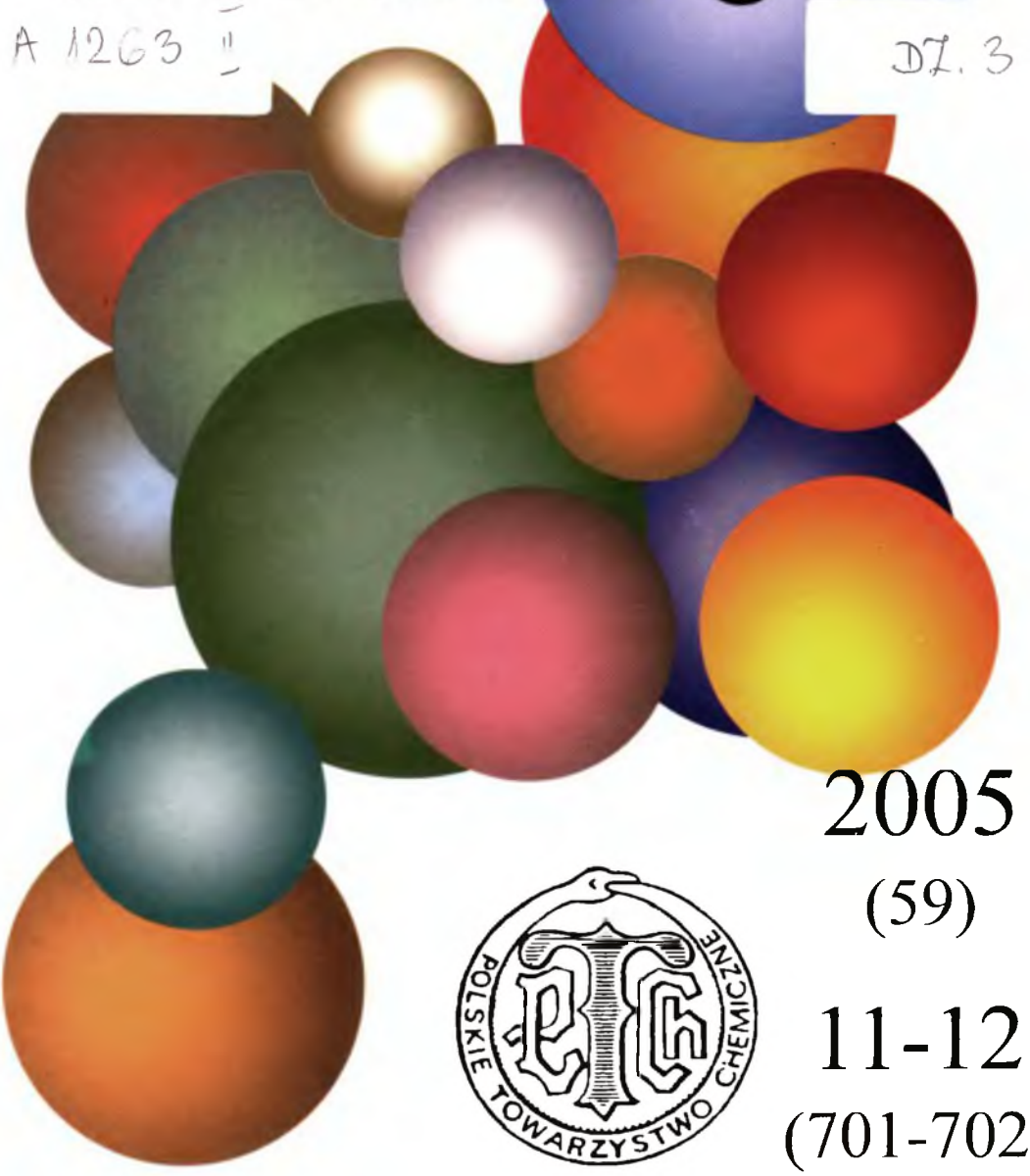
WIADOMOŚCI *chemiczne*

A 1263 II

DZ. 3



2005

(59)

11-12

(701-702)

POLSKIE TOWARZYSTWO CHEMICZNE

CZASOPISMO
POLSKIEGO TOWARZYSTWA CHEMICZNEGO

Publikacja dotowana przez KBN

RADA REDAKCYJNA

RYSZARD ADAMIAK, JERZY BŁAŻEJOWSKI, JÓZEF CEYNOWA, JACEK GAWROŃSKI, JACEK KIJEŃSKI, TADEUSZ M. KRYGOWSKI, JACEK MŁOCHOWSKI, PIOTR PANETH, LEONARD M. PRONIEWICZ, WŁADYSŁAW RUDZIŃSKI, STANISŁAW SŁOMKOWSKI, JAN ZAWADIAK

KOMITET REDAKCYJNY

BOGDAN BURCZYK, JERZY P. HAWRANEK, ADAM JEZIERSKI, ADOLF KISZA, LUDWIK KOMOROWSKI, ZDZISŁAW LATAJKA, PRZEMYSŁAW MASTALERZ, IGNACY Z. SIEMION, MIROSŁAW SOROKA, MARIA SUSZYŃSKA

REDAKTOR NACZELNY

JÓZEF J. ZIÓŁKOWSKI

SEKRETARZ REDAKCJI

KRYSTYNA MARKSOWA

Korespondencję należy kierować pod adresem:

Redakcja „Wiadomości Chemicznych"
ul. F. Joliot-Curie 14, 50-383 Wrocław
tel.: 071 375 73 89, tel./fax: 071 322 14 06
e-mail: wchem@wchuwr.chem.uni.wroc.pl

INTERNET (English abstracts) http://www.chem.uni.wroc.pl/wiadchem.htm

„Wiadomości Chemiczne" są wydawane w ramach serii *Acta Universitatis Wratislaviensis*

© Copyright by Redakcja „Wiadomości Chemicznych", Wrocław 2005

ISSN 83-2292084-9

Maszynopis niniejszego numeru przekazano Wydawcy w listopadzie 2005

Przygotowanie do druku i druk:
Firma Wydawnicza K2, al. Stanów Zjednoczonych 51, 04-026 Warszawa
tel.: 022 517 78 12, fax: 022 517 78 11, e-mail k2@druk-k2.pl

WIADOMOŚCI 2005, 59, 11-12
chemiczne PL ISSN 0043-5104

NARZĘDZIA CHEMII KOMBINATORYCZNEJ. CZ 3. REAKCJE W SYNTEZIE ORGANICZNEJ NA FAZIE STAŁEJ

TOOLS FOR COMBINATORIAL CHEMISTRY. PART 3. REACTION IN SOLID PHASE ORGANIC SYNTHESIS

Ryszard Łaźny, Małgorzata Łapińska, Michał Sienkiewicz

Instytut Chemii, Uniwersytet w Białymstoku
ul. Hurtowa 1, 15-399 Białystok

Abstract
Spis skrótów i akronimów
Wstęp
1. Transformacje grup funkcyjnych na fazie stałej. 1.1. Transformacje grupy hydroksylowej. 1.1.1. Otrzymywanie halogenków. 1.1.2. Otrzymywanie eterów. 1.1.3. Otrzymywanie estrów. 1.1.4. Otrzymywanie tioli i amin. 1.2. Transformacje halogenków. 1.2.1. Otrzymywanie eterów. 1.2.2. Otrzymywanie estrów. 1.2.3. Otrzymywanie amin. 1.2.4. Otrzymywanie tioli. 1.2.5. Otrzymywanie fosfin. 1.3. Transformacje grupy eterowej. 1.3.1. Otrzymywanie alkoholi. 1.3.2. Otrzymywanie amin. 1.3.3. Otrzymywanie halogenków. 1.4. Transformacja grupy aminowej. 1.4.1. Otrzymywanie alkoholi. 1.5. Reakcje utlenienia i redukcji. 1.5.1. Reakcje utlenienia alkoholi, aldehydów i ketonów. 1.5.2. Reakcje redukcji aldehydów i ketonów. 1.5.3. Reakcje redukcji kwasów karboksylowych i estrów. 1.5.4. Reakcje redukcji grupy nitrowej i nitrozowej. 1.6. Transformacje pochodnych kwasów karboksylowych. 1.6.1. Otrzymywanie amidów. 1.6.2. Otrzymywanie peptydów. 1.6.3. Otrzymywanie peptoidów. 1.7. Otrzymywanie oligonukleotydów. 1.8. Otrzymywanie oligosacharydów. 1.9. Otrzymywanie amin i poliamin.
2. Reakcje tworzenia wiązań węgiel–węgiel na fazie stałej. 2.1. Reakcja Mannicha. 2.2. Reakcja Michaela. 2.3. Reakcja aldolowa. 2.4. Reakcja addycji polarnych związków metaloorganicznych do wiązania karbonylowego. 2.5. Reakcja Hecka. 2.6. Reakcja Suzuki. 2.7. Reakcja Stillego. 2.8. Reakcja Sonogashiry. 2.9. Reakcja Wittiga. 2.10. Reakcja Hornera-Wadswortha-Emmonsa. 2.11. Reakcje metatezy. 2.12. Reakcje alkilowania ketonów, diketonów, estrów i amidów. 2.13. Reakcje acylowania arenów i ketonów. 2.14. Otrzymywanie związków cyklicznych, reakcja Dielsa-Aldera.
3. Reakcje wieloskładnikowe (MCRs) na fazie stałej. 3.1. Reakcja Hantzscha. 3.2. Reakcja Baylisa-Hillmana. 3.3. Reakcja Ugiego (4CC)
Podsumowanie
Piśmiennictwo cytowane

Dr Ryszard Łaźny jest absolwentem Filii Uniwersytetu Warszawskiego w Białymstoku. Studia doktoranckie w University of Saskatchewan w Kanadzie ukończył w 1996 r. pod kierunkiem prof. M. Majewskiego. Odbył staże naukowe w Kanadzie (prof. D.E. Ward) i w Niemczech w Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule (RWTH-Aachen) w zespole prof. D. Endersa. Obecnie jest adiunktem w Instytucie Chemii Uniwersytetu w Białymstoku.

Jego główne zainteresowania naukowe to: synteza związków enancjomerycznie czystych, metodologia syntezy organicznej na fazie stałej i zastosowanie związków azotu (amin, hydrazonów, triazenów) w syntezie organicznej.

Mgr Małgorzata Łapińska jest absolwentką Uniwersytetu w Białymstoku. Jej praca dyplomowa dotyczyła syntezy chiralnych amin i hydrazyn oraz ich zastosowania w reakcjach na nośniku polimerycznym. Obecnie pracuje jako nauczyciel chemii.

Mgr Michał Sienkiewicz jest absolwentem Uniwersytetu w Białymstoku. Jego praca dyplomowa, częściowo wykonana w czasie stazu w Uniwersytecie w Dortmundzie w grupie prof. W. Kreisera, dotyczyła syntezy aromatycznego fragmentu kalikoferoli. Obecnie jest asystentem w Instytucie Chemii Uniwersytetu w Białymstoku i prowadzi badania metodologiczne nad asymetryczną syntezą na fazie stałej.

ABSTRACT

Solid Phase Organic Synthesis (SPOS) is a dynamically growing branch of organic synthesis encompusing methods for synthesis of both small molecules and oligomers on solid supports. Synthetically useful organic reactions of substrates immobilized on solid supports constitute a central part of the methodology of solid phase synthesis. This review article presents a representative and fairly comprehensive overview of reactions of supported substrates published till January 2005. The reactions are classified in synthetic terms into functional group interconvertions (FGI. according to type of functional group reacting and prepared) and C–C bond forming reactions (according to reaction type; usually name reaction). In particular preparations of halogens, alcohols, ethers, thiols, aldehydes, ketones, acids, esters, amides, phosphines, amines, poliamines, peptides, peptoids, oligonucleotides, and oligosaccharides is covered. Oxidation reactions of alcohols, aldehydes and ketones as well as reduction reactions of aldehydes, ketones, esters, acids, nitro and nitroso compounds are also presented. Only the selected reactions used for preparation of oligonucleotides, oligosaccharides, and polypeptides are covered due to the large volume of literature on this topic. The important C–C bond forming reactions such as Mannich, Michael, aldol, Heck, Suzuki, Stille, Sonogashira, Wittig, Horner-Wadsworth-Emmons, metathesis, carbonyl compound alkylation and acylation reactions are illustrated with examples. Moreover the multicomponent reactions such as Ugi reaction, Hantzsch reaction and Baylis-Hillman reaction are also included in the review.

The literature review shows a spectrum of synthetic organic reactions which can be performed on the immobilized substrates and suggests that in principle every reaction could be performed on solid phase. However the literature review indicates that reactions of polar organometallic reagents, radical reactions, and enantioselective reactions of achiral immobilized substrates are rather rarely used in SPOS.

Keywords: solid-phase synthesis, polymer supported reactions, combinatorial chemistry, organic synthesis

Słowa kluczowe: synteza na fazie stałej, reakcje na nośniku polimerycznym, chemia kombinatoryczna, synteza organiczna.

SPIS SKRÓTÓW I AKRONIMÓW

●	nośnik polimeryczny, domyślnie oznacza on usieciowany polistyren, jeśli na schemacie nie podano inaczej
Ac	grupa acylowa
ADMET	metatetyczna polimeryzacja acyklicznych dienów (ang. *Acyclic Diene Metathesis Polymerization*)
BEMP	2-*tert*-butyloimino-2-dietyloamino-1,3-dimetyloperhydro-1,3,2--diaza-fosforin
Boc	grupa *tert*-butoksykarbonylowa
BOP	heksafluorofosforan (benzotriazol-1-yloksy)tripirolidynofosfonowy
BOP-Cl	chlorek bis(2-okso-3-oksazolidynylo)fosfinylu (ang. *bis(2-oxo-3-oxazolidinyl)phosphinic chloride*)
BTC	trifosgen (ang. *bis(trichloromethyl) carbonate*)
CAN	azotan cerowo(IV)-amoniowy
Cbz	grupa benzyloksykarbonylowa
CDI	karbonylodiimidazol
CM	krzyżowa metateza olefin (ang. *Cross Metathesis*)
Cp	cyklopentadienyl
CPG	szkło o kontrolowanej wielkości porów (ang. *controlled pore glass*)
Cy	cykloheksyl
DABCO	1,4-diazabicyklo[2.2.2]oktan
dba	dibenzylidenoaceton
DBU	1,8-diazobicyklo[5.4.0]undecen-7
DCC	dicykloheksylokarbodiimid
DCE	1,2-dichloroetan
DCM	dichlorometan
DEAD	azodikarboksylan dietylu, $EtO_2C–N=N–CO_2Et$
DIAD	azodikarboksylan diizopropylu, $iPrO_2C–N=N–CO_2iPr$
DIBAL	wodorek diizobutyloglinowy
DIC	diizopropylokarbodiimid
DIPEA	diizopropyloetyloamina
DIPAMP	bis[(2-metoksyfenylo)fenylofosfino]etan
DMA	*N,N*-dimetyloacetamid
DMAP	4-dimetyloaminopirydyna
DME	1,2-dimetoksyetan
DMF	dimetyloformamid
DMSO	dimetylosulfotlenek
DMT	4,4'-dimetoksytrityl
Dod	4,4'-dimetoksydityl, 4-MeOPhCH(4-MeOPh)-
Dppf	1,1'-bis(difenylofosfino)ferrocen
DTBMP	2,6-di-*tert*-butylo-4-metylopirydyna
EDC	chlorowodorek *N*-etylo-*N'*-[(3-dimetyloamino)propylo]karbodiimidu

equiv	ekwiwalent molowy
Fmoc	grupa 9-fluorenylometoksykarbonylowa
FGI	transformacja grupy funkcyjnej (ang. *functional group interconversion*)
HATU	heksafluorofosforan *O*-(7-azabenzotriazol-1-ylo)-1,1,3,3-tetrametylouroniowy
HBPipU	heksafluorofosforan *O*-(benzotriazol-1-ylo)bis-(piperydyno)-uroniowy
HBPyU	heksafluorofosforan *O*-(benzotriazol-1-ylo)bis-(pirolidyno)-uroniowy
HBTU	heksafluorofosforan 2-(1-benzotriazolilo)-1,1,3,3-tetrametylouroniowy
HOBt	*N*-hydroksybenzotriazol
HTS	*screening* (reakcje przesiewania) wysokiej przepustowości (ang. *high-throughput screening*)
IBX	kwas *o*-jodoksybenzoesowy
KHMDS	heksametylodisilazyd potasu
LAH	wodorek litowoglinowy
LDA	diizopropyloamidek litu
LiHMDS	heksametylodisilazyd litu
MBHA	łącznik metylobenzhydryloaminowy
m-CPBA	kwas *m*-chloronadbenzoesowy
MCR	reakcja wieloskładnikowa (ang. *Multicomponent Reaction*)
Mes	mezytyl
Mmd	4-metoksydityl, 4-MeOPhCH(Ph)-
MMT	monometoksytrityl
Ms	grupa metanosulfonowa (mesylowa)
NBS	*N*-bromosukcynoimid, (*N*-bromoimid kwasu bursztynowego)
NMM	*N*-metylomorfolina
NMP	*N*-metylo-2-pirolidon
NMO	*N*-tlenek 4-metylomorfoliny
PAL	ang. *peptide acid-unloaded linker*
PAM	ang. *phenylacetamidomethyl linker*
PHB	ang. *p-hydroxybenzyl linker*
PCC	chlorochromian pirydynowy
PDC	dichromian pirydynowy
PROMP	fotoindukowana metatetyczna polimeryzacja przebiegająca z otwarciem pierścienia (ang. *Photoinduced Ring-Opening Metathesis Polimerization*)
PS	polistyren
PTSA	kwas *p*-toluenosulfonowy
Py	pirydyna
PyBroP	heksafluorofosforan bromotris(pirolidyno)fosfoniowy

3-QDL	3-hydroksychinolidyna
RCM	metatetyczne zamknięcie pierścienia (ang. *Ring-Closing Metathesis*)
REM	ang. *Regenerative Michael acceptor resin*
ROM	metatetyczne otwarcie pierścienia (ang. *Ring-Opening Metathesis*)
ROMP	metatetyczna polimeryzacja przebiegająca z otwarciem pierścienia (ang. *Ring-Opening Metathesis Polymerization*)
SASRIN	ang. *super acid-sensitive resin linker*
SPOS	synteza organiczna na fazie stałej (ang. *Solid Phase Organic Synthesis*)
TBAI	jodek tetrabutyloamoniowy
TBAF	fluorek tetrabutyloamoniowy
TBDPS	*tert*-butyldifenylsilyl
TBS	*tert*-butyldimetylsilyl (TBDMS)
TBTU	tetrafluoroboran *O*-(benzotriazol-1-ylo)-1,1,3,3-tetrametylouroniowy
TentaGel	monofunkcyjny kopolimer polistyrenu i poli(glikolu etylenowego)
TES	trietylosilyl
Tf	grupa trifluorometylosulfonowa (triflowa)
TFA	kwas trifluorooctowy
THF	tetrahydrofuran
THP	grupa tetrahydropiranylowa
TIPS	triizopropylsilyl
TMAD	*N,N,N',N'*-tetrametyloazodikarboksyamid
TMS	grupa trimetylosililowa
TPAP	rutenian(VII) (nadrutenian) tetrapropyloamoniowy, $[Pr_4N][RuO_4]$
Ts	grupa *p*-toluenosulfonowa (tosylowa)
żel Merrifielda	chlorometylowany kopolimer polistyrenu i diwinylobenzenu
żel Wanga	kopolimer polistyrenu i diwinylobenzenu z łącznikiem 4-(hydroksymetylo)fenoksylowym

WSTĘP

Od czasu opisania przez Merrifielda [1] (laureata nagrody Nobla w 1984 roku) metody otrzymywania tetrapeptydów na nośniku polimerycznym (1963 rok) synteza na fazie stałej (ang. *Solid Phase Organic Synthesis*, SPOS) odgrywa znaczącą rolę we współczesnej chemii. Koniec lat 70. to prace Leznoffa [2] i Frecheta [3], które ukazały zastosowanie SPOS do otrzymywania związków niskocząsteczkowych. Lata 90. XX wieku przyniosły gwałtowny rozwój syntezy na fazie stałej. Synteza na fazie stałej pozwala na paralelizację (prowadzenie procesów równolegle), automatyzację i uproszczenie syntezy zbiorów związków poprzez prowadzenie ręcznej lub automatycznej syntezy, zwykle, od kilku do kilkuset związków w jednym cyklu (rzucie). Chemia kombinatoryczna odgrywa olbrzymią rolę w poszukiwaniu nowych leków, katalizatorów i innych materiałów. Stało się to możliwe, między innymi, dzięki

zastosowaniu techniki *mix and split* (mieszania i dzielenia) do tworzenia dużych bibliotek związków organicznych oraz nowoczesnych, wydajnych metod przesiewania (ang. *high-throughput screening*, HTS), stosowanych głównie, lecz nie tylko, do badania aktywności biologicznej składników takich bibliotek [4]. Do głównych narzędzi syntezy na fazie stałej i chemii kombinatorycznej należy zaliczyć: nośniki (matryce), linkery[1] (metody kotwiczenia i odkotwiczania otrzymanych molekuł z nośnika)[2], oraz reakcje przeprowadzane na molekułach zakotwiczonych na nośnikach.

Obecny artykuł ma na celu przybliżenie wybranych reakcji przeprowadzanych na substratach immobilizowanych na nośniku polimerycznym, w kontekście syntezy niskocząsteczkowych związków organicznych.

Ponieważ w ostatnich latach pojawia się dużo publikacji dotyczących reakcji przeprowadzanych na fazie stałej, w tym także prace przeglądowe [4–10], w tej pracy zaprezentowano wybrane przykłady z oryginalnych prac publikowanych od początku zastosowania SPOS do syntezy związków niskocząsteczkowych aż do roku 2005. Reakcje tworzenia związków heterocyklicznych nie zostały opisane w tej pracy, ze względu na dostępność obszernych artykułów przeglądowych [11–13]. Przegląd zawiera trzy podstawowe grupy reakcji:

- reakcje transformacji grup funkcyjnych,
- reakcje tworzenia szkieletu węglowego,
- reakcje wieloskładnikowe (multikomponentowe).

Teoretyczne rozważania związane z przebiegiem reakcji w SPOS nasuwają wniosek: zasadniczo każda reakcja przeprowadzona w roztworze powinna być możliwa do przeprowadzenia na nośniku polimerycznym. Czasami jednak obserwuje się, że reakcja na nośniku daje inny wynik niż analogiczna reakcja w roztworze – określa się to jako efekt fazy stałej [14]. Wiele znanych reakcji nie zostało jeszcze przeprowadzonych, z różnych przyczyn, na fazie stałej i dlatego obserwuje się ciągłą aktywność w zakresie opracowywania nowych reakcji na fazie stałej i przenoszenia znanych reakcji przeprowadzanych w roztworze na fazę stałą.

1. TRANSFORMACJE GRUP FUNKCYJNYCH NA FAZIE STAŁEJ

1.1. TRANSFORMACJE GRUPY HYDROKSYLOWEJ

1.1.1. Otrzymywanie halogenków

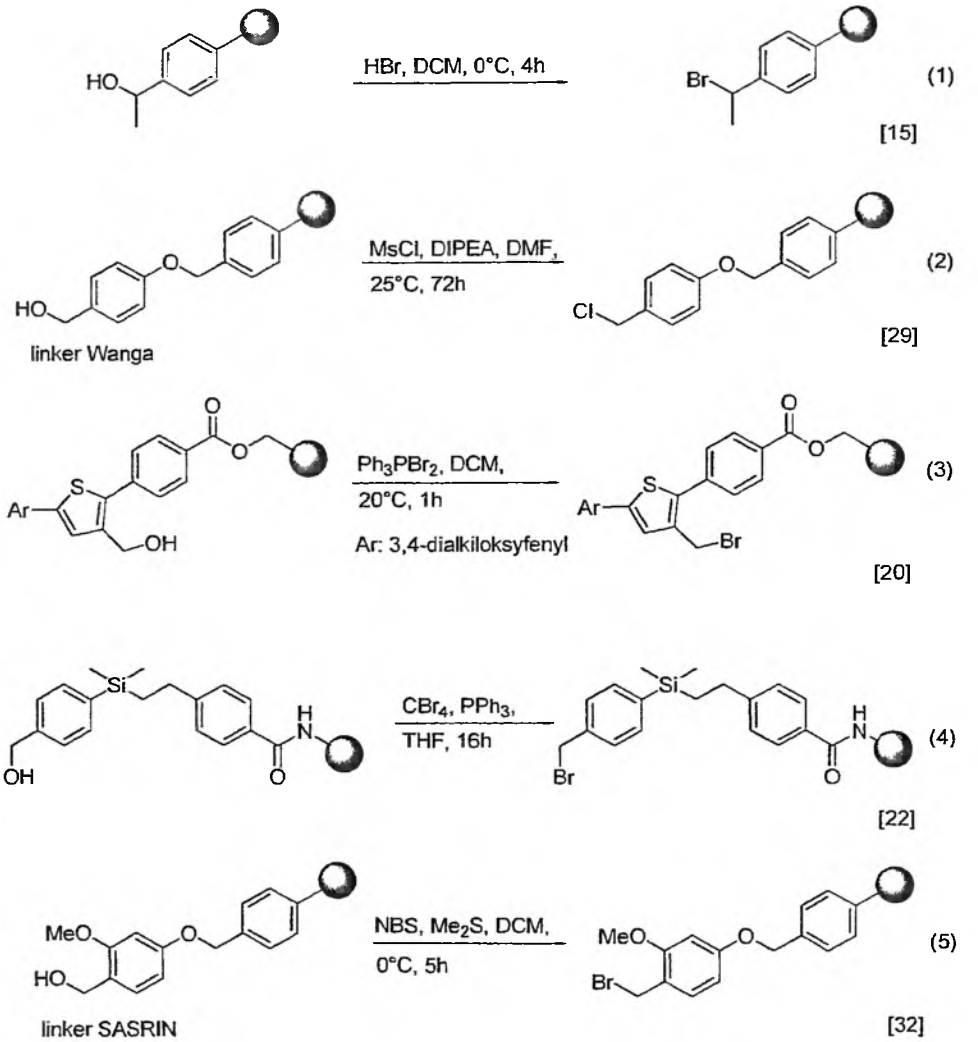
Jedną z częściej stosowanych przemian grup funkcyjnych w SPOS są reakcje transformacji grupy hydroksylowej w halogenek. Liczne reakcje transformacji grupy hydroksylowej, wynikają z dużej dostępności handlowej alkoholi.

---

[1] Definicja i dyskusja zasadności terminu „linker" jako bardziej ścisłego w stosunku do terminu „łącznik" jest podana w liście do redakcji: R. Łażny, Wiad. Chem., 2003, 57, 1919

[2] Przegląd nośników i metod kotwiczenia stosowanych w SPOS został przedstawiony w cz. 1 i 2; R. Łażny, A. Nodzewska, Wiad. Chem., 2003, 57, 587; R. Łażny, M. Michalak, Wiad. Chem., 2003, 57, 1061.

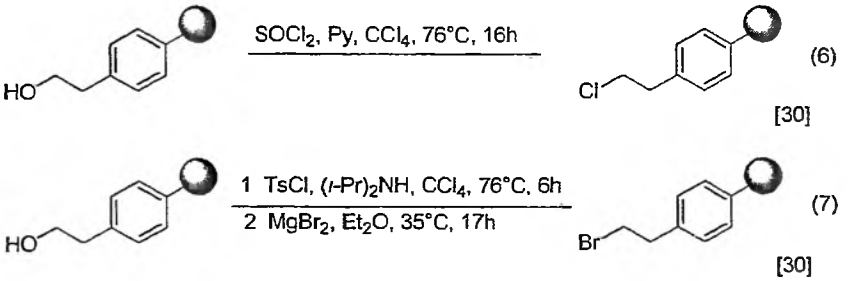
Alkohole benzylowe i allilowe zakotwiczone na nośniku polistyrenowym można skutecznie i szybko przeprowadzić w odpowiednie halogenki (1, schemat 1) [15].



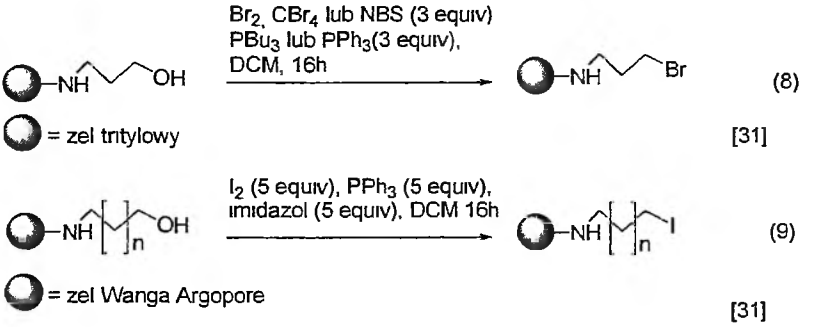
Schemat 1. Transformacja alkoholi benzylowych w halogenki na fazie stałej

Do transformacji grupy hydroksylowej w halogenek w alkoholach benzylowych można wykorzystać halogenowodory, halogenki tionylu [16–19], fosfiny i halogenki organiczne np. CBr_4, CCl_4, Ph_3PBr_2, NBS, Ph_3P/I_2/imidazol (3, 4, 5, schemat 1) [20–24]. Ponadto możliwe są również nieskomplikowane transformacje alkoholi tritylowych i benzhydrylowych w odpowiednie halogenki na nośniku polimerycznym. Reakcje te zachodzą już przy użyciu chlorku acetylu w toluenie [25–28].

W procesie transformacji grupy hydroksylowej jako produkty pośrednie często są wykorzystywane sulfoniany alkilu utworzone w reakcji alkoholu z odpowiednim chlorkiem sulfonowym (np. TsCl, MsCl; 7, schemat 2) [29, 30]. Fosfiny (pochodne fosfoniowe tworzone *in situ*) zostały tez wykorzystane przy transformacji grupy hydroksylowej w alkoholach alifatycznych w odpowiednie bromo- lub jodopochodne (schemat 3) [31].



Schemat 2 Transformacja alkoholi alifatycznych w halogenki na fazie stałej

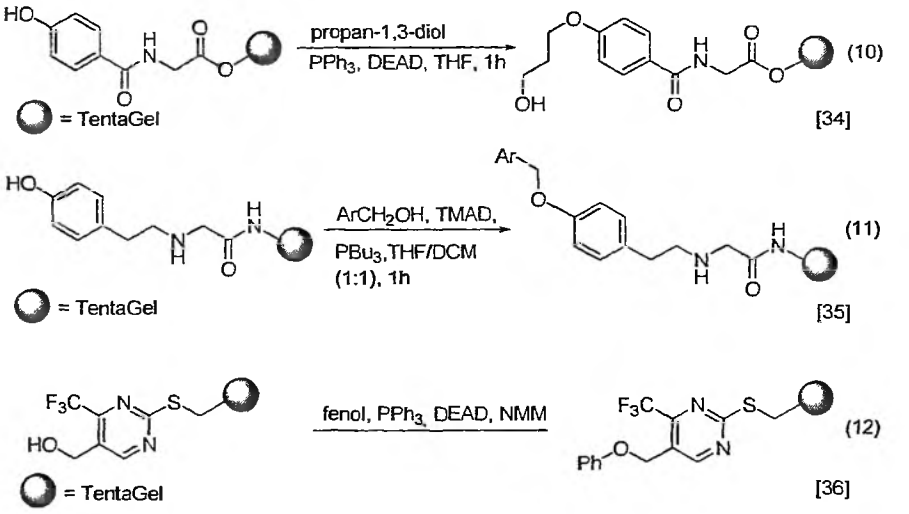


Schemat 3 Transformacja alkoholi alifatycznych w halogenki z wykorzystaniem fosfin

1.1.2. Otrzymywanie eterów

Transformację grupy hydroksylowej w grupę eterową mozna przeprowadzić wykorzystując reakcję Williamsona lub reakcję Mitsunobu w przypadku eterów alkilofenylowych. Sposób postępowania w obu przypadkach jest analogiczny do tego, jaki stosuje się w roztworze [33]. Jednakze zalety reakcji Mitsunobu sprawiły, ze jest ona częściej stosowana w syntezie eterów na fazie stałej, niz reakcja Williamsona. Jej stosowanie ogranicza się jednak do tworzenia eterów fenylowo-alkilowych, gdyz proste alkohole w odróznieniu od fenoli są zbyt słabymi kwasami.

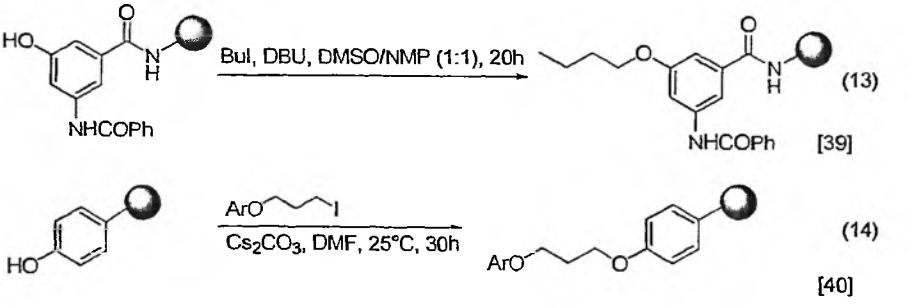
Reakcja Mitsunobu ma wiele zalet, takich jak dostępność alkoholi jako substratów, łagodne warunki reakcji oraz wysoką chemoselektywność (11, schemat 4).



Schemat 4. Transformacja fenoli w etery z wykorzystaniem reakcji Mitsunobu na fazie stałej

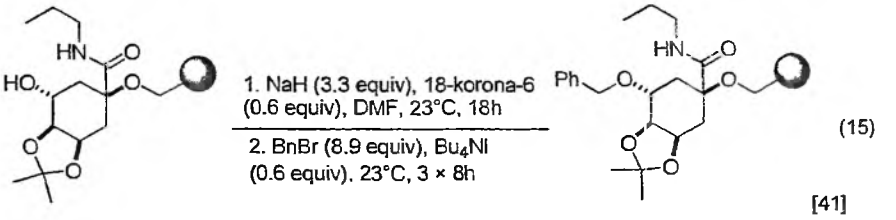
W reakcji tej stosowano tributylo- lub trifenylofosfinę i odczynnik utleniający (DEAD, DIAD lub TMAD) [34–37], a jako rozpuszczalniki *N*-metylomorfolinę (NMM) lub tetrahydrofuran (THF).

Reakcja eteryfikacji fenoli metodą Williamsona na fazie stałej jest przeprowadzana w środowisku polarnych rozpuszczalników aprotonowych (DMF, NMP, DMSO) w obecności zasad np. DBU, $KN(SiMe_3)_2$, fosfazenów (zasad Schwesingera) [38] lub węglanu cezu (13, 14, schemat 5).



Schemat 5. Transformacja fenoli w etery z wykorzystaniem reakcji Williamsona na fazie stałej

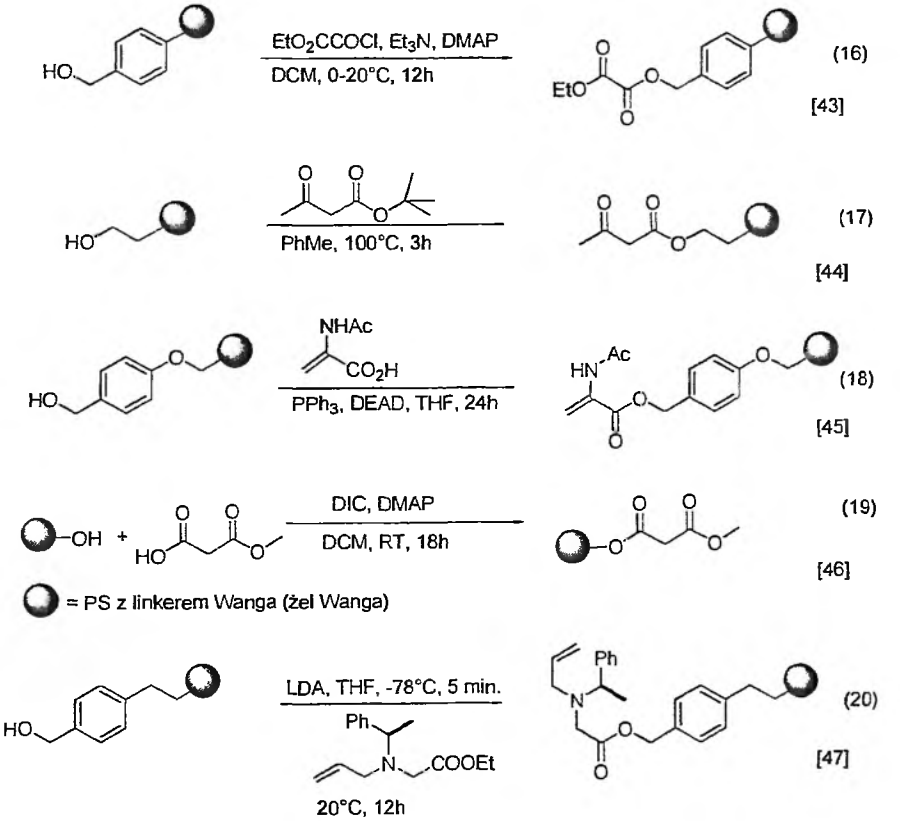
Alkohole alifatyczne również poddano reakcji Williamsona (schemat 6). Reakcja ta w przypadku halogenków alkilowych (skłonnych do reakcji eliminacji) wymaga użycia nadmiaru silnej zasady oraz nadmiaru halogenku, w celu zniwelowania skutków ewentualnej reakcji eliminacji.



Schemat 6. Transformacja alkoholi alifatycznych w etery na fazie stałej

1.1.3. Otrzymywanie estrów

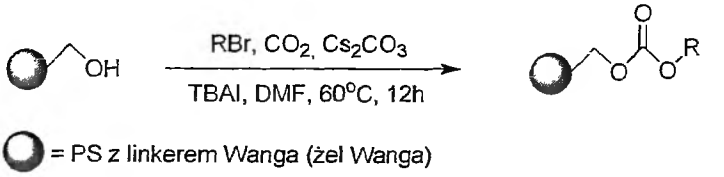
Alkohole zakotwiczone na nośniku polimerycznym mogą być przeprowadzane w estry w warunkach reakcji bardzo podobnych do warunków stosowanych w roztworze. Estry na fazie stałej otrzymuje się na ogół w reakcji alkoholi lub fenoli z kwasami karboksylowymi i ich pochodnymi (chlorkami kwasowymi, estrami lub bezwodnikami [42]) (schemat 7).



Schemat 7. Transformacja alkoholi w estry na fazie stałej

Bezpośrednią reakcję alkoholi lub fenoli z kwasami karboksylowymi prowadzi się w obecności reagentów aktywujących grupę karboksylową takich jak: DCC, DIC, BOP [48] lub innych aktywnych pochodnych. Związki te umożliwiają utworzenie w toku reakcji aktywnego estru, który w obecności katalizatora (DMAP) szybko reaguje z zakotwiczonym alkoholem. Otrzymywanie estrów możliwe jest również w charakterystycznych warunkach reakcji Mitsunobu (18, schemat 7).

Odrębną grupę stanowią estry kwasu węglowego, które często są wykorzystywane w syntezie na fazie stałej. Salvatore i wsp. zaproponowali nową metodę otrzymywania estrów węglowych z wykorzystaniem Cs_2CO_3 na żelu Wanga (schemat 8). Mormeneo i wsp. otrzymywali pochodne kwasu węglowego wykorzystując żel nitrofenylowy, który poddali reakcji z trifosgenem (BTC) w obecności pirydyny, a następnie przeprowadzano reakcję z alkoholem [49].



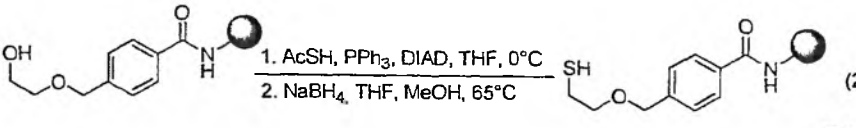
(21)

[50]

Schemat 8. Transformacja alkoholi w estry na fazie stałej

1.1.4. Otrzymywanie tioli i amin

Wykorzystując reakcję Mitsunobu, otrzymano nie tylko estry i etery, ale również tiole i aminy (schematy 9 i 10) [51, 52]. W pierwszym etapie w wyniku reakcji alkoholu z kwasem tiooctowym otrzymano octan tiolu, który w wyniku redukcji $NaBH_4$ przekształcono w pożądany tiol (schemat 9).

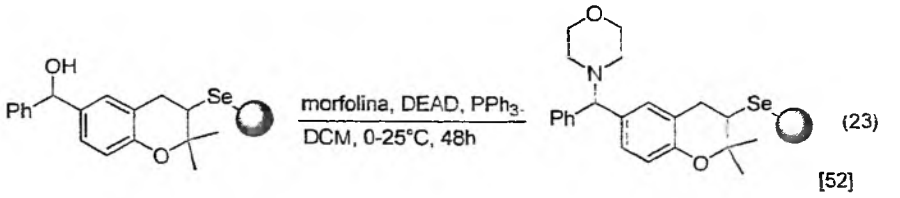


(22)

[51]

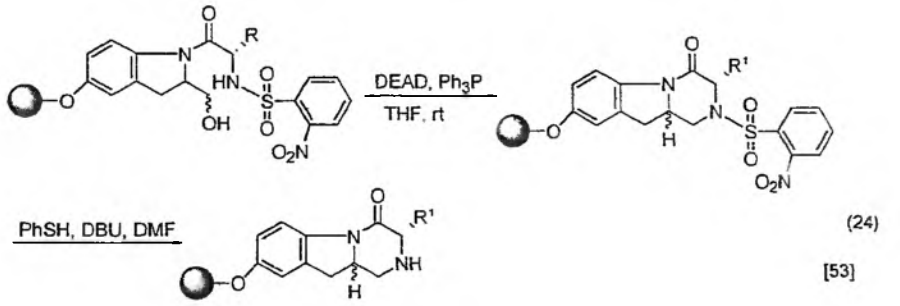
Schemat 9. Transformacja alkoholu w tiol na nośniku polimerycznym

W reakcji aminy z zakotwiczonym na nośniku polimerycznym alkoholem, w warunkach reakcji Mitsunobu otrzymano immobilizowaną na żywicy aminę (schemat 10).



Schemat 10. Transformacja alkoholu w aminę na nośniku polimerycznym w warunkach reakcji Mitsunobu

Innym przykładem otrzymywania amin na fazie stałej jest otrzymywanie biblioteki pochodnych hydroksyindoliny. Trzypierścieniowy związek został otrzymany w warunkach reakcji Mitsunobu. Reakcja wewnątrzcząsteczkowego zamknięcia pierścienia *N*-zabezpieczonego aminokwasu z pierwszorzędową grupą hydroksylową przebiegała z dobrą wydajnością. Następnie usuwano grupę zabezpieczającą i otrzymywano wolną grupę aminową (schemat 11) [53].

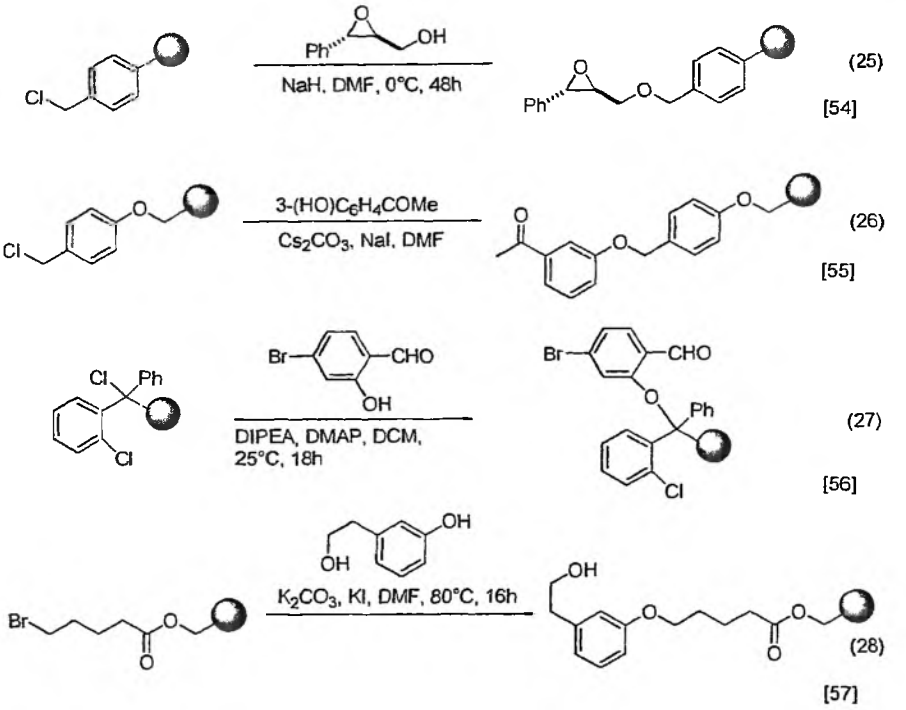


Schemat 11. Otrzymywanie pochodnych hydroksyindoliny na fazie stałej

1.2. TRANSFORMACJE HALOGENKÓW

1.2.1. Otrzymywanie eterów

W celu uzyskania eteru, halogenek zakotwiczony na stałym podłożu poddaje się zwykle reakcji z alkoholem lub fenolem w warunkach reakcji Williamsona (schemat 12).



Schemat 12 Transformacja halogenków w etery na fazie stałej

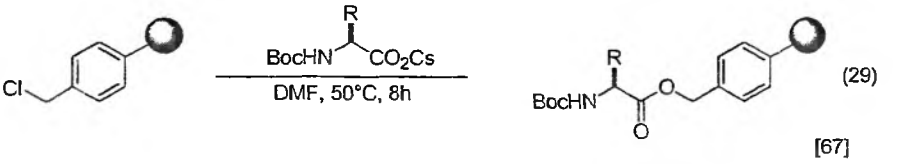
Reakcje tworzenia eteru z halogenku wymagają użycia silnej zasady deprotonującej alkohol w celu wytworzenia jonu alkoholanowego, fenolanowego lub enolanowego, który bierze udział w reakcji podstawienia nukleofilowego.

Reakcje przebiegają najczęściej w roztworze dimetyloformamidu (DMF) lub *N,N*-dimetyloacetamidu (DMA) i wymagają stosowania zasad takich jak: NaH [58–61], K_2CO_3, Cs_2CO_3, NaOH [62, 63], NaOMe [64, 65]. Jeżeli reakcji poddaje się silnie kwaśne fenole (nitrofenol, pentafluorofenol) wystarcza zastosowanie aminy takiej jak diizopropyloetyloamina (DIPEA) jako zasady [66].

1.2.2. Otrzymywanie estrów

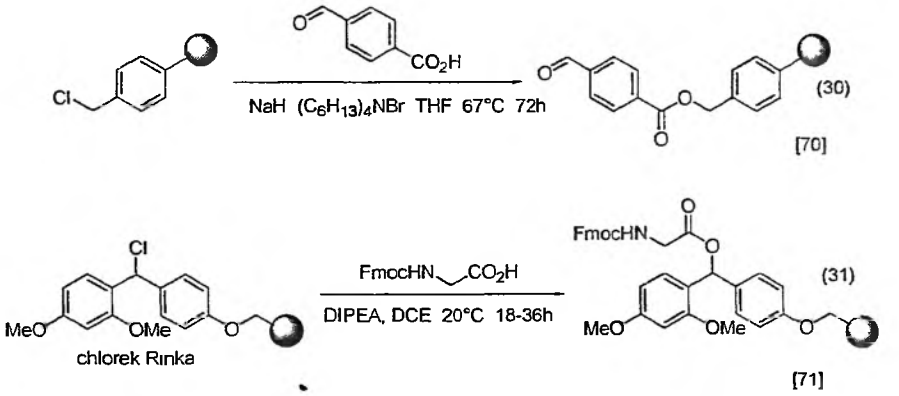
Halogenek zakotwiczony na nośniku polimerycznym można przekształcić w ester działając na substrat kwasem karboksylowym lub też jego solą nieorganiczną. Wśród stosowanych soli kwasów karboksylowych należy wymienić pochodne: cezu, rubidu, potasu i sodu. Literatura opisuje liczne przykłady stosowania soli *N*-Boc aminokwasów (29, schemat 13). Stwierdzono, że reakcja tworzenia estrów z immobilizowanych halogenków na żelu Merrifielda przebiega najskuteczniej, gdy

reagentem stosowanym do takiego przekształcenia jest sól cezowa *N*-Boc aminokwasu [67]. Sole rubidu, potasu, sodu dają zdecydowanie gorsze wyniki [68, 69]



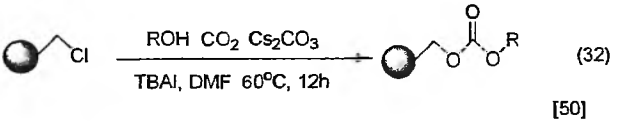
Schemat 13 Transformacja halogenków w estry na fazie stałej z wykorzystaniem soli kwasów karboksylowych

Halogenki benzylowe, benzhydrylowe i tritylowe ulegają reakcji podstawienia również pod wpływem kwasów karboksylowych w obecności amin (np DIPEA) (31, schemat 14).



Schemat 14 Transformacja halogenków w estry na fazie stałej z wykorzystaniem kwasów karboksylowych

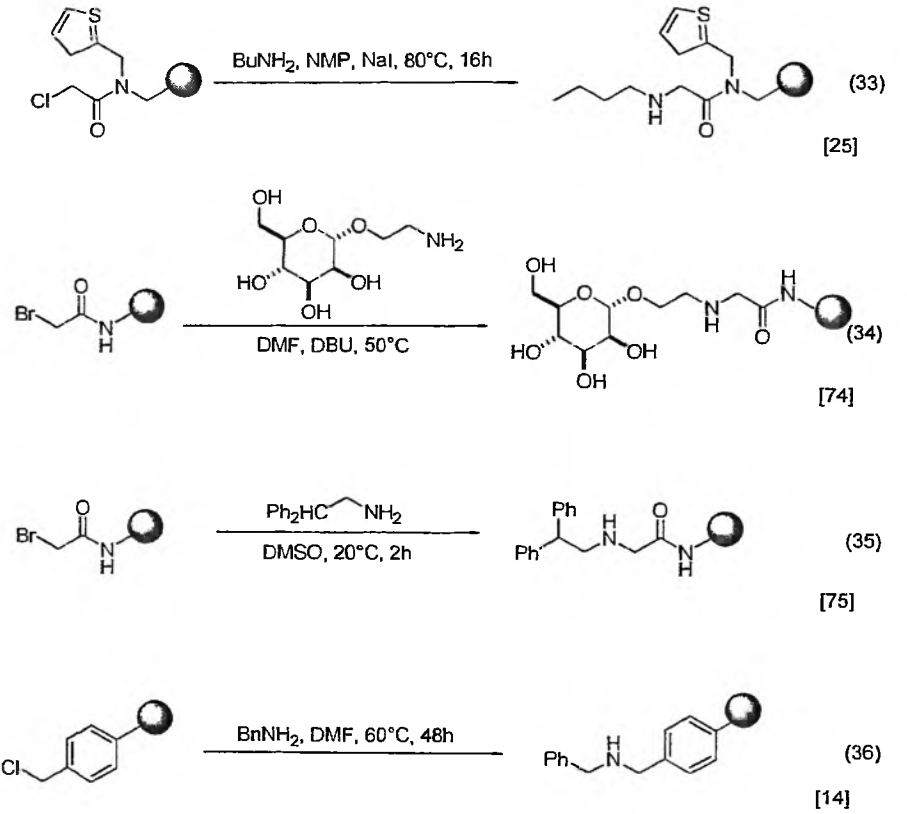
Salvatore i wsp. otrzymali estry kwasu węglowego wykorzystując także żel Merrifielda (schemat 15).



Schemat 15 Transformacja halogenków w estry kwasu węglowego

1.2.3. Otrzymywanie amin

Znane są liczne przykłady transformacji halogenku w grupę aminową w SPOS. Najczęściej reakcji poddawane są immobilizowane halogenki benzylowe lub allilowe, jak również związki karbonylowe podstawione w pozycji α lub β atomem halogenu (schemat 16). Reakcje te charakteryzują się wysoką wydajnością i łagodnymi warunkami (wiele tych reakcji daje produkty już w temperaturze pokojowej).



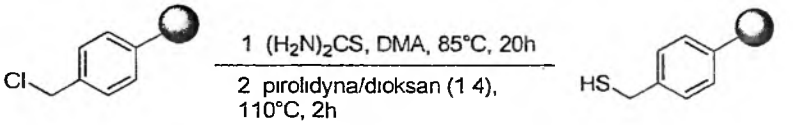
Schemat 16. Transformacja halogenków w aminy na nośniku polimerycznym

Immobilizowane pochodne chloro- i bromoacetamidów reagują z liczną grupą amin alifatycznych, jak również aromatycznych (schemat 16). W zależności od potrzeb reakcje prowadzone są w środowisku dimetylosulfotlenku (DMSO) w temperaturze pokojowej (2–12 h) (35, schemat 16) lub w roztworze DMF albo NMP w podwyższonej temperaturze (33, 34, schemat 16). Halogenki benzhydrylowe łatwo ulegają reakcji substytucji w wyżej wymienionych warunkach tworząc odpowiednie aminy [25]. Żel Merrifielda także wykorzystywano do otrzymania amin immobilizowanych na żelu (36, schemat 16) [72]. Z żelu Merrifielda można otrzymać

również zel aminometylowy. Pod wpływem zasady, heksametylodisilazydu potasu (KHMDS) atom chloru jest wymieniany na grupę aminową [73].

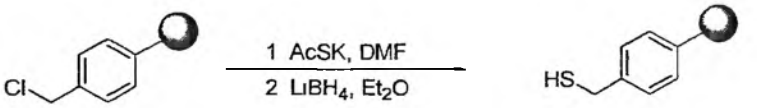
1.2.4. Otrzymywanie tioli

W reakcjach na fazie stałej, przy wprowadzeniu grupy tiolowej w miejsce halogenu stosuje się reakcje dwuetapowe. W pierwszym etapie generowana jest sól *S*-alkiloizotiouroniowa, która następnie poddawana jest hydrolizie do tiolu (schemat 17). Sposób postępowania jest analogiczny do tego, jaki stosuje się w roztworze [76–78]. Innym sposobem jest przeprowadzenie halogenku pod wpływem nukleofilowego anionu tiooctanowego w tioester. Powstały tioester redukuje się następnie do tiolu przy uzyciu $LiBH_4$.



(37)

[79]



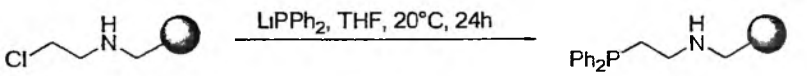
(38)

[80, 81]

Schemat 17 Transformacja halogenkow w tiole na fazie stałej

1.2.5. Otrzymywanie fosfin

Halogenek zakotwiczony na nośniku polimerycznym mozna przeprowadzić w fosfinę w wyniku działania litowej pochodnej fosfiny (schemat 18). Pierwszym etapem reakcji jest generowanie litowanej fosfiny, która powstaje w wyniku reakcji fosfiny lub tez chlorofosfiny z litem w THF. Wytworzona w ten sposób $LiPPh_2$ jest czynnikiem nukleofilowym w reakcji z halogenkiem zakotwiczonym na nośniku polimerycznym.



(39)

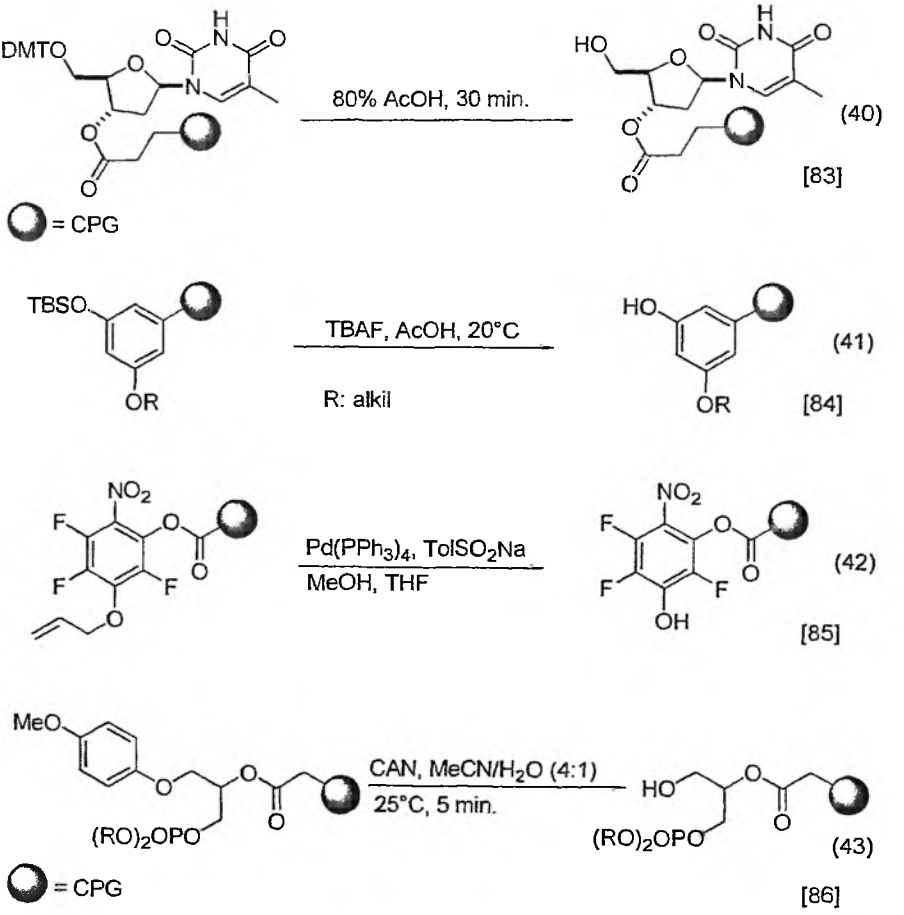
[82]

Schemat 18 Transformacja halogenku w fosfinę na fazie stałej

1.3. TRANSFORMACJE GRUPY ETEROWEJ

1.3.1. Otrzymywanie alkoholi

Etery są związkami stosunkowo słabo reaktywnymi. Konsekwencją dużej stabilności wiązania eterowego jest konieczność stosowania relatywnie ostrych warunków reakcji rozerwania wiązania R–O. Znana stabilność kationu benzylowego ułatwia reakcję rozpadu eteru benzylowego zachodzącą pod wpływem kwasów. Łatwość rozszczepienia eterów wzrasta w szeregu: benzyl < benzhydryl < trityl, oraz ze wzrostem liczby grup elektronodonorowych. Wiązanie eterowe można także rozerwać wykorzystując utleniacze.



Schemat 19. Transformacja eterów w alkohole na nośniku polimerycznym

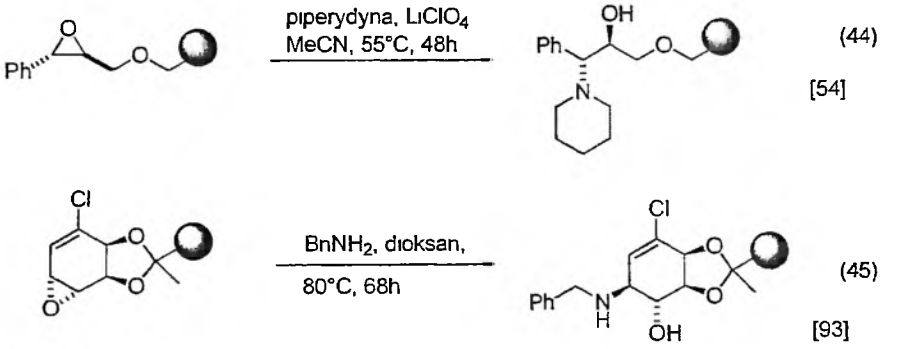
Eter 4,4'-dimetoksytritylowy (DMT–OR) jest grupą ochronną powszechnie stosowaną w syntezie oligonukleotydów na fazie stałej. Reakcja rozszczepienia DMT–OR przebiega przy użyciu słabych kwasów np. kwasu dichlorooctowego lub kwasu trichlorooctowego (3% w DCM, 2 min.) [87, 88]. Rozszczepienie eteru 2,4-dimetoksybenzhydrylowego (łącznika kotwiczącego m.in. alkohole, otrzymanego z chlorku Rinka) zachodzi pod wpływem 5% roztworu kwasu trichlorooctowego w DCM [71] natomiast rozszczepienie eteru monometoksytritylowego przy użyciu 1% roztworu TsOH w DCM [89].

Etery sililowe są związkami zazwyczaj umiarkowanie trwałymi w środowisku zasadowym jak i słabo kwaśnym. W porównaniu do zwykłych eterów są one jednak mniej trwałe i mogą ulegać rozszczepieniu także pod wpływem jonów OH^-, RO^-, a szczególnie F^-. Usunięcie grupy ochronnej będącej eterem sililowym (takim jak: TES, TIPS, TBS, TBDPS) zachodzi łatwo pod wpływem roztworu fluorku tetrabutyloamoniowego (TBAF) (41, schemat 19) lub fluorowodorku pirydyny (THF, 25°C, 15 h) [40, 90, 91].

Rozerwanie wiązania R–O w eterze allilowym może zachodzić w wyniku działania kompleksu palladoorganicznego (42, schemat 19). Natomiast reakcja rozszczepiania eteru 4-metoksyfenylowego przebiega w warunkach oksydatywnych, pod wpływem utleniacza, jakim jest azotan cerowo(IV)-amonowy (CAN) (43, schemat 19).

1.3.2. Otrzymywanie amin

Etery takie jak oksirany mogą być przekształcone w aminy w wyniku substytucji nukleofilowej. Najlepsze wyniki uzyskuje się wykorzystując w tej reakcji aminy pierwszo- i drugorzędowe (schemat 20) [54, 92–96].



Schemat 20 Transformacja oksiranów w aminy na fazie stałej

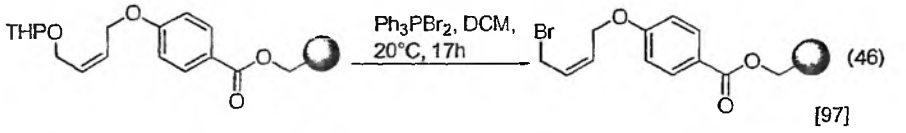
Zwykle reakcje otwarcia epoksydów pod wpływem aminy wymagają obecności katalizatora. Najczęściej rolę katalizatorów pełnią kwasy Lewisa. Reakcja sub-

stytucji zachodzi z dużą wydajnością, gdy reagentami aminowymi są aminy alifatyczne, analogi aniliny oraz aminy heteroaromatyczne. Procedura reakcji na fazie stałej jest analogiczna do reakcji w roztworze.

W wyniku reakcji następuje otwarcie pierścienia epoksydowego i utworzenie cząsteczki aminoalkoholu.

1.3.3. Otrzymywanie halogenków

Eter THP, stosowany jako grupa ochronna alkoholi, może być przeprowadzany bezpośrednio w halogenek poprzez działanie dibromkiem trifenylofosfiny (schemat 21) w roztworze DCM. Reakcja ta przekształca bezpośrednio alkohol zabezpieczony eterem THP w halogenek bez konieczności odbezpieczania grup OH.

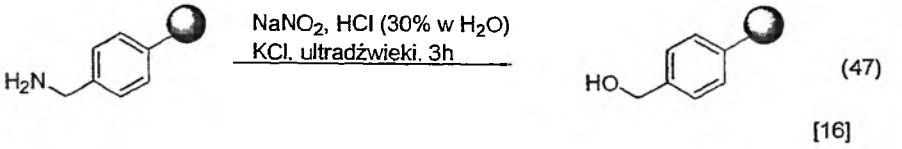


Schemat 21. Transformacja eteru w halogenek na fazie stałej

1.4. TRANSFORMACJA GRUPY AMINOWEJ

1.4.1. Otrzymywanie alkoholi

Pierwszorzędowe aminy w reakcji z kwasem azotowym(III) tworzą nietrwałe sole diazoniowe. Taka reakcja w przypadku alifatycznych soli diazoniowych prowadzi do ich rozpadu z wytworzeniem karbokationu, a następnie w wyniku reakcji z wodą obecną w roztworze wodnym daje alkohol (schemat 22).

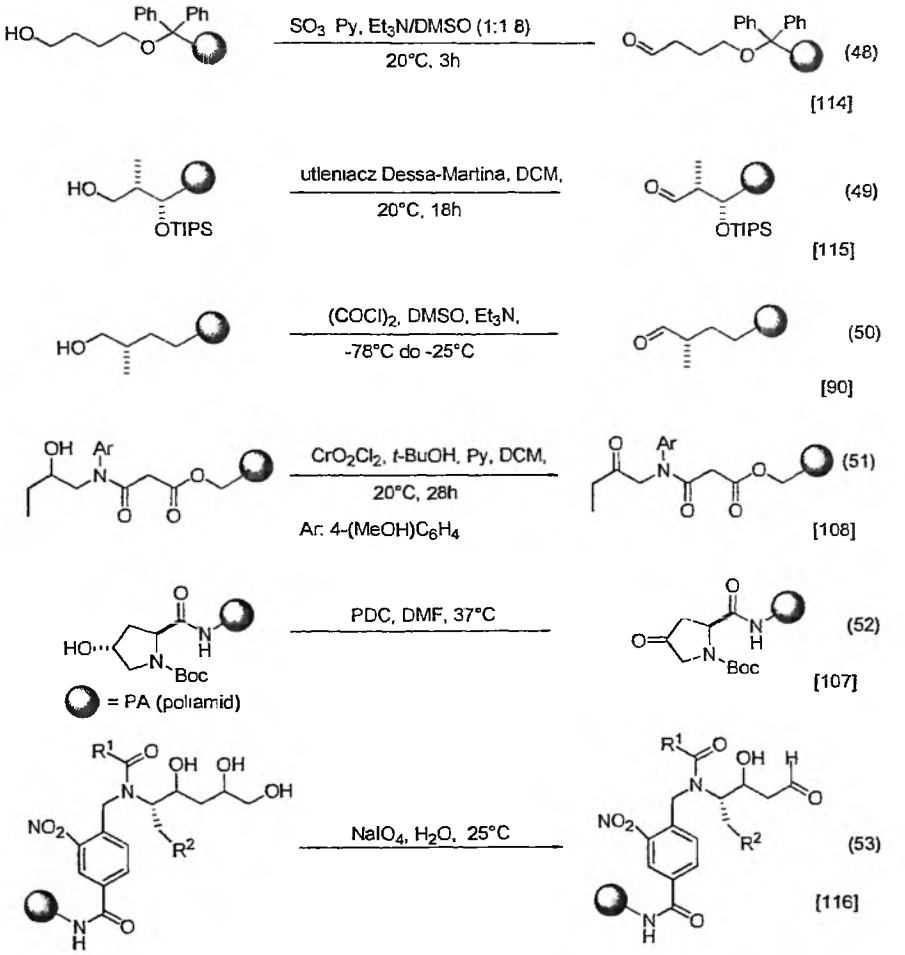


Schemat 22. Transformacja aminy w alkohol na fazie stałej

1.5. REAKCJE UTLENIENIA I REDUKCJI

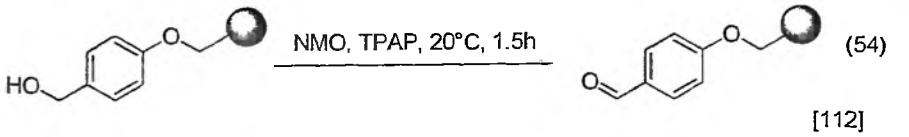
1.5.1. Reakcje utlenienia alkoholi, aldehydów i ketonów

Alkohole pierwszo- i drugorzędowe zakotwiczone na nośniku polimerycznym stosunkowo łatwo można utlenić do odpowiednich aldehydów i ketonów. Wiele procedur utleniania przeprowadzanych w roztworze znalazło zastosowanie w SPOS. Wybrane przykłady zawiera schemat 23. Do stosowanych utleniaczy należą: chlorek oksalilu/DMSO (utlenianie Swerna) (50, schemat 23) [98, 99], SO_3 w pirydynie/DMSO (48, schemat 23) [59, 100–103], utleniacz Dessa-Martina (49, schemat 23), [104–106], związki chromu(VI): PDC [107], CrO_2Cl_2 (51, schemat 23), [108, 109], $CrO_2(O\mathit{t}\text{-Bu})_2$ [109], IBX [104, 110, 111].

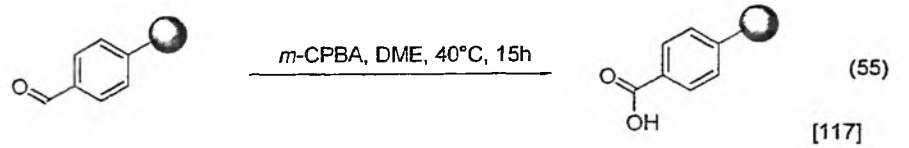


Schemat 23. Przykłady reakcji utleniania alkoholi pierwszo- i drugorzędowych zakotwiczonych na nośniku polimerycznym

W reakcji utleniania alkoholi do aldehydów i ketonów wykorzystano również, jako stechiometryczny utleniacz *N*-tlenek morfoliny (NMO), w obecności katalizatora TPAP (schemat 24) [112, 113]. Podobnie jak w roztworze 1,2-diole ulegają selektywnej reakcji utleniania w obecności $NaIO_4$ (53, schemat 23).



Schemat 24. Reakcja utleniania immobilizowanego alkoholu rutenianem(VII)

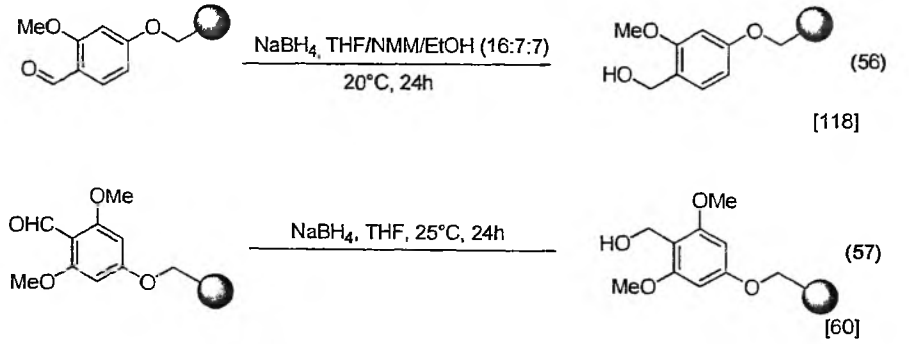


Schemat 25. Reakcja utleniania aldehydu do kwasu karboksylowego na fazie stałej

Reakcję utlenienia grupy aldehydowej do grupy karboksylowej przeprowadzono na nośniku polimerycznym wykorzystując jako utleniacz nadkwas (*m*-CPBA) w roztworze dimetoksyetanu (schemat 25).

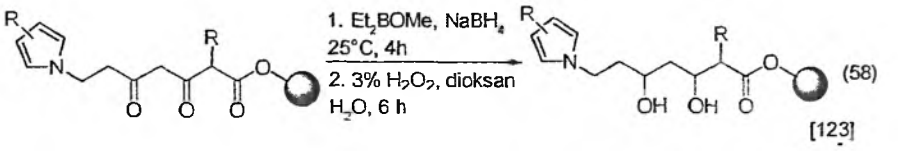
1.5.2. Reakcje redukcji aldehydów i ketonów

Reakcje redukcji grupy karbonylowej aldehydów i ketonów są podobnie jak w roztworze również popularne w syntezie na fazie stałej. Odczynnikiem stosowanym do redukcji aldehydów jest najczęściej $NaBH_4$. Wśród zalet stosowania borowodorku sodu należy wymienić możliwość przeprowadzania reakcji w roztworach alkoholowych lub wodnych (56, schemat 26).



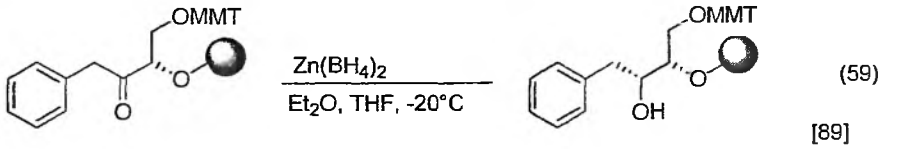
Schemat 26. Reakcje redukcji aldehydów na fazie stałej

Reakcje redukcji ketonów na fazie stałej przeprowadzano głównie przy użyciu $NaBH_4$ [59, 119, 120]. Ponadto stosowane są inne reduktory: diizoamyloboran sodu [121], $LiBH_4$ [122]. Możliwa jest również redukcja diketonów dietylometoksyboranem i $NaBH_4$ do dioli (58, schemat 27).



Schemat 27 Reakcja redukcji diketonu do dialkoholu na fazie stałej

Bardzo ważnym aspektem redukcji związków karbonylowych jest stereochemiczny przebieg reakcji. W 1998 roku Ellman opublikował diastereoselektywną syntezę aspartylu na fazie stałej. Redukcja borowodorkiem cynku α,β-dialkoksyketonu w środowisku eteru dietylowego i tetrahydrofuranu w temperaturze –20°C (schemat 28) dała produkt, o czystości diastereomerycznej 60–80% [89]. Stereoselektywną reakcję redukcji przy użyciu $NaBH_4$ oksobicykloketonu do alkoholu opisał również Schlessinger [124].

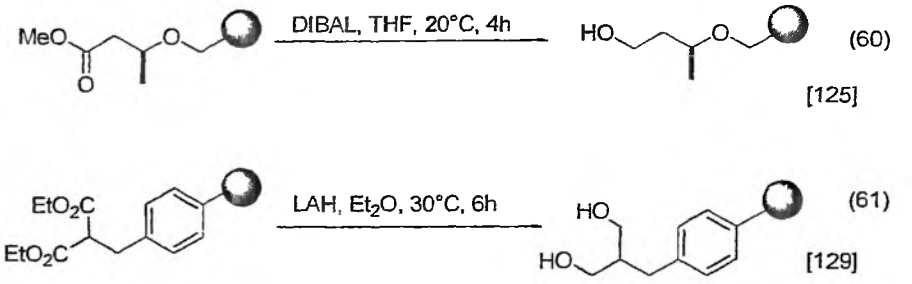


Schemat 28 Diastereoselektywna reakcja redukcji α,β-dialkoksyketonu do alkoholi na fazie stałej

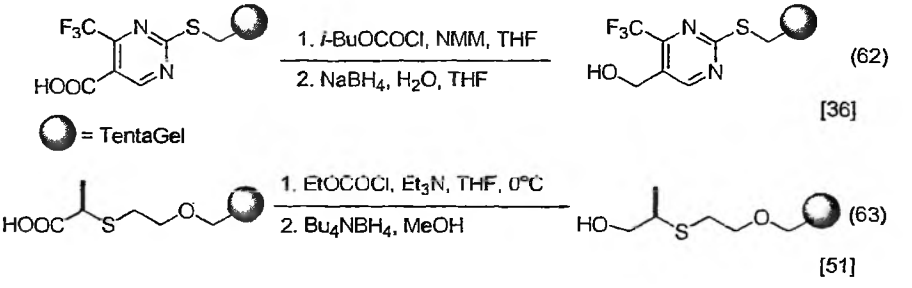
1.5.3. Reakcje redukcji kwasów karboksylowych i estrów

Grupa estrowa ulega redukcji trudniej niż ketonowa i aldehydowa. Dopiero użycie silniejszego reduktora pozwala na przeprowadzenie estru w alkohol. Obecnie do redukcji estrów na fazie stałej stosowane są powszechnie takie reduktory jak: DIBAL (w roztworze THF, Et_2O, DCM, toluenu) [125, 126], $LiAlH_4$ (w roztworze THF względnie Et_2O) [127, 128] (schemat 29). Zwykle reakcję prowadzi się w temperaturach od –78°C do temperatury pokojowej (schemat 29).

Reakcje redukcji kwasów karboksylowych mogą przebiegać przy użyciu łagodnych odczynników redukujących, jeżeli etap redukcji poprzedza aktywacja grupy karboksylowej poprzez przeprowadzenie jej np. w bezwodnik. Drugi etap tej przemiany polega na redukcji aktywnej pochodnej kwasu (np. bezwodnika) borowodorkiem sodu do alkoholu (schemat 30).



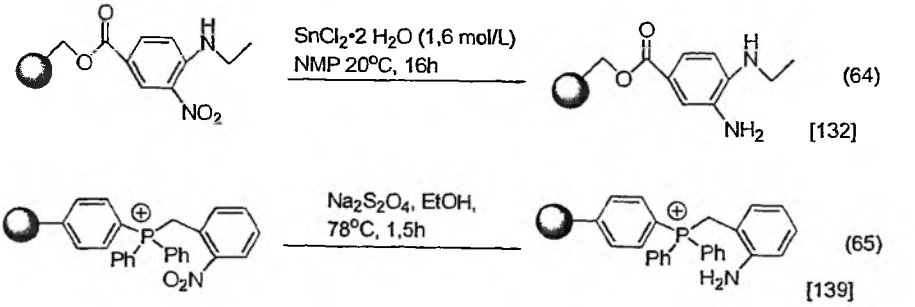
Schemat 29. Reakcje redukcji estrów na fazie stałej



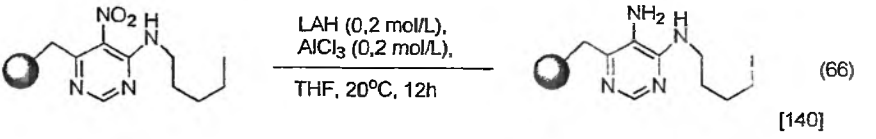
Schemat 30. Metody redukcji kwasów na fazie stałej

1.5.4. Reakcje redukcji grupy nitrowej i nitrozowej

Redukcja aromatycznej grupy nitrowej często jest przeprowadzana na nośnikach polimerycznych. Najczęściej w tym celu wykorzystuje się chlorek cyny(II) w roztworze NMP lub DMF [130–134]. W mniejszym stopniu wykorzystuje się m.in.: ditionin sodu [135], chlorek chromu(II) [136], ind z dodatkiem chlorku amonu [137] oraz $NaBH_4$ z dodatkiem acetyloacetonianu miedzi(II) [138].



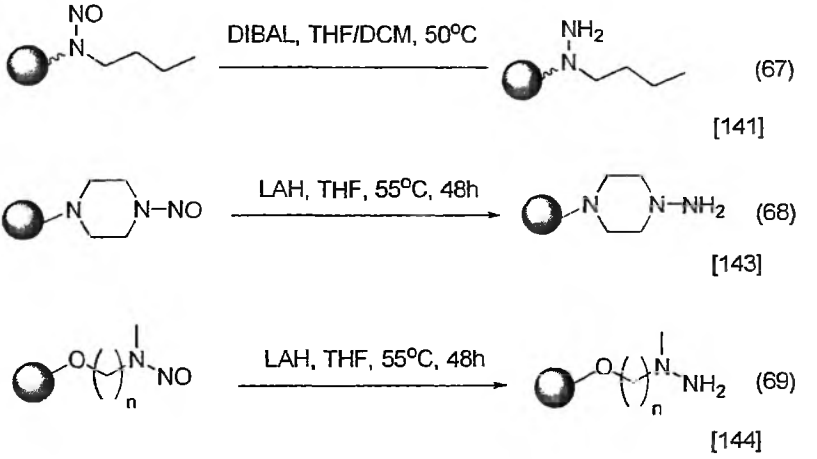
Schemat 31. Reakcje redukcji grupy nitrowej na fazie stałej.



= PS z linkerem Rinka (żel Rinka)

Schemat 31. Ciąg dalszy

Transformację grupy nitrozowej do hydrazynowej można przeprowadzić przy użyciu DIBAL [141, 142] lub LAH [143, 144] (schemat 32).



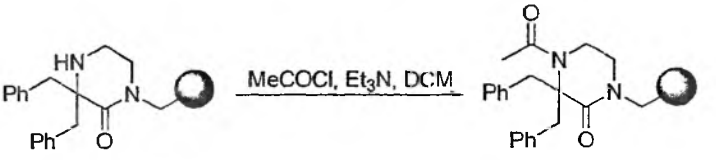
Schemat 32. Reakcje redukcji grupy nitrozowej na fazie stałej

1.6. TRANSFORMACJE POCHODNYCH KWASÓW KARBOKSYLOWYCH

1.6.1. Otrzymywanie amidów

Otrzymanie amidów amin I i II rzędowych metodami znanymi z syntezy w roztworze nie nastręcza zwykle trudności na fazie stałej. W przypadku trudności *N*-acylowania pochodnych α-alkiloaminokwasów czy też pochodnych *N*-alkiloaminy najlepszym sposobem (jeśli nie grozi racemizacją aminokwasu) jest przeprowadzenie grupy karboksylowej w chlorek kwasowy. Reakcja przebiega podobnie jak w roztworze. Grupę karboksylową poddaje się reakcji z chlorkiem oksalilu [36, 145, 146] chlorkiem tionylu [147, 148] lub trifosgenem (BTC) [149].

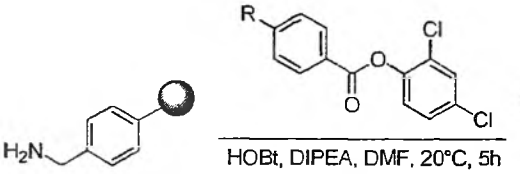
Podobnie jak chlorki kwasowe (schemat 33), mniej reaktywne bezwodniki kwasowe i aktywne estry (schemat 34, 35) są również często stosowane w syntezie wiązania amidowego na fazie stałej.



(70)

[150]

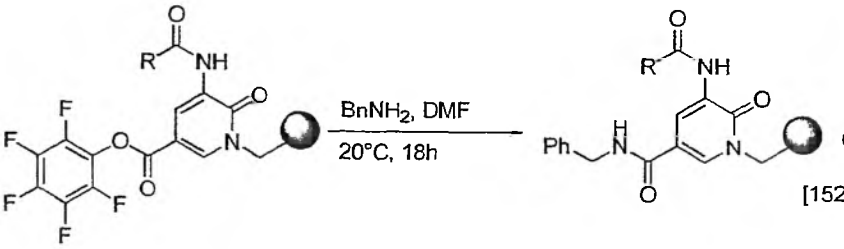
Schemat 33. Reakcje immobilizowanej aminy z chlorkiem kwasowym



(71)

[151]

Schemat 34. Reakcje immobilizowanej aminy z aktywnym estrem (estrem 2,4-dichlorofenylu)



(72)

[152]

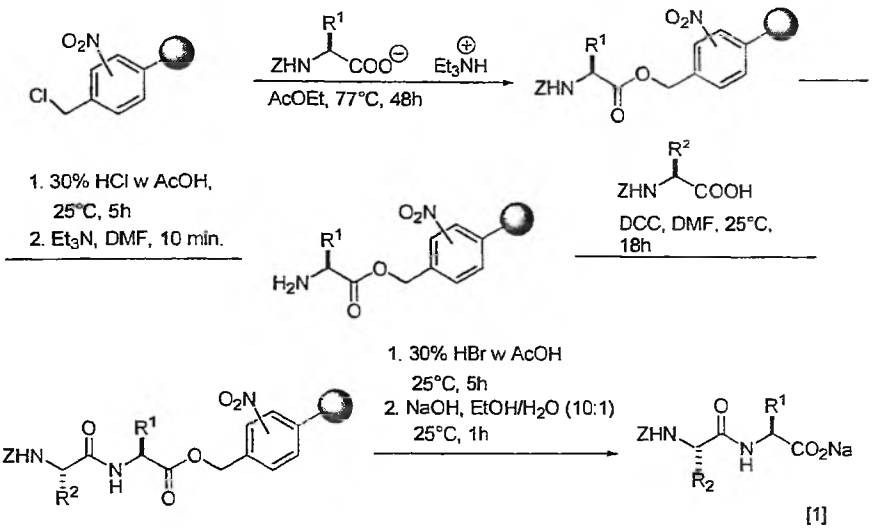
Schemat 35. Reakcje immobilizowanego aktywnego estru (pentafluorofenylowego) z aminą

β-Laktamy też są otrzymywane na nośniku polimerycznym. Balasubramanian i wsp. zaprezentowali stereoselektywną syntezę 1,3,4-podstawionych β-laktamów, wykorzystującą immobilizowany chiralny aldehyd oksazolidyny [153].

1.6.2. Otrzymywanie peptydów

Synteza polipeptydu na fazie stałej jest szczególnie ważna w kontekście poszukiwań biologicznie aktywnych związków metodami chemii kombinatorycznej. Hi-

storycznie najstarszą syntezą na fazie stałej jest synteza peptydu przeprowadzona przez Merrifielda w 1963 roku [1].



Schemat 36. Pierwsza synteza peptydów na fazie stałej opublikowana przez Merrifielda

W klasycznej metodzie Merrifielda w celu wydłużenia łańcucha peptydowego związanego ze stałym podłożem (ziarnami polistyrenowymi) przyłącza się stopniowo aminokwasy (schemat 36). Najpierw do ziaren polistyrenowych przyłącza się N-chroniony, C-końcowy aminokwas pożądanego peptydu, a następnie usuwa z tego aminokwasu grupę ochronną. Wprowadza się kolejny aminokwas również w formie z zablokowaną grupą aminową i odczynnik sprzęgający (np. DCC). Po utworzeniu wiązania peptydowego odmywa się nadmiar reagentów i produkt uboczny – np. dicykloheksylomocznik. Powtarzając te czynności (odbezpieczanie i sprzęganie) przyłącza się następne aminokwasy. Zablokowane substraty stosuje się w dużym nadmiarze (lub reakcje się powtarza) w celu zapewnienia wydajności powyżej 99% w każdym etapie syntezy wiązania peptydowego. Po zakończeniu syntezy peptyd uwalnia się z nośnika przez działanie silnym kwasem (np. HF), który rozrywa wiązanie estru benzylowego łączącego grupę karboksylową z nośnikiem, nie uszkadzając powstałych w syntezie wiązań peptydowych.

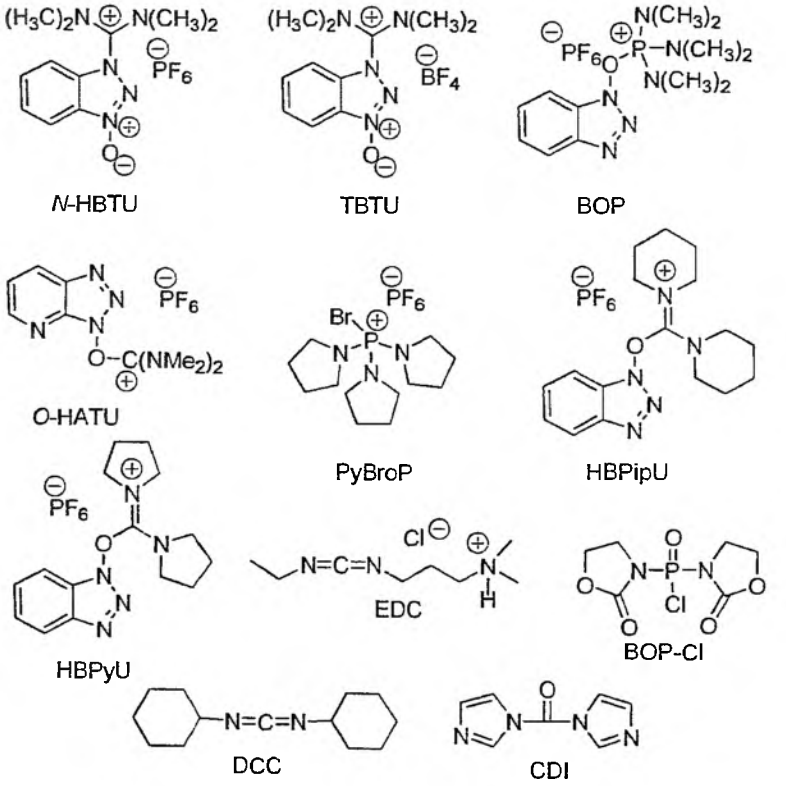
Od czasu pierwszej syntezy przeprowadzonej przez Merrifielda pojawiły się nowsze metody sprzęgania aminokwasów np. jedną z nowych metod jest wykorzystanie trifosgenu [154].

Warunki reakcji tworzenia wiązania peptydowego zarówno w roztworze jak i na fazie stałej muszą być tak dobrane, aby zapewnić [155, 156]:

- relatywnie krótki czas reakcji,
- wysoką wydajność,

• niski stopień racemizacji na centrach stereogenicznych przyłączanych chiralnych aminokwasów.

Takie warunki reakcji zazwyczaj zapewnia stosowanie reagentów sprzęgających takich jak: DCC, EDC, CDI a także BOP (często z dodatkiem pomocniczych nukleofili np. HOBt). W reakcji sprzęgania stosowano również pochodne fosforowe: PyBroP i BOP-Cl, oraz pochodne dialkilomocznika: HATU, HBTU, TBTU, HBPyU, HBPipU (schemat 37). PyBroP jest wykorzystywany w reakcjach trudnych do sprzęgania aminokwasów np. α,α-dialkiloaminokwasów [157]. Ostatnio opublikowano przegląd [158] i artykuły dotyczące struktury najnowszych reagentów sprzęgających typu uroniowego i guanidyniowego [159–161]. Carpino i wsp. wykazali, że HBTU i HATU mogą występować w postaci soli uroniowych (*O*-HBTU, *O*-HATU) oraz guanidyniowych (*N*-HBTU, *N*-HATU). W reakcjach sprzęgania sole uroniowe są bardziej wydajnymi reagentami sprzęgającymi od izomerów guanidyniowych [159].

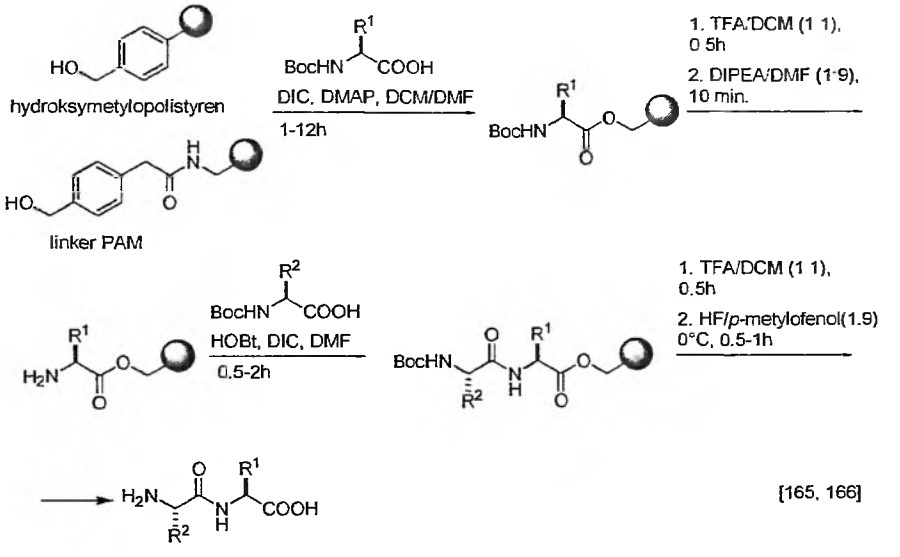


Schemat 37. Reagenty używane w reakcjach sprzęgania

Zasadniczo wykorzystywane są dwie strategie w syntezie łańcucha polipeptydowego na fazie stałej różniące się zastosowaną grupą ochronną i związanymi z tym

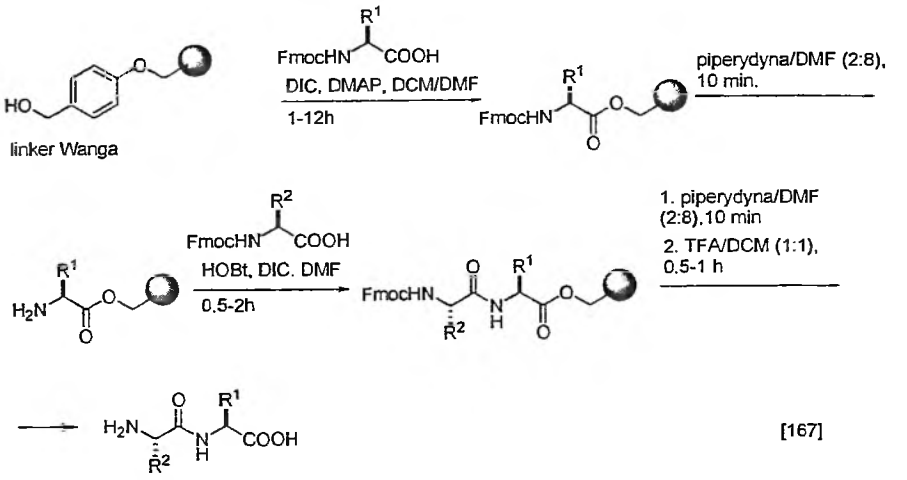
konsekwencjami. Stosuje się grupy ochronne: *t*-Boc albo Fmoc. Każda z metod syntezy ma swoje zalety, ale także i ograniczenia.

Schemat 38 przedstawia metodę otrzymywania peptydów z wykorzystaniem grupy blokującej *t*-Boc. Usuwanie grupy ochronnej *t*-butoksykarbonylowej zachodzi pod wpływem działania kwasu (50% TFA w DCM przez 30 minut). Jednakże potraktowanie łańcucha peptydowego kwasem, niesie za sobą pewne ryzyko rozerwania nowo utworzonych wiązań amidowych lub przedwczesnego odłączenia łańcucha polipeptydowego od nośnika. Ryzyko takie jest zminimalizowane, gdy syntezę prowadzi się wykorzystując łącznik PAM. Jest on około 100 razy bardziej odporny na działanie kwasu niż hydroksymetylopolistyren [162]. Do syntezy peptydów α-tioestrów jako nośnik wykorzystywano też żel arylohydrazynowy [163]. Strategia oparta na zastosowaniu grupy ochronnej *t*-Boc umożliwia syntezę peptydów zawierających nie więcej niż 140 aminokwasów [164].



Schemat 38. Synteza łańcuchów peptydowych z użyciem grupy ochronnej *t*-Boc

Drugim sposobem umożliwiającym otrzymywanie łańcuchów polipeptydowych jest wykorzystanie grupy ochronnej Fmoc (fluorenylometoksykarbonylowej). Zdejmowanie grupy Fmoc zachodzi w środowisku zasadowym pod wpływem roztworu piperydyny (20%) w DMF przez kilka minut. Reakcje syntezy peptydów z zastosowaniem grupy ochronnej Fmoc umożliwiają wykorzystanie nośników polimerycznych wrażliwych na działanie kwasów (żywicy Wanga, SASRIN, żywicy 2-chlorotritylowej, CPG, poliakryloamidowej). Metoda ta umożliwia syntezę peptydów złożonych nawet ze 166 aminokwasów [168].

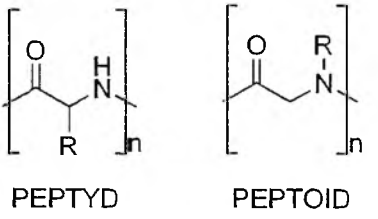


Schemat 39. Synteza łańcuchów peptydowych z użyciem grupy ochronnej Fmoc

W literaturze można znaleźć wiele przykładów na selektywne odbezpieczanie grup ochronnych aminokwasów. Ostatnio Trivedi i wsp. zaprezentowali wykorzystanie roztworu kwasu siarkowego w 1,4-dioksanie do odbezpieczania grupy *t*-Boc [169]. Cavelier i wsp. w tym celu wykorzystali triflan trimetylsililowy [170].

1.6.3. Otrzymywanie peptoidów

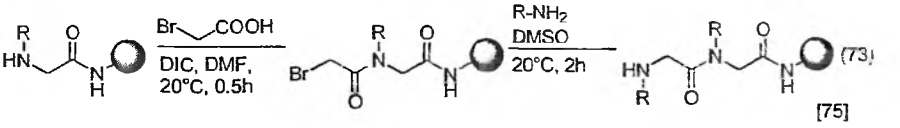
Peptoidy [oligo(*N*-alkilo)glicyny, peptydomimetyki], podobnie jak peptydy należą do grupy związków określanych wspólnym mianem oligoamidów. Różnica pomiędzy peptydem i peptoidem wynika z faktu przesunięcia o jedną pozycję łańcuchów bocznych (R) w peptoidzie w stosunku do szkieletu cząsteczki peptydu, tj. z atomu węgla na atom azotu.



Schemat 40. Wzór ogólny peptydu i peptoidu

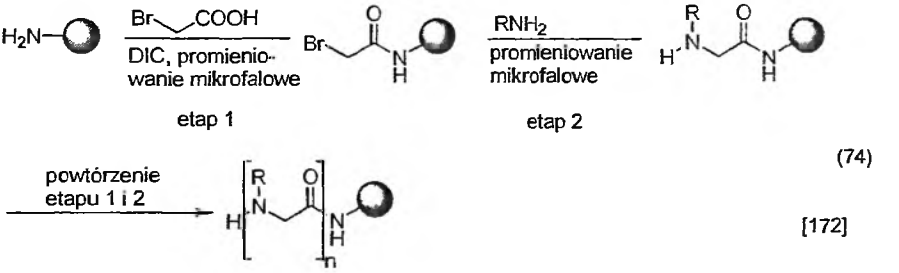
Typowa synteza peptoidów na fazie stałej charakteryzuje się brakiem stosowania grup ochronnych w cząsteczkach przyłączanych monomerów [171]. Peptoidy powstają w wyniku reakcji acylowania grupy aminowej zakotwiczonej na nośniku.

Pierwszy etap tworzenia peptoidu polega na wytworzeniu wiązania amidowego pomiędzy kwasem α-bromooctowym a glicyną. Drugi etap to reakcja podstawienia atomu bromu alifatyczną, bądź aromatyczną aminą. Reakcje są powtarzane, dzięki czemu łańcuch peptoidu ulega wydłużeniu (schemat 41).



Schemat 41 Otrzymywanie *N*-podstawionych oligoglicyn na nośniku polistyrenowym

Schemat 42 przedstawia syntezę peptydomimetyków pod wpływem promieniowania mikrofalowego. Według autorów użycie mikrofal daje większą wydajność i czystość otrzymanych produktów w porównaniu do reakcji prowadzonej w warunkach standardowych [172].



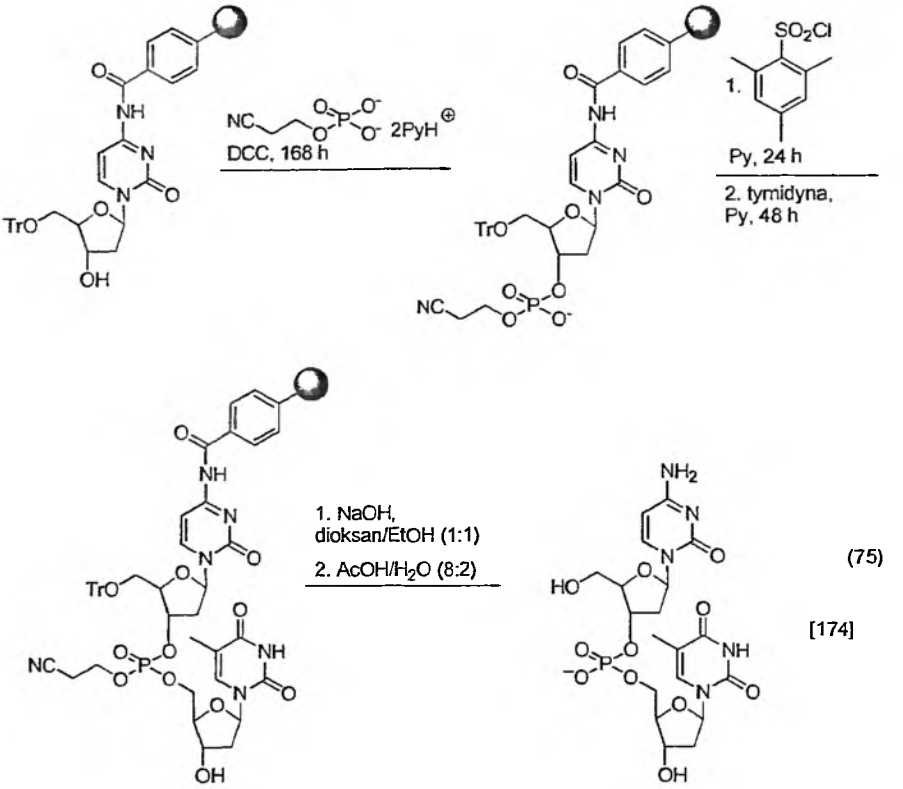
Schemat 42. Otrzymywanie *N*-podstawionych oligoglicyn na nośniku polistyrenowym z użyciem promieniowania mikrofalowego

Metody otrzymywania peptoidów wykorzystywane na żelach polistyrenowych z sukcesem przeniesiono na membrany celulozowe. Wenschuh i wsp. otrzymali bibliotekę peptoidów *N*-alkiloglicyny na membranach celulozowych [173].

1.7. Otrzymywanie oligonukleotydów

Pierwszą syntezę oligodeoksynukleotydów na fazie stałej opisał Letsinger w 1965 roku [174] (schemat 43). Zakotwiczony na nośniku polimerycznym, poprzez grupę aminową cytozyny, nukleozyd został poddany reakcji z cyjanoetylofosforanem pirydyniowym i DCC. W celu wytworzenia wiązania fosforoestrowego zaktywowano immobilizowany nukleozyd za pomocą chlorku mezytylenosulfonylu. Do tak aktywowanego nukleozydu przyłączono tymidynę. Odłączenie odbezpieczo-

nego, wytworzonego dinukleotydu uzyskiwano w wyniku działania zasady (NaOH w roztworze dioksan/EtOH (1:1)), a następnie kwasu (roztwór $AcOH/H_2O$ (8:2)).

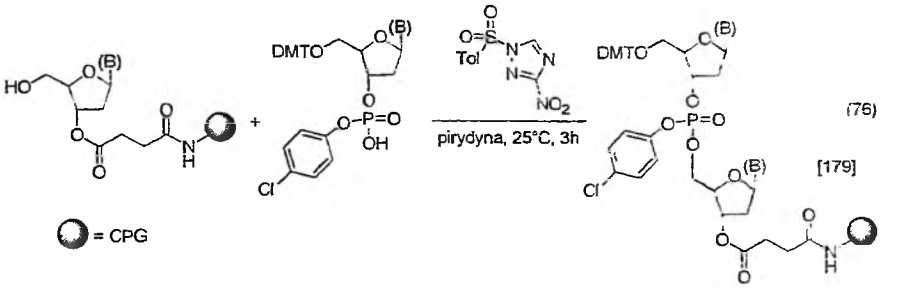


(75)

[174]

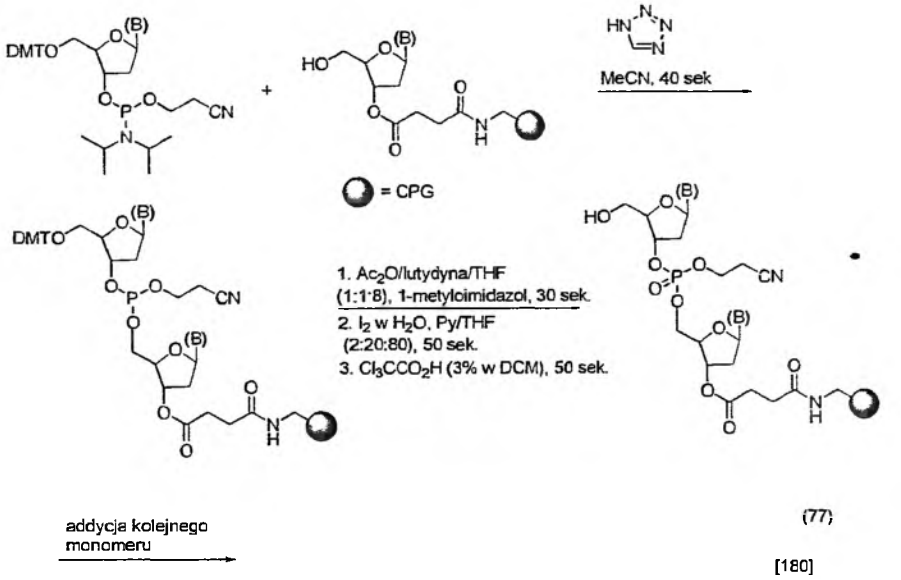
Schemat 43. Pierwsza synteza dinukleotydu przeprowadzona na fazie stałej

Późniejsze badania doprowadziły do zmodyfikowania syntezy Letsingera. Schemat 44 przedstawia strategię otrzymywania oligonukleotydów przez tworzenie wiązania triestru fosforowego. Do zabezpieczania fosforanu wykorzystywane są chlorofenole [175, 176] lub 2,2,2-trichloroetanol [177], które można selektywnie usunąć bez naruszenia oligonukleotydu, przy użyciu NaOH. W metodzie tej również jako oksydatywnie labilną grupę ochronną zastosowano pochodną tiofenolu [178]. W większości przypadków, pierwszy nukleozyd zostaje immobilizowany przez grupę 3'-hydroksylową, a nie jak wcześniej przez grupę 5'-hydroksylową (schemat 44).



Schemat 44. Strategia otrzymywania oligonukleotydów przez tworzenie wiązania triestru fosforowego

Kolejną wykorzystywaną metodą jest synteza wykorzystująca pochodne amidofosforynowe, która została zastosowana m.in. do otrzymywania oligodeoksynukleotydów (schemat 45) na nośniku polimerycznym. Na uwagę zasługuje fakt, że czas potrzebny do przemycia (30 s przy użyciu acetonitrylu po każdym etapie) i przyłączanie kolejnego nukleotydu (5 min), pozwala na szybkie otrzymanie oligonukleotydów. Otrzymano oligodeoksynukleotydy zawierające nawet 150 [180] połączonych ze sobą monomerów. Metoda amidofosforynowa [181] umożliwia także otrzymywanie cyklicznych oligorybonukleotydów [182, 183].



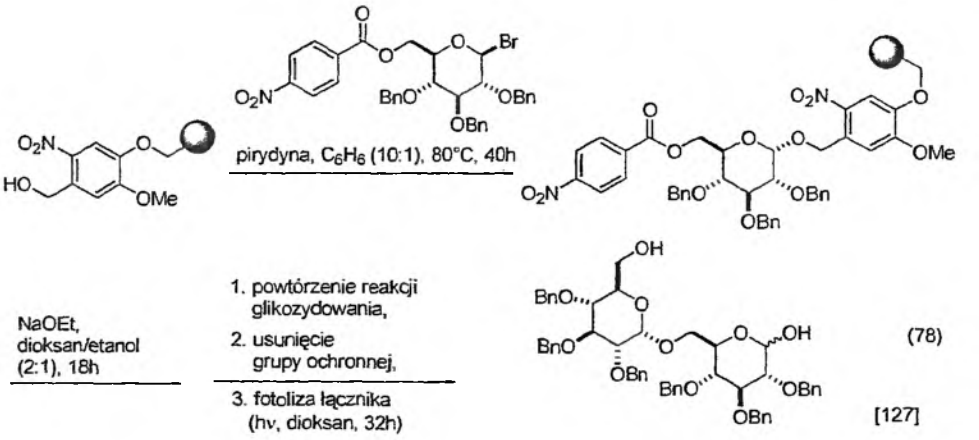
Schemat 45. Synteza oligonukleotydów na fazie stałej z użyciem pochodnych amidofosforynowych

Jedną z ważnych strategii syntezy oligonukleotydów są metody niewymagające zabezpieczania grup aminowych w zasadach azotowych (odnośniki lit. 3, 5 i 6

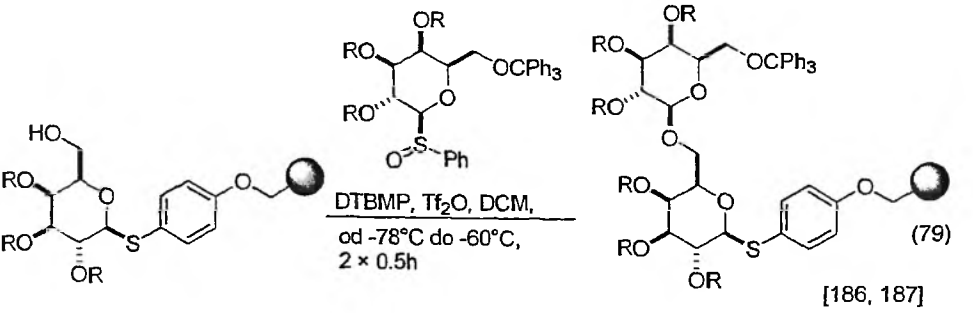
w [184]). Ostatnio Ohkubo i wsp. zaproponowali nową metodę syntezy oligodeoksynukleotydów, bez konieczności zabezpieczania grup aminowych w deoksyadenozynie i deoksycytydynie. W tym celu stosowali dodatek HOBt podczas tworzenia wiązań pomiędzy nukleotydami [184].

1.8. OTRZYMYWANIE OLIGOSACHARYDÓW

Pierwsze reakcje otrzymywania oligosacharydów na fazie stałej przeprowadzono na przełomie lat 60. i 70. XX wieku. Jedną z pierwszych metod była synteza glikozydów wykorzystująca reaktywność 1-bromopochodnych (schemat 46). Zastosowanie tego sposobu wymagało zablokowania wszystkich grup hydroksylowych w cząsteczce cukru w celu uniknięcia niepożądanych reakcji ubocznych.



Schemat 46. Synteza oligosacharydów z wykorzystaniem bromku glikozylu

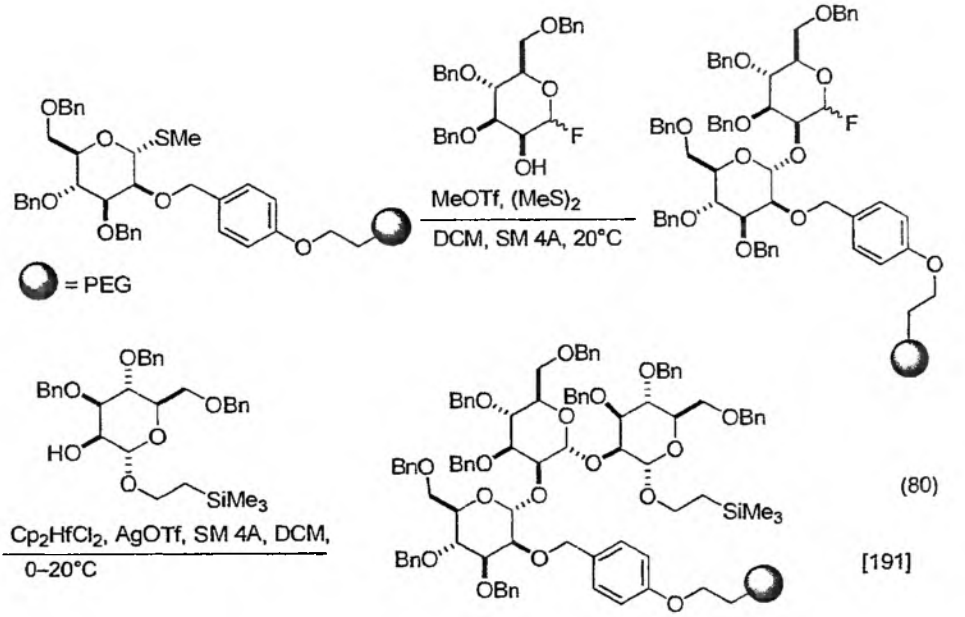


Schemat 47. Synteza oligosacharydów z wykorzystaniem sulfotlenków glikozydów

Inną bardziej współczesną reakcją otrzymywania oligosacharydów na fazie stałej jest metoda wykorzystująca sulfotlenki glikozydów (schemat 47). Sulfotlenek glikozydu reaguje z grupą hydroksylową immobilizowanego glikozydu w obecności 2,6-di-*tert*-butylo-4-metylopirydyny (DTBMP) i bezwodnika triflowego (Tf_2O) w niskiej temperaturze [185].

Reakcja umożliwia otrzymanie pożądanych oligosacharydów z wysoką chemoselektywnością. Metoda ta jest wykorzystywana w syntezie bibliotek oligosacharydów na fazie stałej [188].

Synteza oligosacharydów z udziałem tioeterów glikozydowych, wykorzystuje fakt, że tioetery glikozydowe mogą być przeprowadzane w reaktywne odczynniki glikozydujące, przez *S*-metylowanie z wykorzystaniem MeOTf lub $[Me_2SSMe^+][OTf^-]$ powstającego *in situ* z $(MeS)_2$ i MeOTf. Glikozydacja z piranozylotioeterem może zostać przeprowadzona z każdym donorem glikozydowym [189, 190]. Przykładowa synteza wykorzystująca tę metodę jest przedstawiona na schemacie 48.



(80)

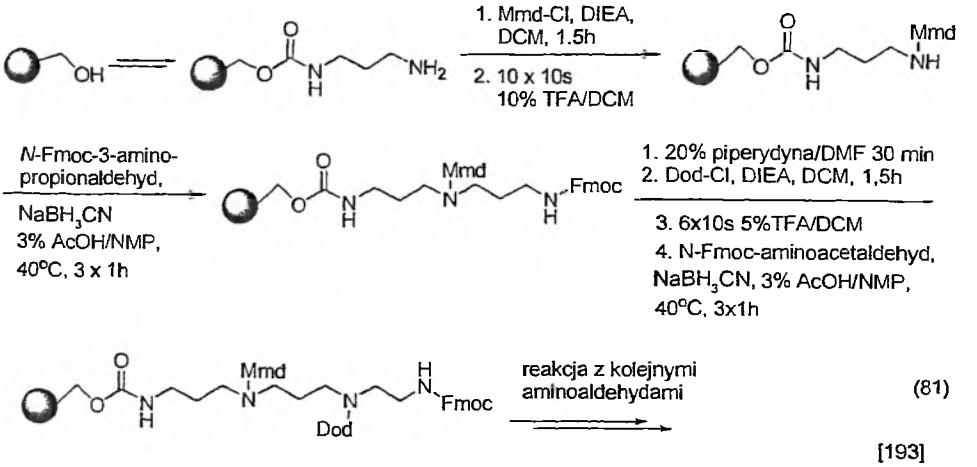
[191]

Schemat 48. Synteza oligosacharydów z wykorzystaniem tioeterów glikozydów

Schmidt i wsp. opracowali metodę otrzymywania oligosacharydu, która nie różni się czasem ani wydajnością od syntezy w roztworze. W tym celu zastosowali nowy linker, oraz odpowiednio przygotowany donor glikozydowy [192].

1.9. OTRZYMYWANIE AMIN I POLIAMIN

Jönsson zaproponował otrzymywanie poliamin z wykorzystaniem nośnika polimerycznego [193]. W tym celu immobilizowano diaminy, jako pochodne kwasu węglowego, na żelu hydroksymetylopolistyrenowym. Następnie, w wyniku selektywnego monoalkilowania przy użyciu chlorków benzhydrylu (chlorku 4-metoksyditylu, 4-MeOPhCHCl(Ph), Mmd-Cl; chlorku 4,4'-dimetoksyditylu, 4-MeOPhCHCl-(4-MeOPh), Dod-Cl), a w kolejnym etapie redukcyjnego aminowania, z wykorzystaniem aldehydów z grupa aminową zabezpieczoną przy użyciu Fmoc, otrzymano łańcuch poliaminy (schemat 49).



Schemat 49. Synteza poliamin na fazie stałej

Jönsson wraz z Undenem wykorzystał tę samą metodę do otrzymania poliamin tak na fazie stałej jak i w roztworze [194].

Richter i Andersen wykorzystali degradację Curtiusa do otrzymywania pierwszorzędowych amin na fazie stałej. Metoda ta wykorzystuje azydek difenylofosforylowy [195].

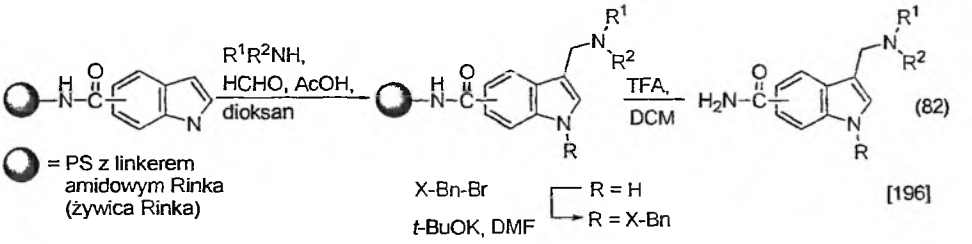
2. REAKCJE TWORZENIA WIĄZAŃ WĘGIEL–WĘGIEL NA FAZIE STAŁEJ

Reakcje tworzenia wiązania węgiel–węgiel, w odróżnieniu od reakcji transformacji grup funkcyjnych (FGI), umożliwiają tworzenie szkieletu węglowego a zatem, podobnie jak w klasycznej syntezie w roztworze, odgrywają szczególną rolę w syntezie niskocząsteczkowych związków organicznych w SPOS.

2.1. REAKCJA MANNICHA

Reakcję Mannicha stosuje się głównie w celu otrzymywania β-aminoketonów i β-aminoaldehydów. Przeprowadzana w roztworze stanowi jedną z bardziej użytecznych reakcji w chemii organicznej. Jednakże w reakcjach na fazie stałej cieszy się ona mniejszym zainteresowaniem. W podstawowej wersji jest to reakcja enoli z aldehydem mrówkowym i drugorzędową aminą. W SPOS reakcja zachodzi najczęściej pomiędzy aminami drugorzędowymi, związkami karbonylowymi i związkami o charakterze C–H kwasów. Reakcja ta wprowadza grupę aminometylową w miejsce enolizującego wodoru. Najczęściej prowadzona jest w wersji dwuetapowej – czyli w pierwszej kolejności generowana jest sól iminiowa, która następnie ulega kondensacji z odpowiednim odczynnikiem nukleofilowym.

Przykładem reakcji Mannicha jest synteza szeregu 3-aminometyloindoli zaproponowana przez Zhanga i wsp. [196]. Substratami są pochodne indolu podstawione w pozycjach 5 i 6 grupą karboksylową i zakotwiczone na amidowym żelu Rinka. Po odłączeniu roztworem TFA w DCM, otrzymano produkty o wysokiej czystości z bardzo dobrą wydajnością (schemat 50).



Schemat 50. Reakcja Mannicha na fazie stałej

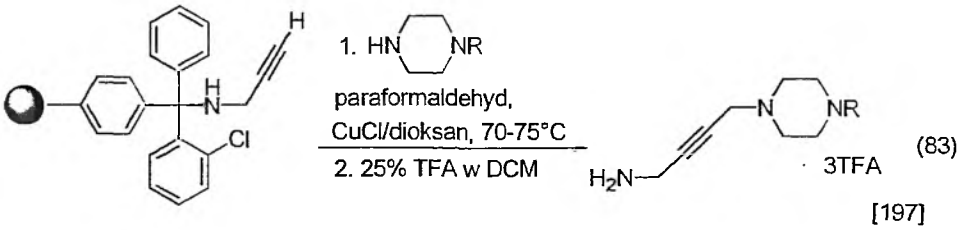
Tabela 1. Zestawienie reagentów i wydajności uzyskanych produktów w reakcji przedstawionej na schemacie 50

Pozycja H_2NCO	R	R^1R^2NH	Wydajność (%)	Czystość (%)
5-	H	pirolidyna	93	100
5-	H	piperydyna	90	93
5-	H	Me_2NH	95	88
5-	H	Bn(Me)NH	95	83
5-	H	$BnNH_2$	90	78
6-	H	pirolidyna	95	86
6-	H	Et_2NH	95	89

Tabela 1. Ciąg dalszy

Pozycja H_2NCO	R	R^1R^2NH	Wydajność (%)	Czystość (%)
6-	Bn	piperydyna	93	84
6-	4-FBn	pirolidyna	100	88
6-	4-MeBn	piperydyna	100	82

Związki posiadające terminalne wiązanie potrójne C≡C mogą pełnić rolę odczynników nukleofilowych w reakcji Mannicha na fazie stałej (schemat 51). Reakcje prowadzono w dioksanie, stosując nadmiar aminy drugorzędowej, stechiometryczną ilość CuCl, którego zadaniem jest przyśpieszanie aminometylowania, oraz nadmiar paraformaldehydu. Związek posiadający terminalne wiązanie potrójne C≡C zakotwiczony na nośniku polimerycznym w wyżej wymienionych warunkach ulega reakcji Mannicha z utworzeniem odpowiednich aminometylowanych adduktów. Zaletami tej reakcji są wysoka wydajność i brak konieczności tworzenia imin [197, 198].

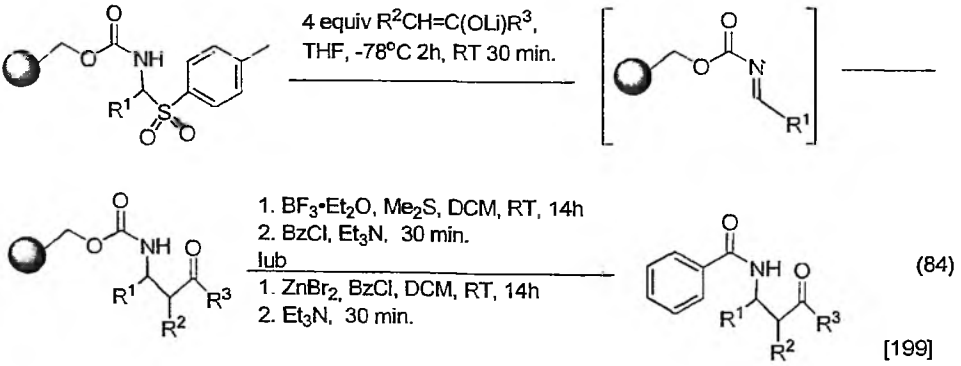


(83)

[197]

Schemat 51 Reakcja Mannicha z udziałem immobilizowanego związku z terminalnym wiązaniem acetylenowym

Enders i Schunk generowali iminy *in situ*, które ulegały reakcji typu Mannicha z różnymi nukleofilami dając β-aminoketony (schemat 52).



(84)

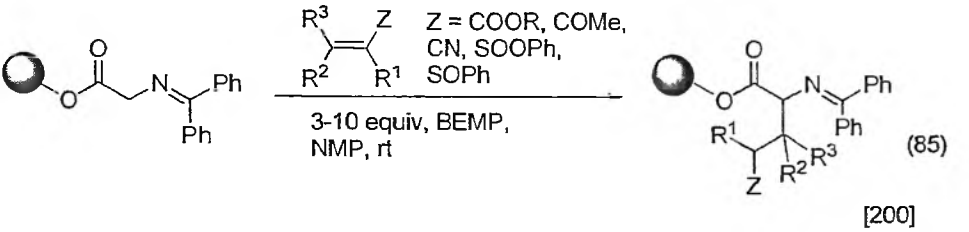
[199]

Schemat 52. Otrzymywanie β-aminoketonów w reakcji typu Mannicha

2.2. REAKCJA MICHAELA

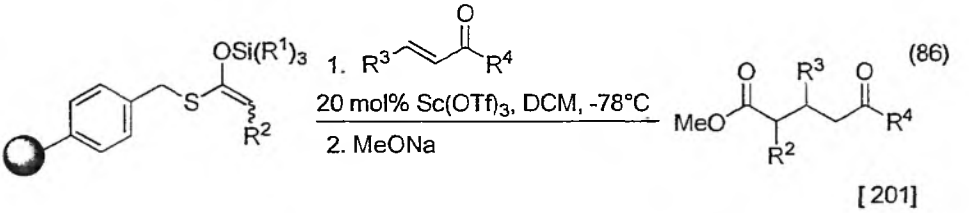
Jedną z podstawowych reakcji tworzenia wiązań węgiel–węgiel jest reakcja Michaela, polegająca na addycji 1,4 karboanionu lub jego ekwiwalentu syntetycznego (np. eteru sililowego) do wiązania podwójnego węgiel–węgiel α,β-nienasyconego związku karbonylowego.

W przykładzie przedstawionym na schemacie 53 następuje addycja karboanionu iminy glicyny do pochodnych akrylowych z użyciem nadmiaru (3 ekwiwalenty molowe) silnej zasady Schwesingera, 2-*tert*-butyloimino-2-dietyloamino-1,3-dimetyloperhydro-1,3,2-diazafosforinu (BEMP). Reakcję prowadzono przez 16 godzin w temperaturze pokojowej w roztworze NMP. W tych warunkach powstaje produkt charakteryzujący się dużą czystością. Jeżeli używa się bardziej reaktywnych akceptorów (np. akrylonitryli), wymagany nadmiar akceptora nie przekracza 1.5 ekwiwalenta molowego. Inaczej jest w przypadku mniej reaktywnych akceptorów (np. podstawionych akrylonitryli), które wymagają 10-krotnego nadmiaru molowego. Produkty otrzymano z wydajnością wynoszącą 61–88%, a ich czystość mieściła się w granicach 74–88%.



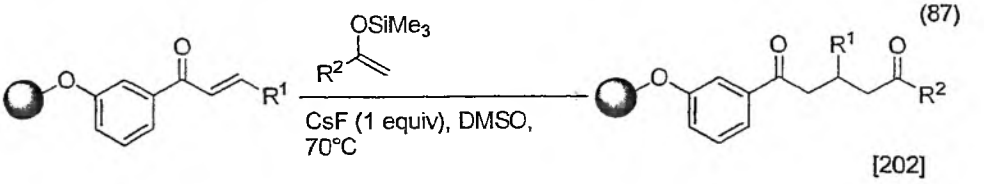
Schemat 53. Reakcja Michaela immobilizowanego substratu o charakterze C–H kwasu

Addycja eteru sililowego tioestru zakotwiczonego na nośniku polimerycznym do α,β-nienasyconych ketonów (schemat 54) prowadzono w obecności kwasu Lewisa $Sc(OTf)_3$. Odłączenie produktu następuje przy użyciu MeONa.



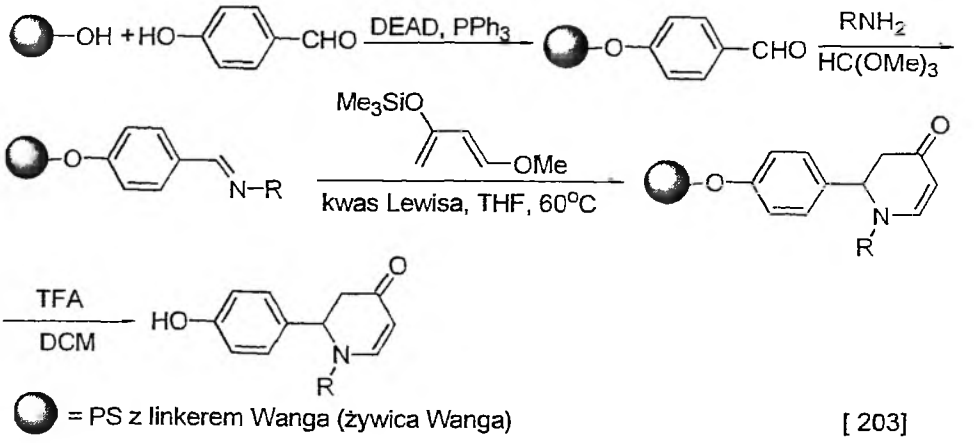
Schemat 54. Reakcja Michaela immobilizowanego eteru sililowego tioestru

Ellingboe i wsp. opisali syntezę immobilizowanych 1,5-diketonów [202]. W tym celu zakotwiczony na nośniku polimerycznym α,β-nienasycony keton poddano reakcji z eterem TMS enolu ketonu. Reakcję przeprowadzono w DMSO w obecności CsF. Najlepsze wyniki uzyskano, gdy podstawnik R^1 był grupą arylową lub był nieenolizującą grupą alifatyczną, a podstawnik R^2 był grupą arylową lub heteroaromatyczną. Produkt syntezy jest wykorzystywany jako związek pośredni w syntezie bibliotek związków pirydynowych (schemat 55).



Schemat 55. Reakcja Michaela eteru sililowego enolu z immobilizowanym α,β-nienasyconym ketonem

Innym przykładem jest otrzymywanie amin na fazie stałej przez Wilsona i Wanga wykorzystujące dien Danishefsky'ego. Po zakotwiczeniu *p*-hydroksybenzaldehydu na żelu Wanga, przeprowadzono reakcję z aminą, w obecności ortomrówczanu metylu jako czynnika dehydratującego i otrzymano iminę. Następnie iminę poddano reakcji z dienem Danishefsky'ego w obecności kwasu Lewisa ($ZnCl_2$, $AlCl_3$, Et_2AlCl, $TiCl_4$, $BF_3{\cdot}OEt_2$ lub $Yb(OTf)_3$) w suchym THF. Najlepsze wyniki otrzymano wykorzystując jako kwas Lewisa $Yb(OTf)_3$. Produkt został odłączony przy pomocy 50%-owego roztworu TFA/DCM (schemat 56) [203].

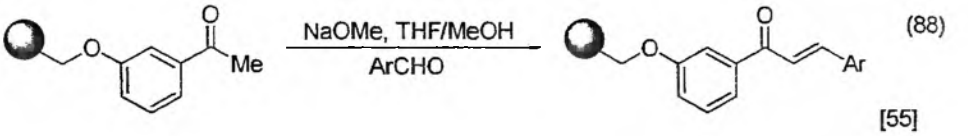


Schemat 56. Transformacja iminy w aminę na nośniku polimerycznym z wykorzystaniem reakcji dienu Danishefsky'ego

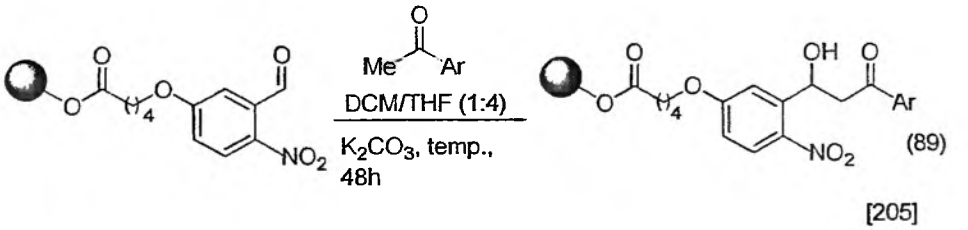
2.3. REAKCJA ALDOLOWA

Reakcja aldolowa jest reakcją przyłączenia enolu lub enolanu do elektrofilowego atomu węgla grupy karbonylowej z utworzeniem aldolu (β-hydroksyaldehydu lub β-hydroksyketonu), który może ulegać eliminacji dając α,β-nienasycony związek karbonylowy (mówimy wtedy o kondensacji).

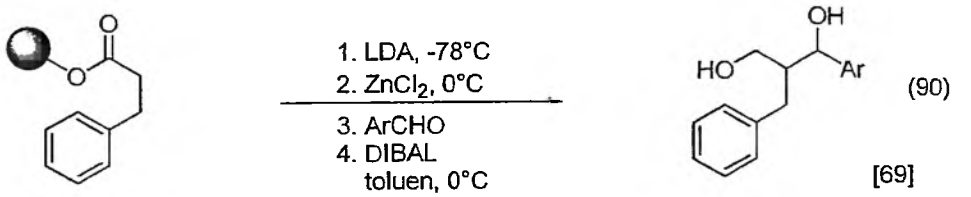
Reakcje aldolowe mogą z powodzeniem być przeprowadzane na nośniku polimerycznym. Szczególne zastosowanie w SPOS znalazły enolany litu, sodu, potasu i cynku [55, 69, 204–206]. Natomiast w syntezie stereoselektywnej na fazie stałej wykorzystywane są często enolany boru (schemat 61) [115, 207–209]. Poniżej podano typowe przykłady nie kierowanej (schematy 57, 58) i kierowanej (schematy 59–61) reakcji aldolowej z zastosowaniem immobilizowanych enolanów (donorów) lub immobilizowanych akceptorów karbonylowych.



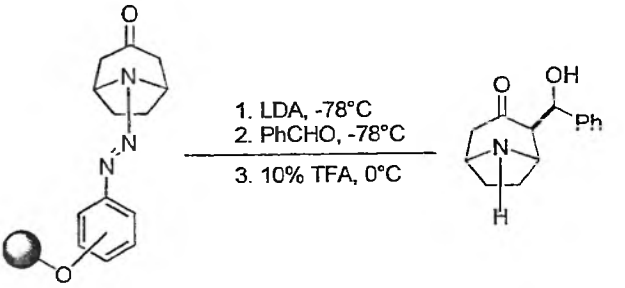
Schemat 57. Kondensacja aldolowa immobilizowanego na fazie stałej enolanu sodu z aldehydem



Schemat 58. Reakcja aldolowa enolanu potasu z ketonem immobilizowanym na fazie stałej



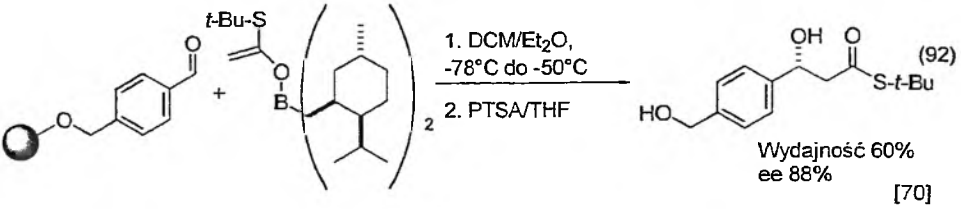
Schemat 59. Reakcja aldolowa immobilizowanego na fazie stałej enolanu cynku z aldehydem



(91)

[204]

Schemat 60. Reakcja aldolowa immobilizowanego na fazie stałej enolanu litu z aldehydem

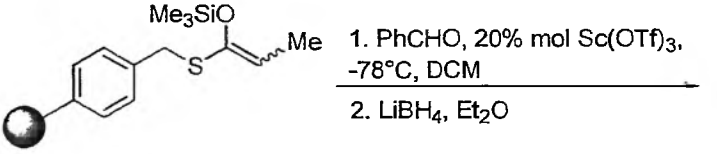


(92)

[70]

Schemat 61. Reakcja aldolowa enolanu boru z aldehydem immobilizowanym na fazie stałej

Reakcja aldolowa Mukaiyamy polega na tworzeniu aldolowych adduktów w wyniku reakcji aktywowanych kwasem Lewisa aldehydów z nukleofilami takimi jak: etery sillilowe enoli ketonów lub estrów. W reakcjach Mukaiyamy na fazie stałej wykorzystywano kwasy Lewisa takie jak: $Sc(OTf)_3$, $Yb(OTf)_3$ i $BF_3 \cdot Et_2O$.



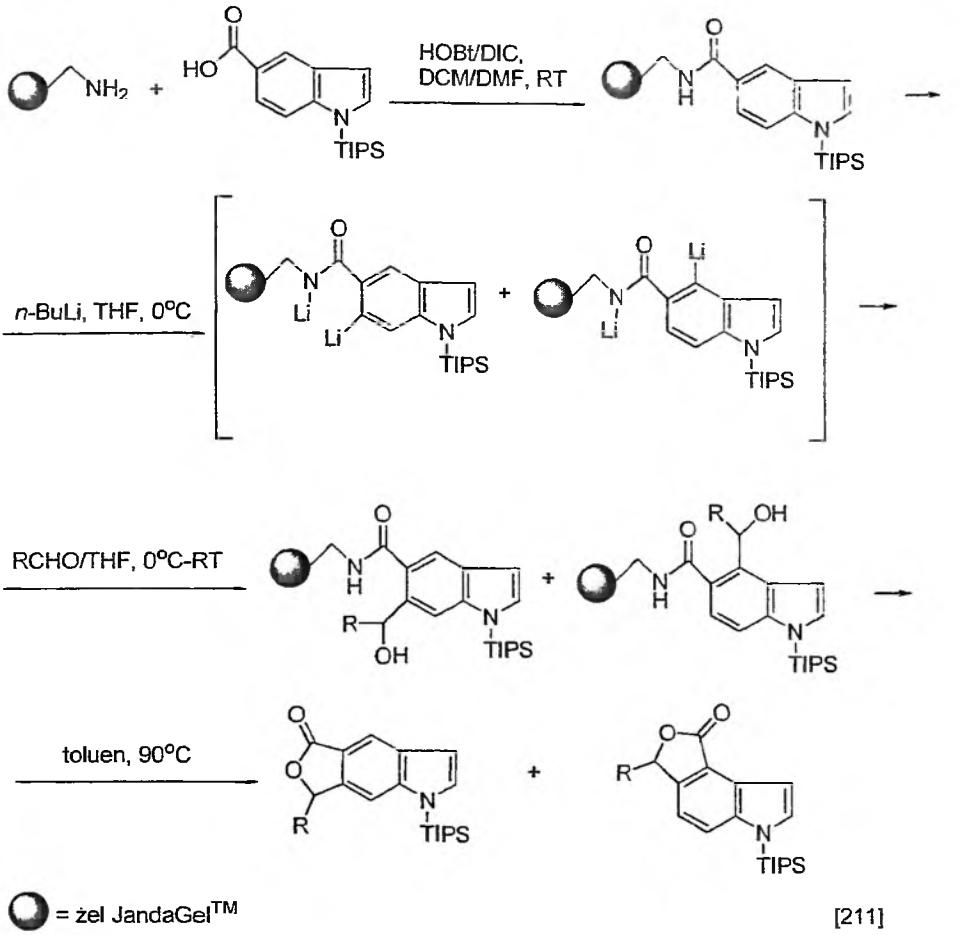
(93)

[210]

Schemat 62. Reakcja aldolowa Mukaiyamy na fazie stałej

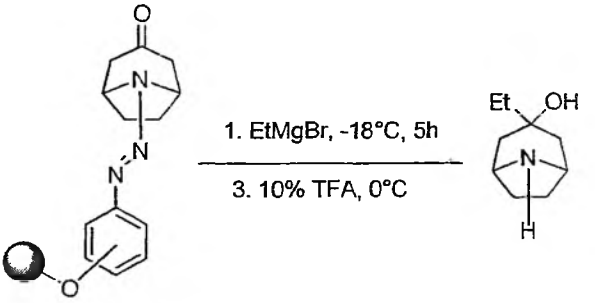
2.4. REAKCJA ADDYCJI POLARNYCH ZWIĄZKÓW METALOORGANICZNYCH DO WIĄZANIA KARBONYLOWEGO

Tois i Koskinen zaprezentowali litowanie 5-karboksyindoli na nośniku polimerycznym. Immobilizowany indol był *orto*-litowany i poddawany reakcji z pochodnymi benzaldehydu. W wyniku reakcji otrzymywano odpowiednie alkohole, które następnie poddawano reakcji cyklizacji, co prowadziło do odłączenia produktu z nośnika (schemat 63).



[211]

Schemat 63. *orto*-Litowanie indolu na fazie stałej



(94)

[204]

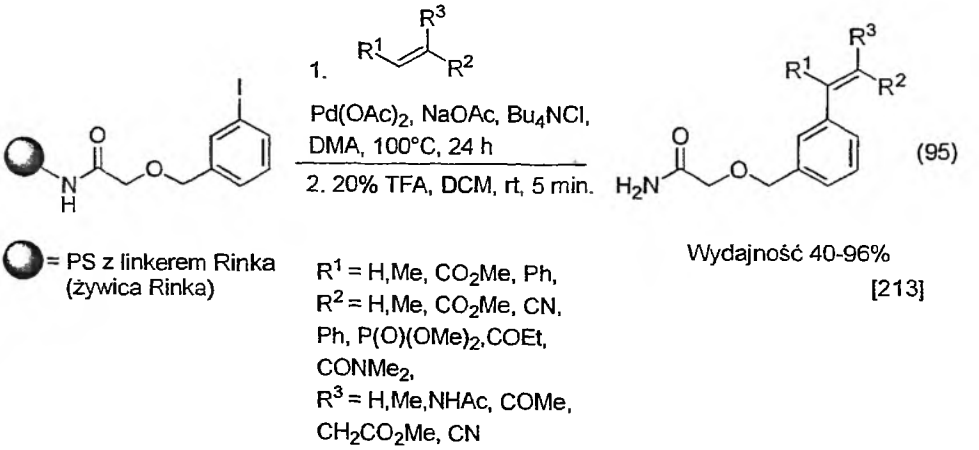
Schemat 64. Reakcja odczynnika Grignarda z immobilizowanym ketonem

Reakcje Grignarda zostały opisane w artykule przeglądowym Franzéna [212]. Opublikowana literatura nie zawiera jednak wielu przykładów reakcji odczynników Grignarda ze związkami immobilizowanymi na fazie stałej. Przykładową reakcję związku Grignarda z immobilizowanym ketonem zaprezentowano na schemacie 64.

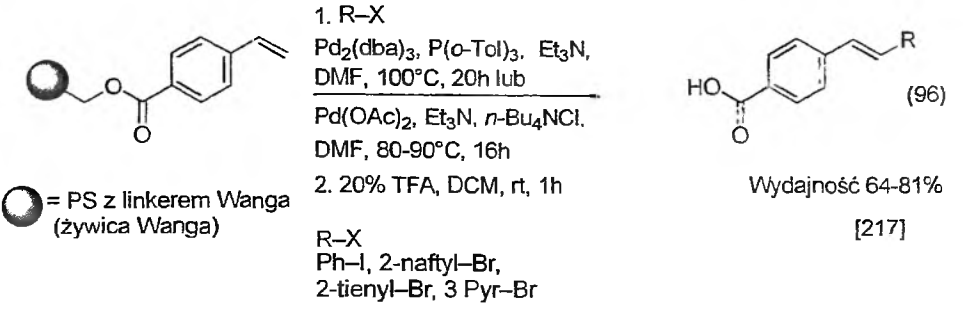
2.5. REAKCJA HECKA

Reakcja Hecka pozwala na tworzenie wiązania węgiel–węgiel poprzez alkenylowanie lub arylowanie olefin z wykorzystaniem katalizatorów palladowych. W ostatnich latach reakcja Hecka przeprowadzana na nośniku polimerycznym stała się bardzo skutecznym narzędziem nie tylko w syntezie związków niskocząsteczkowych, ale przede wszystkim w reakcjach syntezy skomplikowanych struktur makrocyklicznych. Łagodne warunki reakcji Hecka pozwalają na otrzymywanie produktów posiadających liczne grupy funkcyjne, także elektronodonorowe. Reakcje są prowadzone zazwyczaj w środowisku gazu obojętnego w celu uniknięcia dezaktywacji katalizatorów tlenem z powietrza, oraz przy użyciu zasad takich, jak K_2CO_3, Bu_4NCl, Et_3N. Jako katalizatory stosuję się sole palladu(II) np. $Pd(OAc)_2$ lub kompleksy palladu(0) np. $Pd(dba)_3$, $PdCl_2(dppf)$, $Pd(PPh_3)_4$.

Międzycząsteczkowa reakcja Hecka. Popularność międzycząsteczkowej reakcji Hecka jest spowodowana głównie dostępnością substratów: halogenków winylowych, arylowych oraz olefin. Dużą zaletą międzycząsteczkowej reakcji Hecka jest możliwość kotwiczenia zarówno halogenków (schemat 65) jak i alkenów (schemat 66) na różnych nośnikach.



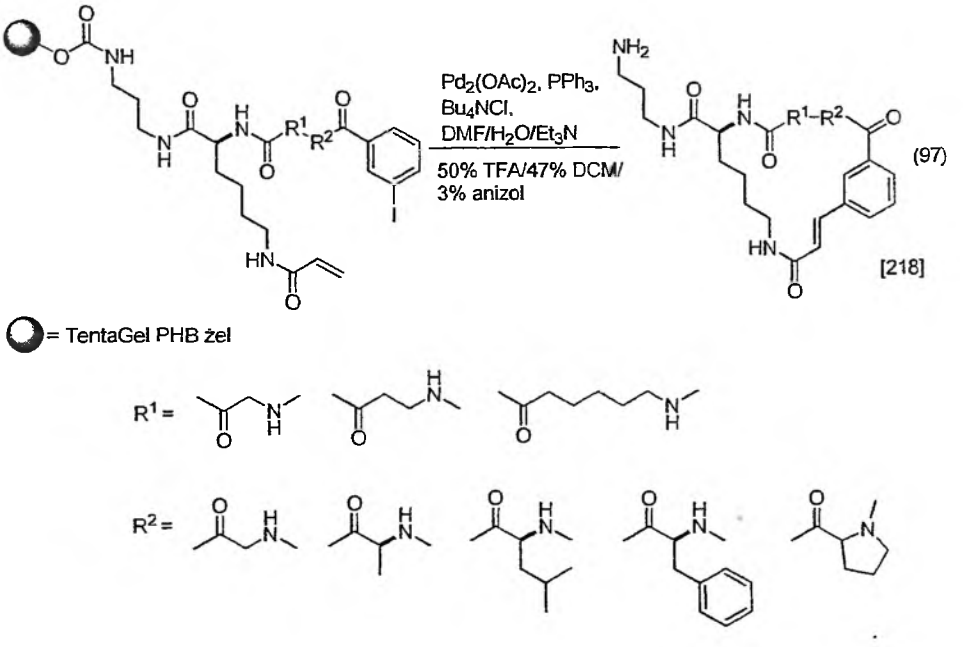
Schemat 65. Reakcja Hecka na fazie stałej z zakotwiczonym halogenkiem arylu



Schemat 66 Reakcja Hecka na fazie stałej z zakotwiczoną na nośniku polimerycznym olefiną

W międzycząsteczkowej reakcji Hecka jako nośniki powszechnie stosowane są: żel Merrifielda, żywica Wanga, Rinka, PAL, REM, żywica SASRIN, TentaGel i in. [214–216]. Zdecydowana większość reakcji zachodzi w typowych warunkach, a rodzaj nośnika polimerycznego nie ma decydującego znaczenia dla przebiegu reakcji.

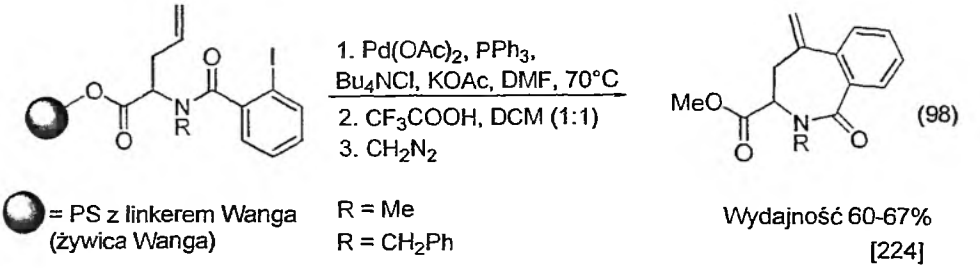
Wewnątrzcząsteczkowa reakcja Hecka. Jedną z głównych korzyści wewnątrzcząsteczkowej reakcji Hecka na fazie stałej jest możliwość wykorzystania zjawiska „pseudorozcieńczenia", czyli warunków symulujących nieskończone rozcieńczenie w roztworze.



Schemat 67. Wewnątrzcząsteczkowa reakcja Hecka. Otrzymywanie peptydowych pierścieni makrocyklicznych

Po raz pierwszy zjawisko „pseudorozcieńczenia" zostało wykorzystane w 1995 roku w opisie syntezy 20–24 członowych pierścieni makrocyklicznych (schemat 67). W literaturze znane są liczne przykłady tworzenia związków wielkopierścieniowych, szczególnie o charakterze peptydowym [218–220].

Obecnie znanych jest wiele przykładów wykorzystania wewnątrzcząsteczkowej reakcji Hecka na fazie stałej do otrzymywania rozmaitych pięcio-, sześcio- i siedmioczłonowych związków heterocyklicznych. Uzyskuje się w ten sposób pochodne indolowe [221, 222], benzofuranowe [222], benzoazepinowe [223, 224] i dihydroizochinolinowe [223, 225].



Schemat 68. Wewnątrzcząsteczkowa reakcja Hecka na fazie stałej. Otrzymywanie pochodnych benzoazepinowych

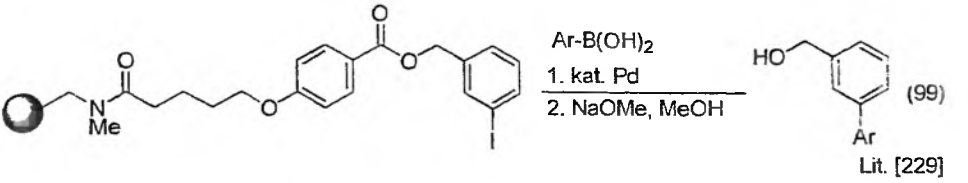
Schemat 68 przedstawia syntezę szkieletu pochodnych benzoazepin. Reakcji cyklizacji poddane zostały pochodne (*N*-butenylo)-2-jodobenzoamidowe (R = CH_3 i R = CH_2Ph). Jako katalizator zastosowano $Pd(OAc)_2$-PPh_3. Wydajność produktów po odłączeniu wynosiła odpowiednio 67% i 60% [224].

2.6. REAKCJA SUZUKI

Reakcją Suzuki (nazywaną też reakcją sprzęgania Suzuki-Miyaury) określa się katalizowane kompleksem palladu(0) sprzęganie arylowych lub winylowych związków boru (z reguły kwasów lub estrów boronowych) z halogenkami lub triflanami arylowymi lub winylowymi. Reakcja Suzuki jest reakcją szczególnie użyteczną w syntezie dienów i związków biarylowych [226].

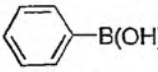
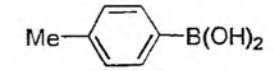
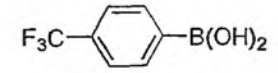
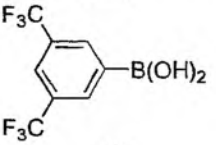
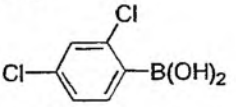
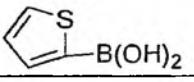
Reakcja Suzuki była wykorzystywana do przyłączenia fragmentu zawierającego krzem, który wykorzystano jako bezśladowy łącznik krzemowy [227, 228].

Jodobenzen zakotwiczony na fazie stałej reaguje z różnymi kwasami aryloboronowymi również z tymi, które w swej cząsteczce posiadają heteroatomy (schemat 69). Reakcja przebiega w mieszaninie dioksanu i wody w temperaturze 100°C [229].



Schemat 69. Reakcja Suzuki na fazie stałej z udziałem zakotwiczonej na nośniku polimerycznym pochodnej jodobenzenu

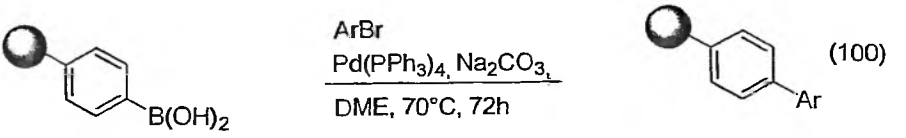
Tabela 2. Przykłady kwasów aryloboronowych stosowanych w reakcji Suzuki na fazie stałej (schemat 69)

Ar-B(OH)2	Warunki rakcji	Wydajność (%)
	A	95
	A	95
	A	90
	A	70
	A	89
	A B	69 80
	A B	66 86

Warunki reakcji:
A. Ar-B(OH)$_2$ (4 equiv), K_2CO_3 (9 equiv), Pd(OAc)$_2$ (10 mol%), dioksan/woda = (6:1), 100°C, 24 h;
B Ar-B(OH)$_2$ (8 equiv), K_2CO_3 (18 equiv), Pd(OAc)$_2$ (20 mol%), dioksan/woda = (6:1), 100°C, 24 h.

Reakcji Suzuki mogą również ulegać immobilizowane kwasy lub estry boronowe (schemat 70).

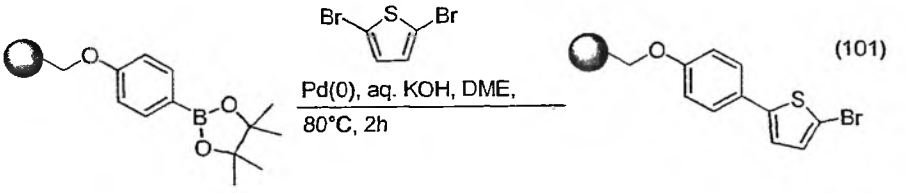
W reakcji Suzuki często wykorzystuje się ligandy fosfinowe. Capretta wykorzystał ligand fosfinowy, pochodną 2,4,8-trioksa-6-fosfa-adamantanu, w reakcji sprzęgania różnych halogenków arylowych z boronowymi kwasami w łagodnych warunkach (schemat 71) [232].



Ar = p-$HO_2CC_6H_4$, p-$HOCH_2C_6H_4$, p-HOC_6H_4, $P(C_6H_5)_3$, p-$H_2NCH_2C_6H_4$, p-$H_2NSO_2CH_2C_6H_4$, 2-tienyl, 2-furyl

Wydajność 23-86%

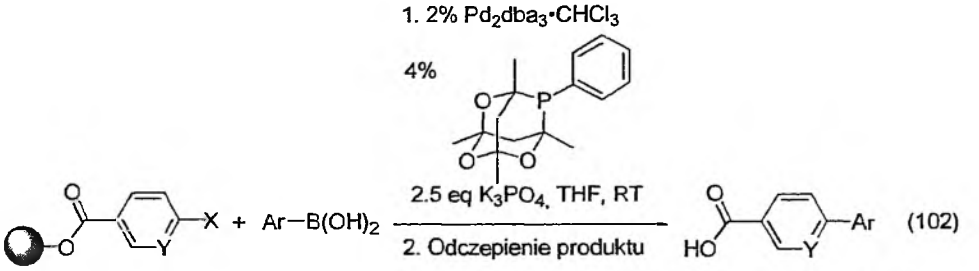
[230]



= PS z linkerem Wanga (żywica Wanga)

[231]

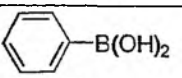
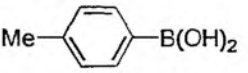
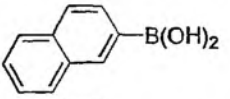
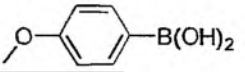
Schemat 70. Reakcja Suzuki na fazie stałej z udziałem zakotwiczonych na nośniku polimerycznym pochodnych kwasu aryloboronowego



[232]

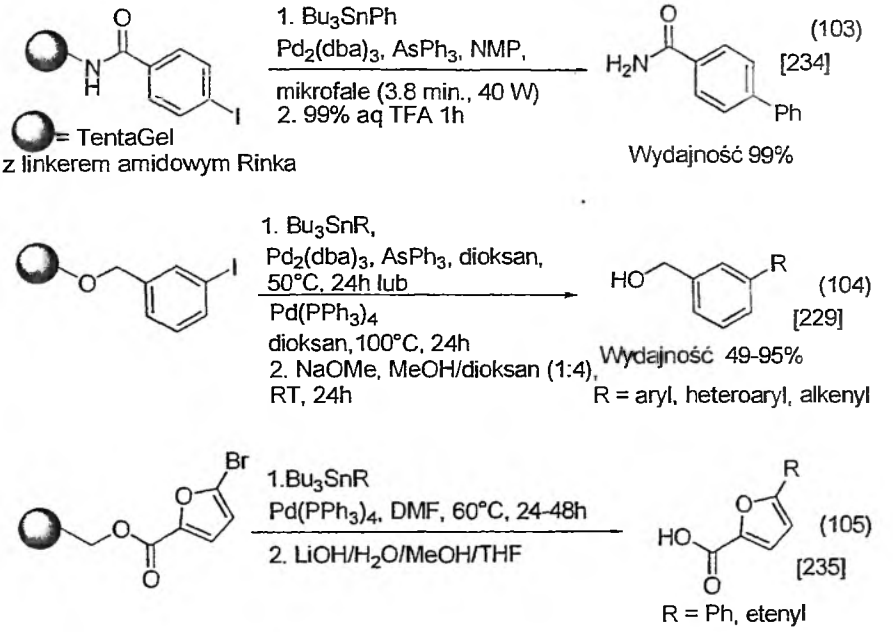
Schemat 71. Reakcja Suzuki z wykorzystaniem analogu fosfa-adamantanu jako liganda

Tabela 3. Przykłady kwasów aryloboronowych stosowanych w reakcji Suzuki na fazie stałej (schemat 71)

Ar-B(OH)$_2$	Konwersja % Y = CH, X = Br	Konwersja % Y = N, X = Cl
	96	91
	91	96
	92	90
	100	93

2.7. REAKCJA STILLEGO

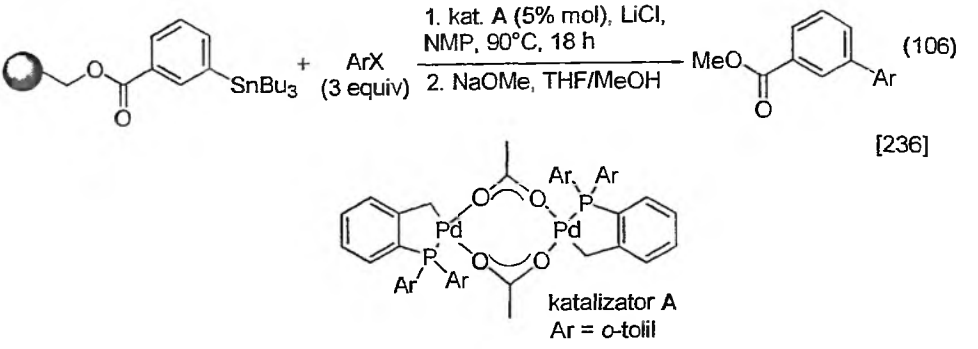
Reakcja Stillego była jedną z pierwszych reakcji typu sprzęgania krzyżowego (ang. *cross-coupling*) przeprowadzoną na nośniku polimerycznym [233]. Reakcją Stillego określa się katalizowaną palladem reakcję halogenków (głównie bromków i jodków) arylowych, alkenylowych oraz triflanów z arylowymi, winylowymi i alkinylowymi pochodnymi cyny (schemat 72).



Schemat 72. Reakcja Stille z immobilizowanym halogenkiem

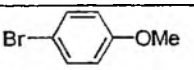
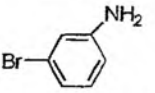
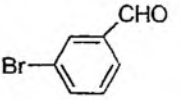
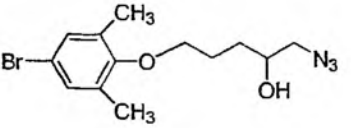
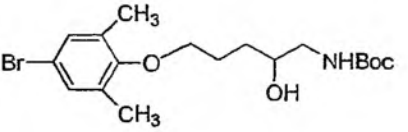
Reakcja Stillego przeprowadzona na podłożu polimerycznym niesie ze sobą określone korzyści. W reakcji na nośniku ułatwione jest usuwane z mieszaniny poreakcyjnej związków cyny. W reakcji przeprowadzonej w roztworze oczyszczenie produktu stanowi pewną trudność.

Schemat 73 przedstawia reakcję Stillego z immobilizowanym trialkiloarylowym stannanem. Reakcję prowadzono na nośniku polimerycznym w roztworze NMP, w temp. 90°C. W prezentowanym przekształceniu zastosowano katalizator palladowy **A** z dodatkiem LiCl, który pozwolił zwiększyć wydajność reakcji. Po odłączeniu z nośnika otrzymano produkt z wydajnościami wynoszącymi 80–95%.



Schemat 73. Reakcja Stillego z immobilizowanym związkiem cynoorganicznym

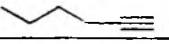
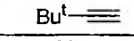
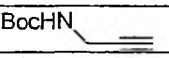
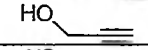
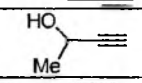
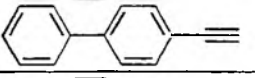
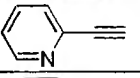
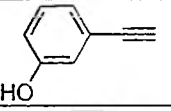
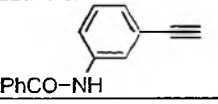
Tabela 4. Przykłady halogenopochodnych stosowanych w reakcji Stillego na fazie stałej (schemat 73)

Ar-X	Wydajność (%)
	>95
	>95
	>95
	>95
	80

2.8. REAKCJA SONOGASHIRY

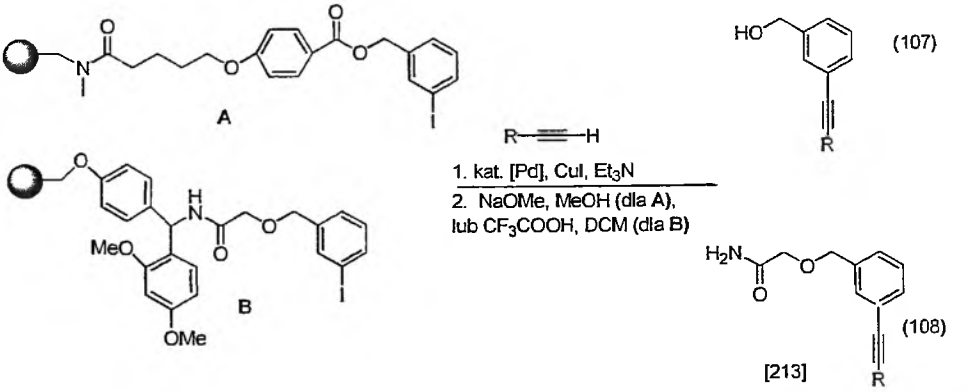
Kolejnym przykładem syntetycznie ważnej reakcji tworzenia wiązania węgiel–węgiel jest reakcja Sonogashiry. Jest to reakcja pomiędzy halogenkiem arylu i wiązaniem potrójnym w położeniu terminalnym, zachodząca w obecności katalizatora palladowego i związku miedzi(I).

Tabela 5. Przykłady związków zawierających terminalne wiązanie acetylenowe, stosowanych w reakcji Sonogashiry na fazie stałej (schemat 74)

Substrat	Alkin	Warunki reakcji	Wydajność (%)
A		A	95
A		A	95
A		A	96
A		A	93
A		A	95
B		B	79
B		C	95
B		C	83
B		C	95

Warunki reakcji:
A: alkin (4,0 equiv), $PdCl_2(Ph_3P)_2$ (10 mol%), CuI (20 mol%), Et_3N/dioksan = 1/2, t. pok., 24h;
B. alkin (8,0 equiv), $PdCl_2(Ph_3P)_2$ (20 mol%), CuI (40 mol%), Et_3N/dioksan = 1/2, t pok., 24h;
C: alkin (4,0 equiv), $PdCl_2(Ph_3P)_2$ (10 mol%), CuI (20 mol%), Et_3N/dioksan = 1/2, 50°C, 24h.

Prowadzenie reakcji na fazie stałej ułatwia usuwanie tworzących się produktów ubocznych, głównie dienów, które są produktami reakcji ubocznych zachodzących pomiędzy alkinami.



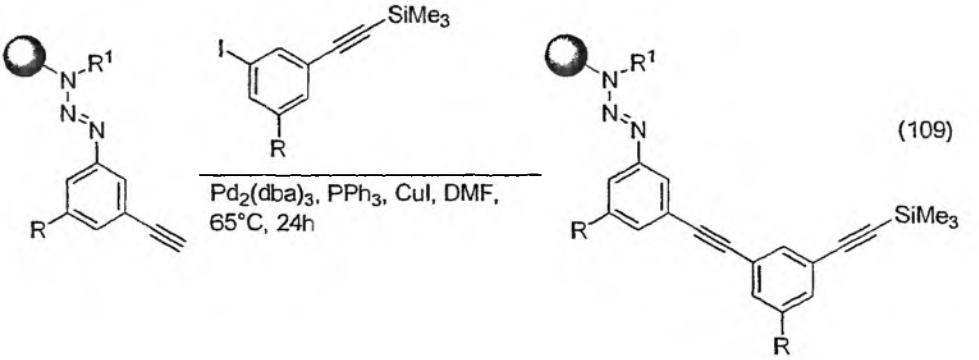
[213]

Schemat 74. Reakcje Sonogashiry z użyciem immobilizowanego jodku arylu

Schemat 74 przedstawia dwie reakcje sprzęgania różnych alkinów zawierających terminalne wiązanie potrójne węgiel–węgiel z zakotwiczonymi na dwóch różnych nośnikach jodkami arylowymi. W reakcji wykorzystano jako katalizator $PdCl_2(Ph_3P)_2$ i CuI oraz jako pomocniczą zasadę Et_3N. Reagenty alkinowe stosowano w znacznym nadmiarze [213].

Reakcję Sonogashiry stosowano również w syntezie pochodnych indolowych [237, 238] i pierścieni benzofuranowych [239].

Moore i wsp. przeprowadzili reakcję Sonogashiry na żelach triazenowych. Zastosowanie pochodnych trimetylosililoacetylenowych pozwoliło na przyłączenie siedmiu „jednostek" pochodnych acetylenowych z wydajnością 50% (schemat 75) [241]. Bräse i wsp. również wykorzystali żel triazenowy do przeprowadzenia reakcji Sonogashiry na fazie stałej [242].

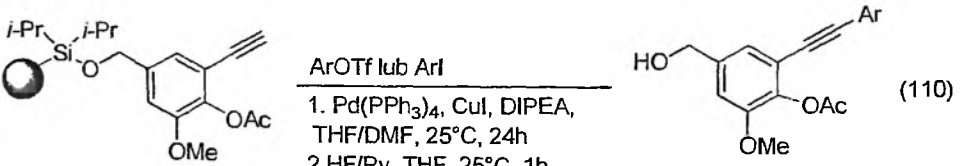


(109)

Wydajność 61%

[240]

Schemat 75. Przykłady reakcji Sonogashiry na fazie stałej z użyciem immobilizowanego alkinu



(110)

Wydajność 95-100%

[243]

ArOTf; Ar = Ph, p-$NO_2C_6H_4$, α-naftyl, β-naftyl, p-$Me(O)CC_6H_4$,

ArI; Ar = Ph, 2-tiofenyl, p-$NO_2C_6H_4$, p-FC_6H_4, o,p-$MeOC_6H_4$, α-naftyl, m,o-MeC_6H_4

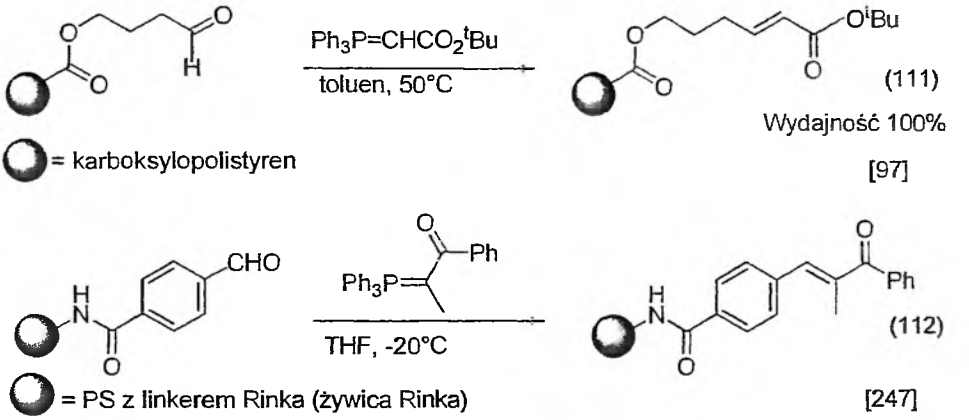
Schemat 76. Przykłady reakcji Sonogashiry na fazie stałej z użyciem immobilizowanego alkinu

Yang i wsp. przedstawili zastosowanie żeli z linkerem krzemowym. Reakcja Sonogashiry została przeprowadzana na jednym ziarnie polistyrenowym (schemat 76).

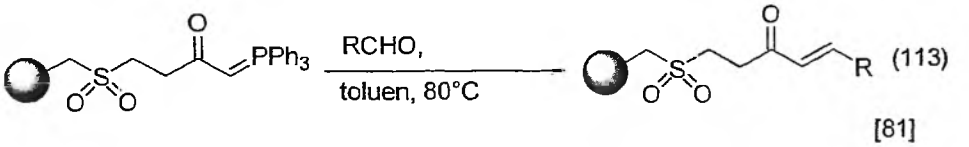
Erdelui i Gogoll zaprezentowali wykorzystanie reakcji Sonogashiry na SPOS z użyciem mikrofal. Reakcja sprzęgania jodków i bromków arylu z różnymi pochodnymi acetylenu przebiegała w ciągu 15–25 min. z bardzo dobrymi wydajnościami (89–98%) [244].

2.9. REAKCJA WITTIGA

Reakcja Wittiga jest jedną z głównych metod otrzymywania olefin zarówno w syntezie w roztworze, jaki i w SPOS. Na nośniku mogą być unieruchomione zarówno akceptory karbonylowe (schemat 77) [245] jak również ylidy (schemat 78) [90, 246].



Schemat 77. Reakcje Wittiga z immobilizowanymi związkami karbonylowymi

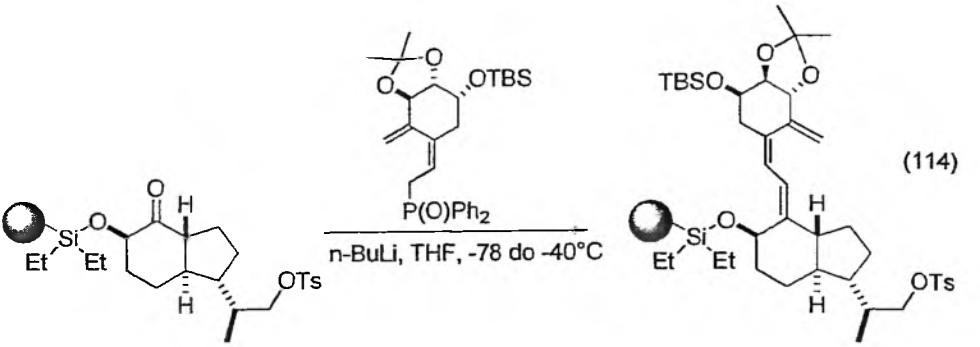


Schemat 78. Przykłady reakcji Wittiga z immobilizowanym ylidem

2.10. REAKCJA HORNERA-WADSWORTHA-EMMONSA

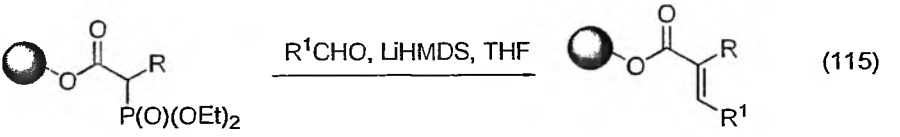
Reakcja Hornera-Wadswortha-Emmonsa będąca modyfikacją reakcji Wittiga umożliwia otrzymanie alkenów o konfiguracji *E*. W wyniku zastosowania stabilizowanych, silnie nukleofilowych karboanionów estrów kwasów fosfonowych. Reak-

cja Hornera-Wadswortha-Emmonsa znalazła szczególne zastosowanie w syntezie α,β-nienasyconych estrów i α,β-nienasyconych ketonów.



[248]

Schemat 79. Reakcja Hornera-Wadswortha-Emmonsa z immobilizowanym związkiem karbonylowym



[249]

Schemat 80. Reakcja Hornera-Wadswortha-Emmonsa na żywicy Wanga z immobilizowanym estrem kwasu fosfonowego

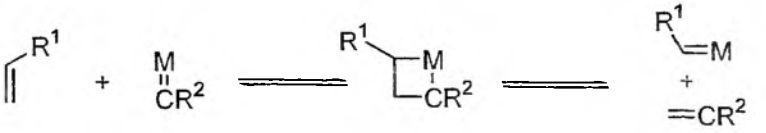
Reakcja Hornera-Wadswortha-Emmonsa została także wykorzystana do otrzymania cyklicznych peptydów zawierających wiązanie olefinowe [250].

2.11. REAKCJE METATEZY

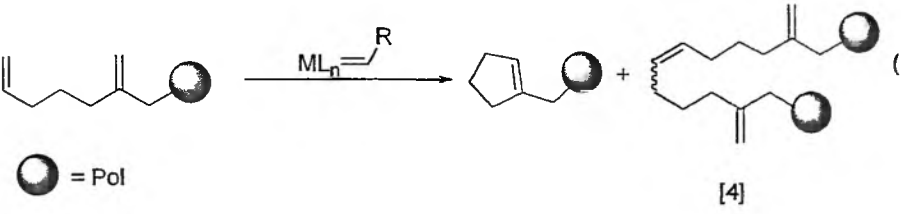
Reakcja metatezy (wymiany) olefin jest reakcją wymiany grup alkilidenowych między alkenami, przebiegającą z rozerwaniem istniejących i utworzeniem nowych wiązań podwójnych węgiel–węgiel (schemat 81). Wyróżnia się kilka typów reakcji metatezy:

- krzyżowa metateza olefin (ang. *Cross Metatesis*, CM),
- metatetyczne zamknięcie pierścienia (ang. *Ring-Closing Metathesis*, RCM),
- metatetyczne otwarcie pierścienia (ang. *Ring-Opening Metathesis*, ROM),
- metatetyczna polimeryzacja acyklicznych dienów (ang. *Acyclic Diene Metathesis Polymerization*, ADMET),

- metatetyczna polimeryzacja przebiegająca z otwarciem pierścienia (ang. *Ring-Opening Metathesis Polymerization*, ROMP),
- fotoindukowana metatetyczna polimeryzacja przebiegająca z otwarciem pierścienia (ang. *Photoinduced Ring-Opening Metathesis Polymerization*, PROMP).



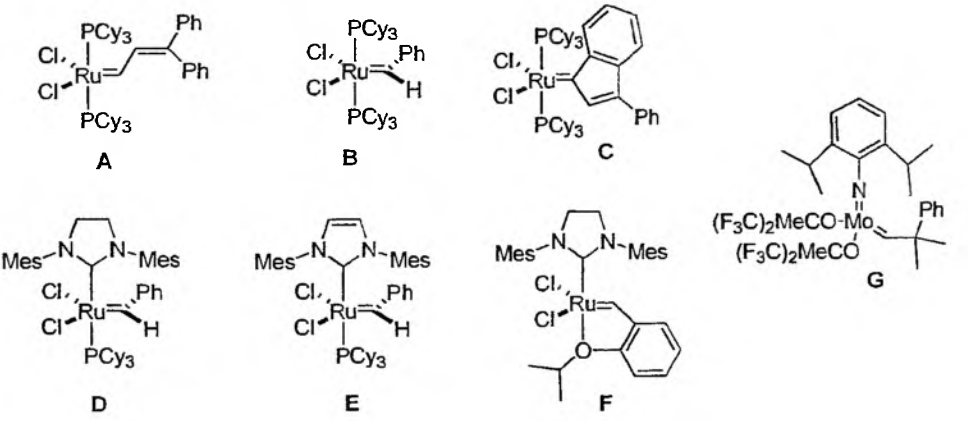
Schemat 81. Schematyczny przebieg reakcji metatezy



(116)

Schemat 82. Reakcja metatetycznego zamknięcia pierścienia na fazie stałej i jej ewentualny produkt uboczny

Reakcje metatezy, głównie metatetycznego zamknięcia pierścienia (RCM) i metatezy krzyżowej (CM), są nowoczesnymi i potężnymi narzędziami syntezy organicznej, które znalazły już zastosowania w SPOS. Zazwyczaj stosuje się te same katalizatory (schemat 83), które dają dobre wyniki w reakcjach w roztworze.

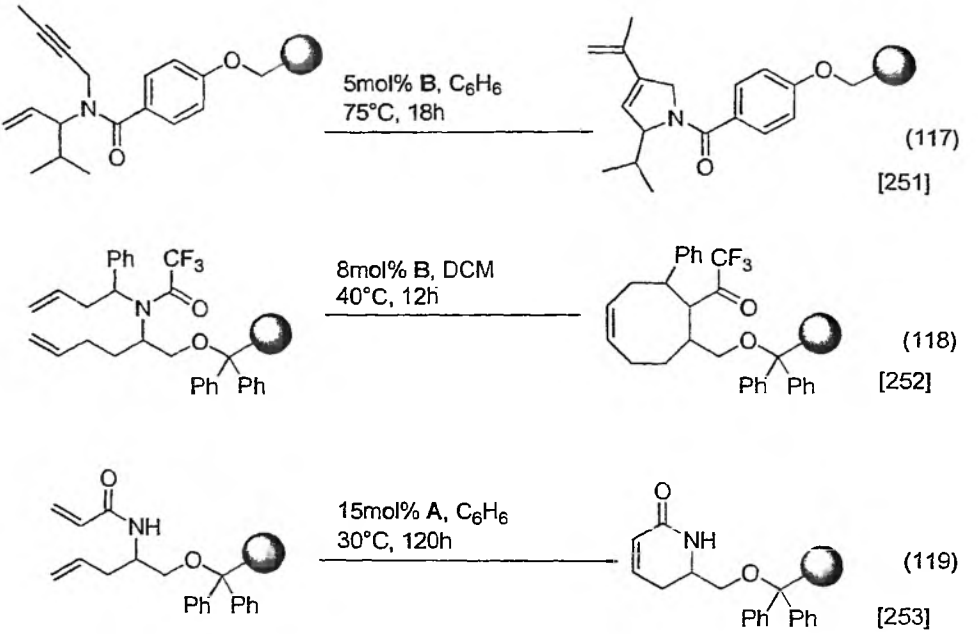


katalizatory pierwszej generacji: Grubbsa A, B i C Schrocka G
katalizatory drugiej generacji: Grubbsa D, Nolana E, Hoveydy F

Schemat 83. Przykładowe katalizatory wykorzystywane w reakcjach metatezy

Metatetyczne zamknięcie pierścienia (RCM) jest reakcją umożliwiającą syntezę związków cyklicznych. Najczęściej do przeprowadzenia tego typu reakcji stosowane są nośniki charakteryzujące się niskim stopniem funkcjonalizacji, przez co unika się reakcji ubocznej sprzęgania krzyżowego (ang. *Cross-Coupling*) (schemat 82) i zwiększa wydajność produktu cyklizacji.

Większość syntezowanych pierścieni to pierścienie pięcio- i sześcioczłonowe (schemat 84).

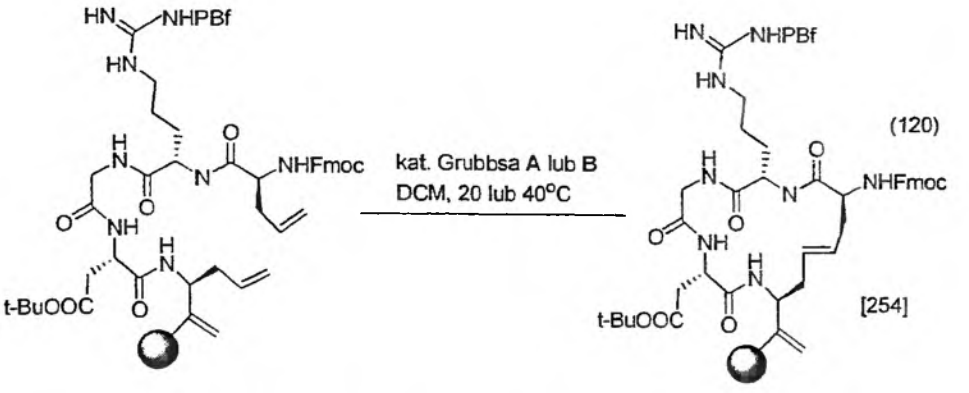


Schemat 84 Reakcje tworzenia związków cyklicznych w wyniku metatetycznego zamykania pierścienia

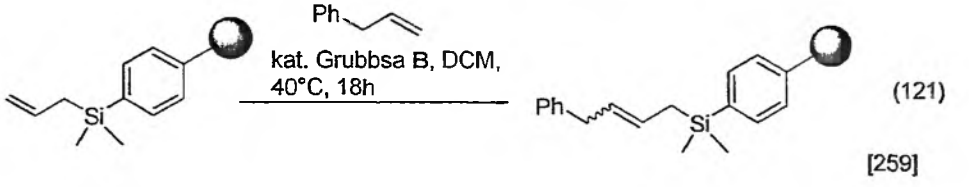
Krausz otrzymał pochodne porfirynywe wykorzystując cyklizację peptydów przez metatetyczne zamknięcie pierścienia. W tym celu wykorzystał żel amidowy Rinka MBHA, z zaczepionym odpowiednio zabezpieczonym liniowym peptydem. Reakcje prowadzono w roztworze DCM z użyciem katalizatora Grubbsa **A** lub **B** (schemat 85) [254].

Wykorzystując metatetyczne zamkniecie pierścienia, Barrett, Procopiou i ich wsp. zsyntetyzowali makrocykliczne peptydomimetyki [255].

Przykład metatezy krzyżowej na nośniku polimerycznym przedstawia schemat 86. Przykłady reakcji połączenia metatetycznego otwarcia pierścienia z metatezą krzyżową na fazie stałej zostały opisane przez Cuny i wsp. [256–258].



Schemat 85. Cyklizacja peptydów z wykorzystaniem metatetycznego zamknięcia pierścienia

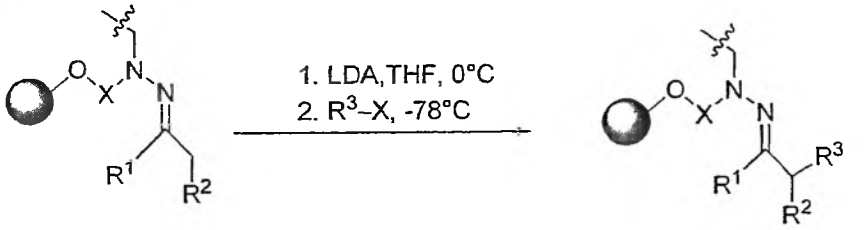


Schemat 86. Przykład metatezy krzyżowej na nośniku polimerycznym

2.12. REAKCJE ALKILOWANIA KETONÓW, DIKETONÓW, ESTRÓW I AMIDÓW

Procedury alkilowania na fazie stałej są w zasadzie analogicznie do procedur stosowanych w roztworze. W pierwszej kolejności cząsteczka substratu (C–H kwasu) poddawana jest działaniu silnej zasady (np. LDA, $KN(SiMe_3)_2$ lub BEMP) w celu deprotonowania. Dzięki temu w następnym etapie może dojść do reakcji odczynnika elektrofilowego z wytworzonym w wyniku deprotonowania anionem C–H kwasu, np. aza-enolanem (schemat 87), enolanem 1,3-diketonu lub ketoestru (schemat 88), enolanem estru (schemat 89) lub enolanem amidu (schemat 90).

O'Donnell i wsp. wykorzystali reakcje alkilowania na nośniku polimerycznym, do otrzymania aminokwasów niewystępujących w przyrodzie [266].



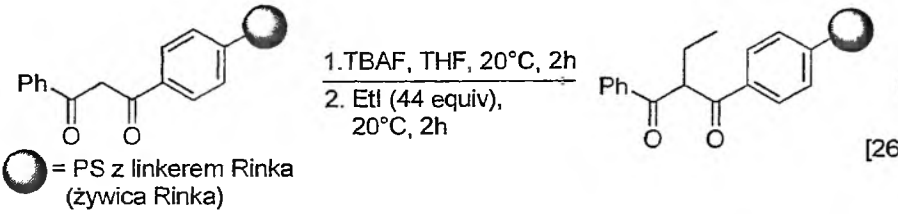
(122)

X = $(CH_2)_2$, $(CH_2)_3$, $(CH_2)_6$, $(CH_2)_3N(CH_2CH_2–)CH_2–$

R^1 i R^2 = alkil lub H

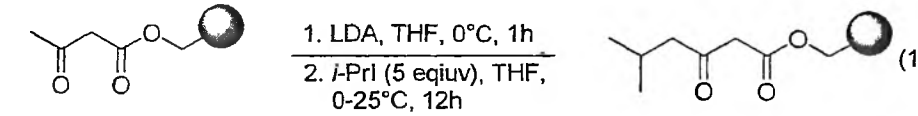
[143, 144, 260]

Schemat 87. Reakcje alkilowania ketonów immobilizowanych na fazie stałej w postaci hydrazonów



(123)

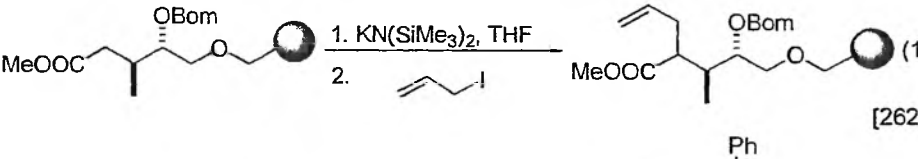
[261]



(124)

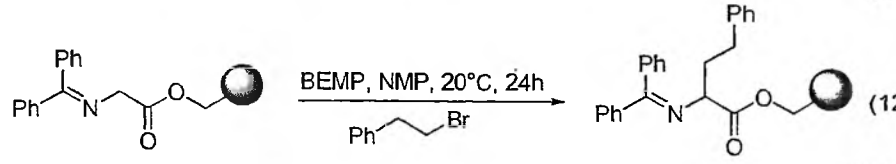
[44]

Schemat 88. Reakcje alkilowania diketonów na fazie stałej



(125)

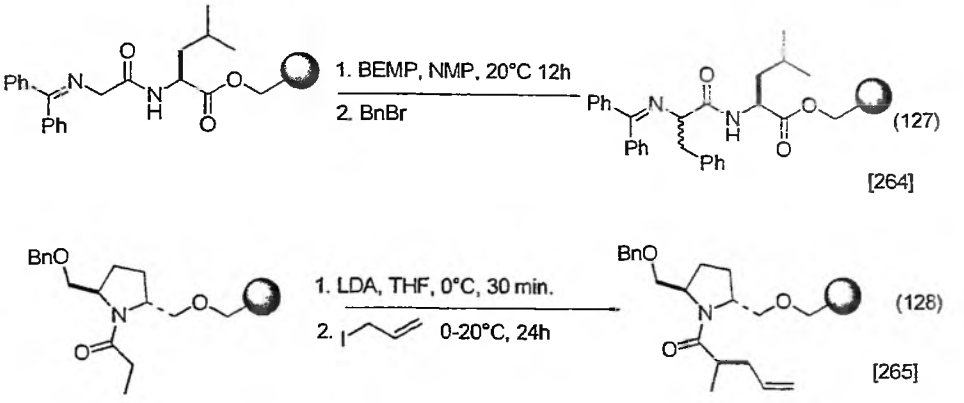
[262]



(126)

[263]

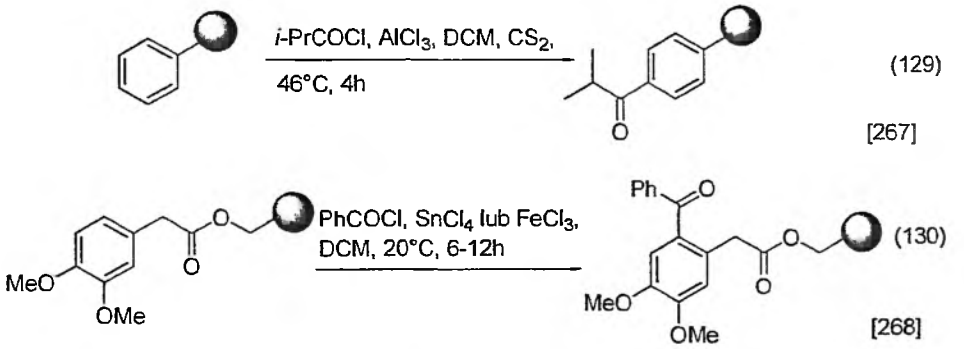
Schemat 89. Reakcje alkilowania estrów na fazie stałej



Schemat 90. Reakcje alkilowania amidów na fazie stałej

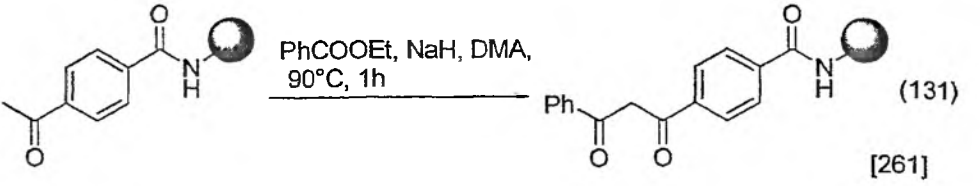
2.13. REAKCJE ACYLOWANIA ARENÓW I KETONÓW

Przebieg i warunki reakcji acylowania arenów na fazie stałej jest analogiczny do reakcji w roztworze. Immobilizowane areny reagują z chlorkami kwasowymi w obecności kwasów Lewisa np. $AlCl_3$, $SnCl_4$, $FeCl_3$ dając odpowiednie ketony (schemat 91).



Schemat 91. Reakcje acylowania arenów na fazie stałej

Schemat 92 przedstawia reakcję acylowania ketonu na fazie stałej. Keton jest przekształcany przy użyciu NaH w enolan, który następnie reaguje z elektrofilem – nieenolizującym estrem (benzoesanem etylu), tworząc produkt acylowania – diketon.

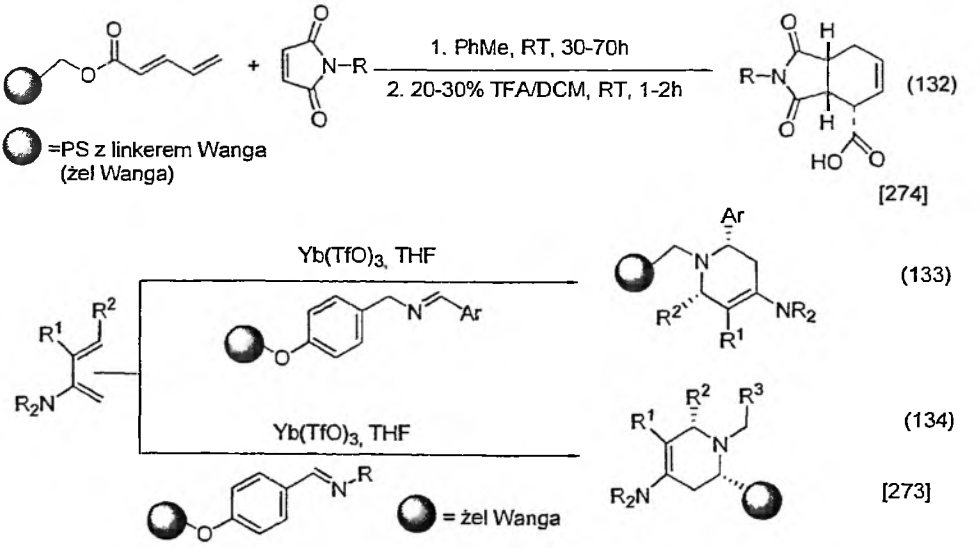


Schemat 92. Reakcje acylowania zakotwiczonego ketonu na fazie stałej

2.14. OTRZYMYWANIE ZWIĄZKÓW CYKLICZNYCH, REAKCJA DIELSA-ALDERA

Reakcja Dielsa-Aldera jest z powodzeniem przeprowadzana na fazie stałej. Na nośniku polimerycznym może być immobilizowany dien, jak również dienofil, co zaprezentował Yli-Kauhaluoma w swoim przeglądzie [269]. Warunki reakcji oraz regio- i stereoselektywność jest zbliżona do selektywności obserwowanych w reakcjach w roztworze [270–272].

Wykorzystując reakcje Dielsa-Aldera otrzymano pochodne 4-piperydonu, 4-aminopiperydyny (133, 134, schemat 93) [273] oraz heksahydro-1,3-dioksoindoli (132, schemat 93) [274]. Reakcja Dielsa-Aldera była też wykorzystywana do otrzymywania analogów dysidilidu [275], oraz immobilizowania antracenu z katalizatorem palladowym na fazie stałej [276]. Eycken i wsp. badali reakcje cykloaddycji Dielsa-Aldera 2(1*H*)-pirazynonów z dienofilami na fazie stałej z wykorzystaniem mikrofal [277].



Schemat 93. Reakcje Dielsa-Aldera na fazie stałej

3. REAKCJE WIELOSKŁADNIKOWE (MCRs) NA FAZIE STAŁEJ

Reakcje wieloskładnikowe (ang. *Multicomponent Reactions*, MCRs) w oryginalnym brzmieniu są definiowane jako: „*collection of subreactions taking place simultaneously and/or sequentially, each involving two reacting molecules*" [9]. MCRs obejmują zwykle kondensację nie mniej niż trzech, różnych reagentów w jednym etapie. Kolejność reagowania zależy wyłącznie od powinowactwa chemicznego reagentów i tworzących się produktów pośrednich. Z reguły substratami reakcji wieloskładnikowych są reaktywne związki karbonylowe (głównie aldehydy i kwasy karboksylowe) oraz aminy i ich pochodne. Z punktu widzenia syntezy na fazie stałej i chemii kombinatorycznej, należy wymienić następujące cechy reakcji MCR:

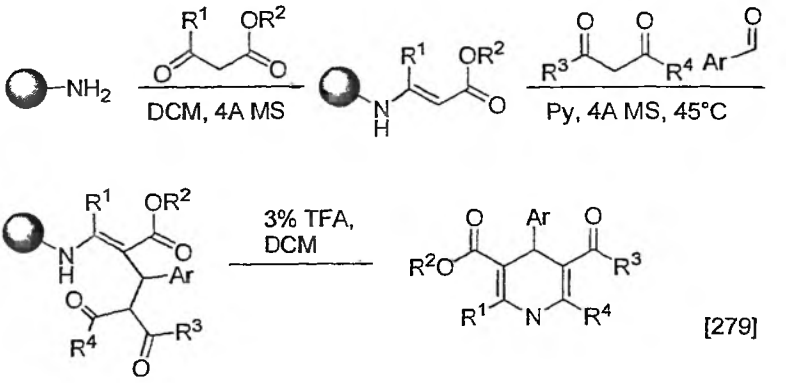
- wysoką wydajność i łagodne warunki reakcji oraz relatywnie krótki czas syntezy,
- możliwość syntezy makrocykli w tym także heterocykli z licznymi grupami funkcyjnymi,
- możliwość automatyzacji procesu syntezy pozwalająca na równoległe otrzymywanie bibliotek związków o dużej czystości (powyżej 90%) ze znacznymi wydajnościami,
- możliwość tworzenia różnych kombinacji co najmniej 3 różnych zbiorów reagentów ze względu na udział 3 różnych komponentów a zatem łatwość wprowadzenia różnorodności (rozumianej w sensie chemii kombinatorycznej – ang. *diversity*) w bibliotekach.

3.1. REAKCJA HANTZSCHA

Reakcję kondensacji Hantzscha można krótko opisać jako reakcję pomiędzy 2 molami β-ketoestru lub β-ketoamidu, 1 molem aldehydu i 1 molem aminy. Produktem reakcji jest 1,4-dihydropirydyna, która dalej może być utleniana do odpowiednich pochodnych pirydynowych.

Patel wykorzystał metodę Hantzscha do tworzenia 300-składnikowej biblioteki dihydropirydyn [278]. W tym celu na żywicy aminowej został zakotwiczony ester. Następnie wytworzony w tej reakcji enaminoester poddano reakcji z aldehydem (2 ekwiwalenty molowe) i pochodną β-dikarbonylową (2,3 ekwiwalenty molowe). Reakcję przeprowadzono w pirydynie w obecności sit molekularnych 4A, w temperaturze 45°C przez 24 h.

Produkt odłączono z nośnika polimerycznego stosując roztwór 3% TFA w DCM. Wydajności reakcji jak również czystość otrzymanych 1,4-dihydropirydyn nie zostały podane.

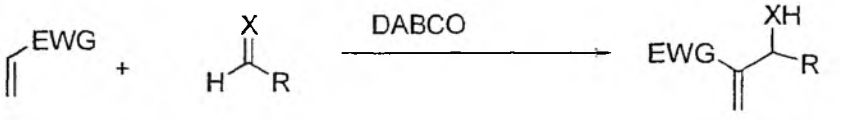


[279]

Schemat 94. Reakcja kondensacji Hantzscha na fazie stałej

3.2. REAKCJA BAYLISA-HILLMANA

Reakcja Baylisa-Hillmana obejmuje addycję aldehydów do terminalnych alkenów z grupami elektronoakceptorowymi (RCOOR, COR, SO_2R i itp., schemat 95).

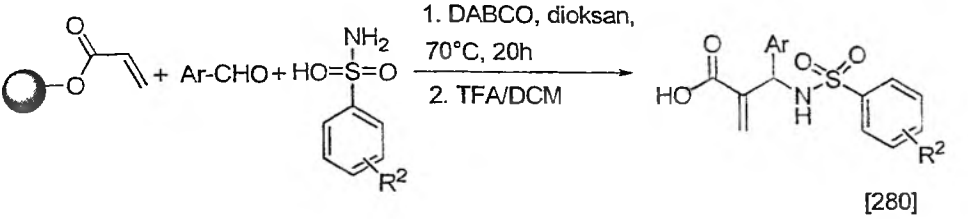


EWG = COOR, COR, CN, SO_2R, $CONR_2$
X = O, NH

Schemat 95. Reakcja Baylisa-Hillmana

Najczęściej stosowanym katalizatorem w reakcji Baylisa-Hillmana jest 1,4-diazabicyko[2.2.2]oktan (DABCO). Znane są ponadto inne katalizatory wykorzystywane w reakcji Baylisa-Hillmana, będące również aminami trzeciorzędowymi takie jak: 1,8-diazobicyklo[5.4.0]undeken-7 (DBU) i 3-hydroksychinolidyna (3-QDL).

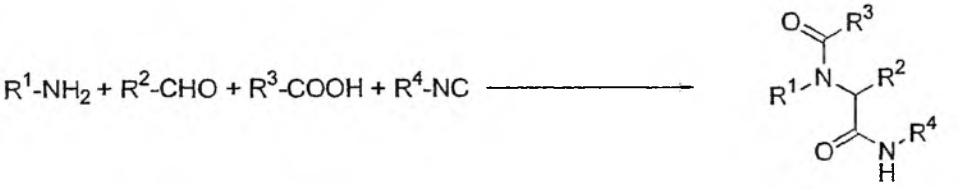
Przykładem trójskładnikowej reakcji Baylisa-Hillmana na fazie stałej jest synteza podstawionego sulfonamidu zaproponowana przez Junga i wsp. (schemat 96). Reakcję przeprowadzono wychodząc z kwasu akrylowego zakotwiczonego na żywicy 2-chlorotritylowej, aldehydów arylowych (16 ekwiwalentów molowych) i sulfonamidów (16–20 ekwiwalentów molowych). Reakcję prowadzono w roztworze dioksanu, przy użyciu DABCO (1,6 ekwiwalenta molowego) w czasie 20 godzin. Otrzymane produkty charakteryzowały się wysoką czystością (53–90%).



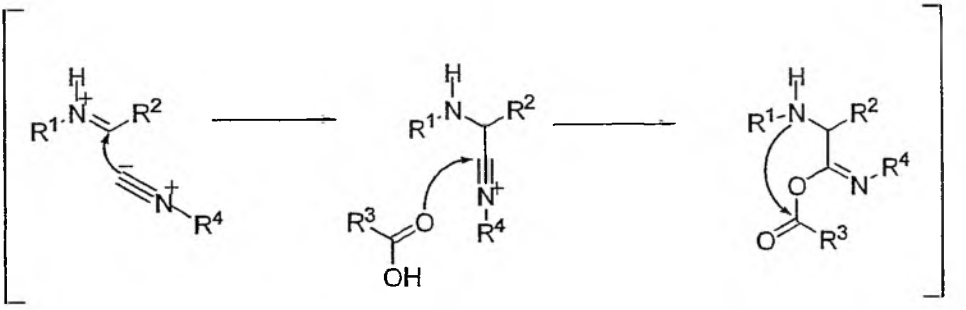
Schemat 96. Reakcja Baylisa-Hillmana na fazie stałej

3.3. REAKCJA UGIEGO (4CC)

Reakcja 4CC (ang. *four-component condensation*; schemat 97) po raz pierwszy została opisana w 1959 roku. Polega ona na kondensacji aldehydów z izonitrylami i aminami. Produktami reakcji Ugiego są amidy α-aminokwasów. Postulowany mechanizm tej reakcji został przedstawiony na schemacie 98, a jego głównym etapem jest tworzenie wiązania węgiel–węgiel pomiędzy kationem iminowym a izonitrylem.



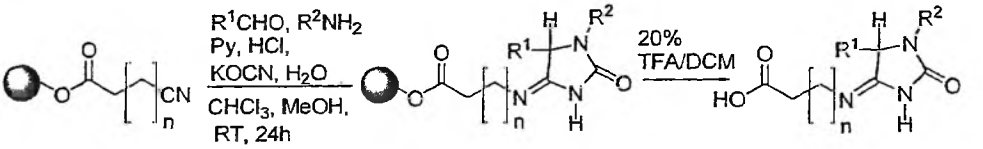
Schemat 97. Reakcja Ugiego



Schemat 98. Postulowany mechanizm reakcji Ugiego

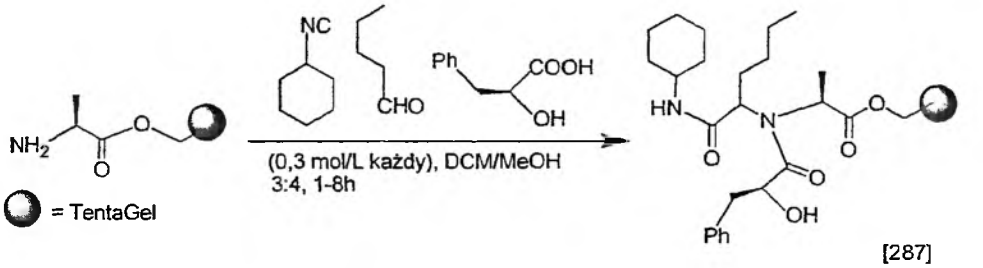
W 1997 roku pojawiła się publikacja donosząca o syntezie bibliotek związków małocząsteczkowych z wykorzystaniem reakcji Ugiego [281]. Wcześniej wykorzy-

stywano tę reakcję do otrzymywania pierścieni pirolowych [282], imidazolowych [283] oraz małych pierścieni laktamowych [284]. W reakcji Ugiego przebiegającej na fazie stałej, każdy z czterech substratów może zostać wstępnie zakotwiczony na nośniku. Reakcja Ugiego przeważnie zachodzi w czasie od 24 h do kilku dni, choć są znane przykłady, gdy proces ten jest szybszy. Nielsen i Hoel wykorzystując mikrofale otrzymali bibliotekę związków z wysoką czystością i wydajnością od 24 do 95% a czas reakcji wynosił 5 lub mniej minut [285].



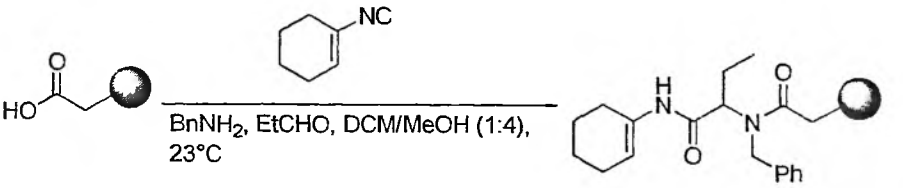
[286]

Schemat 99. Reakcja Ugiego z immobilizowanym nitrylem



[287]

Schemat 100. Reakcja Ugiego z immobilizowaną aminą



[281]

Schemat 101. Reakcja Ugiego z immobilizowanym kwasem karboksylowym

PODSUMOWANIE

Zaprezentowany przegląd literatury podejmującej tematykę reakcji zachodzących na nośniku polimerycznym, odzwierciedla jedynie w skromnym stopniu zainteresowanie, jakim się cieszy w ostatnich latach metodologia syntezy na fazie stałej. W syntezie na fazie stałej procedury prowadzonych reakcji są w zasadzie analogiczne do stosowanych w roztworze. Wprowadzone są zwykle jednak pewne modyfikacje reakcji (np. czas, stężenie i nadmiar reagentów). Jednakże istnieje liczna grupa procedur wykorzystywanych w roztworze, które nie znalazły zastosowania w reakcjach na fazie stałej. Ogromnym wyzwaniem stojącym przed syntezą organiczną na nośniku polimerycznym jest opracowanie nowych metodologii, oraz zaadoptowanie znanych w roztworze, ale dotychczas nie stosowanych na fazie stałej reakcji do SPOS, a także opracowanie procesów syntezy związków optycznie czynnych. Literatura przedstawia nieliczne przykłady syntez stereoselektywnych. Różna aktywność biologiczna stereoizomerów w tym także enancjomerów, wymaga opracowania także metod syntezy związków optycznie czystych na fazie stałej. Można się spodziewać, że w nadchodzących latach będziemy nadal świadkami intensywnego rozwoju metod syntez na fazie stałej, w tym metod syntezy stereoselektywnej i asymetrycznej.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

[1] R.B. Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 1963, **85**, 2149.
[2] C.C. Leznoff, Acc. Chem. Ress., 1978, **11**, 327.
[3] J.M. Fréchet, Tetrahedron, 1981, **37**, 663.
[4] *Handbook of Combinatorial Chemistry*, eds. K.C. Nicolaou, R. Hanko, W. Hartwig, Vol. 1–2, Wiley–VCH, Weinheim, 2002.
[5] P.H.H. Hermkens, H.C.J. Ottenheijm, D. Rees, Tetrahedron, 1996, **52**, 4527.
[6] P.H.H. Hermkens, H.C.J. Ottenheijm, D. Rees, Tetrahedron, 1997, **53**, 5643.
[7] S. Booth, P.H.H. Hermkens, H.C.J. Ottenheijm, D. Rees, Tetrahedron, 1998, **54**, 15385.
[8] S. Bräse, J.H. Kirchhoff, J. Köbberling, Tetrahedron, 2003, **59**, 885.
[9] *Combinatorial Chemistry*, ed. H. Fenniri, Oxford University Press, Oxford, 2000.
[10] F.Z. Dörwald, *Organic Synthesis on Solid Phase*, Wiley-VCH, Weinheim, 2002.
[11] R.G. Franzén, J. Comb. Chem., 2000, **2**, 195.
[12] V. Krchňák, M.W. Holladay, Chem. Rev., 2002, **102**, 61.
[13] S. Bräse, C. Gil, K. Knepper, Bioorg. Med. Chem., 2002, **10**, 2415.
[14] S. Bräse, D. Enders, J. Köbberling, F. Avemaria, Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 1998, **37**, 3413.
[15] A. Ajayaghosh, V.N.R. Pillai, Tetrahedron, 1988, **44**, 6661.
[16] C.T. Bui, N.J. Maeji, F. Rasoul, A.M. Bray, Tetrahedron Lett., 1999, **40**, 5383.
[17] J.Y. Wong, C. Manning, C.C. Leznoff, Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 1974, **13**, 666.
[18] C.T. Bui, N.J. Maeji, A.M. Bray, Biotech. Bioeng. (Comb. Chem.), 2000, **71**, 91.
[19] B. Raju, T.P. Kogan, Tetrahedron Lett., 1997, **38**, 4965.
[20] Y. Han, A. Giroux, C. Lépine, F. Laliberté. Z. Huang, H. Perrier, C.I. Bayly, R.N. Young, Tetrahedron Lett., 1999, **55**, 11669.

[21] Y. Han, A. Roy, A. Giroux, Tetrahedron Lett., 2000, **41**, 5447.
[22] K.A. Newlander, B. Chenera, D.F. Veber, N.C.F. Yim, M.L. Moore, J. Org. Chem., 1997, **62**, 6726.
[23] K.C. Nicolaou, N. Winssinger, D. Vourloumis, T. Ohshima, S. Kim, J. Pfefferkorn, Y.J. Xu, T. Li, J. Am. Chem. Soc., 1998, **120**, 10814.
[24] M. Ramaseshan, Y.L. Dory, P. Deslongchamps, J. Comb. Chem., 2000, **2**, 615.
[25] D.S. Brown, J.M. Revill, R.E. Shute, Tetrahedron Lett., 1998, **39**, 8533.
[26] J.M.J. Fréchet, K.E. Haque, Tetrahedron Lett., 1975, 3055.
[27] H. Hayatsu, H.G. Khorana, J. Am. Chem. Soc., 1966, **88**, 3182.
[28] H. Hayatsu, H.G. Khorana, J. Am. Chem. Soc., 1967, **89**, 3880.
[29] D.A. Nugiel, D.A. Wacker, G.A. Nemeth, Tetrahedron Lett., 1997, **38**, 5789.
[30] G.D. Darling, J.M.J. Fréchet, J. Org. Chem., 1986, **51**, 2270.
[31] C.A. Olsen, M. Witt, J.W. Jaroszewski, H. Franzyk, Org. Lett., 2004, **6**, 1935.
[32] T. Zoller, J.-B. Ducep, M. Hibert, Tetrahedron Lett., 2000, **41**, 9985.
[33] O. Mitsunobu, Synthesis, 1981, **1**.
[34] V. Krchnák, Z. Flegelová, A.S. Weichsel, M. Lebl, Tetrahedron Lett.,1995, **36**, 6193.
[35] T.A. Rano, K.T. Chapman, Tetrahedron Lett., 1995, **36**, 3789.
[36] L.M. Gayo, M.J. Suto, Tetrahedron Lett., 1997, **38**, 211.
[37] V. Krchnák, A.S. Weichsel, M. Lebl, S. Felder, Bioorg. Med. Chem. Lett., 1997, **7**, 1013.
[38] X. Du, R.W. Armstrong, J. Org. Chem., 1997, **62**, 5678.
[39] S.M. Dankwardt, T.M. Phan, J.L. Krstenansky, Mol. Diversity, 1995, **1**, 113.
[40] K.C. Nicolaou, N. Wissinger, J. Pastor, F. DeRoose, J. Am. Chem. Soc., 1997, **119**, 449.
[41] C.W. Phoon, C. Abell, J. Comb. Chem., 1999, **1**, 485.
[42] D.R. Barn, J.R. Morphy, J. Comb. Chem., 1999, **1**, 151.
[43] J.M. Cobb, M.T. Fiorini, C.R. Goddard, M.E. Theoclitou, C. Abell, Tetrahedron Lett., 1999, **40**, 1045.
[44] L.F. Tietze, A. Steinmetz, Synlett, 1996, 667.
[45] M. Barbaste, V. Rolland-Fulcrand, M.L. Roumestant, P. Viallefont, J. Martinez, Tetrahedron Lett., 1998, **39**, 6287.
[46] P. Soucy, Y.L. Dory, P. Deslongchamps, Synlett, 2000, 1123.
[47] P. Karoyan, A. Triolo, R. Nannicini, D. Giannotti, M. Altamura, G. Chassaing, E. Perrotta, Tetrahedron Lett., 1999, **40**, 71.
[48] D.L. Whitehouse, S.N. Savinov, D.J. Austin, Tetrahedron Lett., 1997, **38**, 7851.
[49] D. Mormeneo, A. Llebaria, A. Delgado, Tetrahedron Lett., 2004, **45**, 6831.
[50] R.N. Salvatore, F. Chu, A.S. Nagle, E.A. Kapxhiu, R.M. Cross, K.W. Jung, Tetrahedron, 2002, **58**, 3329.
[51] E.J. Moran, T.E. Wilson, C.Y. Cho, S.R. Cherry, P.G. Schultz, Biopolymers, 1995, **37**, 213.
[52] K.C. Nicolaou, G.-Q. Cao, J.A. Pfefferkorn, Angew. Chem. Int. Ed., 2000, **39**, 739.
[53] P. Arya, C.-Q. Wei, M.L. Barnes, M. Doroszewska, J. Comb. Chem., 2004, **6**, 65.
[54] A. Vidal-Ferran, N. Bampos, A. Moyano, M.A. Pericás, A. Riera, J.K.M. Sanders, J. Org. Chem., 1998, **63**, 6309.
[55] S.P. Hollinshead, Tetrahedron Lett., 1996, **37**, 9157.
[56] W.J. Haap, D. Kaiser, T.B. Walk, G. Jung, Tetrahedron, 1998, **54**, 3705.
[57] K. Rölfing, M. Thiel, H. Künzer, Synlett, 1996, 1036.
[58] A.R. Katritzky, S.A. Belyakov, Y. Fang, J.S. Kiely, Tetrahedron Lett., 1998, **39**, 8051.
[59] P.S. Furth, M.S. Reitman, A.F. Cook, Tetrahedron Lett., 1997, **38**, 5403.
[60] K.M. Brummond, J. Lu, J. Org. Chem. 1999, **64**, 1723.
[61] S. Bräse, J. Köbberling, D. Enders, R. Lazny, M. Wang, S. Brandtner, Tetrahedron Lett., 1999, **40**, 2105.

[62] S. Kobayashi, Y. Aoki, Tetrahedron Lett., 1998, **39**, 7345.
[63] S. Kobayashi, R. Akiyama, Tetrahedron Lett., 1998, **39**, 9211.
[64] R. Léger, R. Yen, M.W. She, V.J. Lee, S.J. Hecker. Tetrahedron Lett., 1998, 39, 4171.
[65] H.J. Kohlbau, J. Tschakert, R.A. Al-Qawasmeh, T.A. Nizami, A. Malik, W.Z. Voelter, Naturforsch. Sect. B, 1998, **53**, 753.
[66] A. Lee, L. Huang, J.A. Ellman, J. Am. Chem. Soc., 1999, **121**, 9907.
[67] B.F. Gisin, Helv. Chim. Acta, 1973, **56**, 1476.
[68] S. Yoo, S.J. Seo, K.Y. Yi, Y.D. Gong, Tetrahedron Lett.,1997, **38**, 1203.
[69] M.J. Kurth, L.A.A. Randall, C. Chen, C. Melander, R.B. Miller, K. McAlister, G. Reitz, R. Kang, T. Nakatsu, C. Green, J. Org. Chem., 1994, **59**, 5862.
[70] C. Gennari, S. Ceccarelli, U. Piarulli, K. Aboutayab, M. Donghi, I. Peterson, Tetrahedron, 1998, **54**, 14999.
[71] R.S. Garigipati, Tetrahedron Lett., 1997, **38**, 6807.
[72] F.M. Adrian, B. Altava, M.I. Burguete, S.V. Luis, R.V. Salvador, E. García-España, Tetrahedron, 1998, **54**, 3581.
[73] D.F.J. Sampson, R.G. Simmonds, M. Bradley, Tetrahedron Lett., 2001, **42**, 5517.
[74] H. Yuasa, Y. Kamata, S. Kurono, H. Hashimoto, Bioorg. Med. Chem. Lett., 1998, **8**, 2139.
[75] R.N. Zuckermann, J.M. Kerr, S.B.H. Kent, W.H. Moos, J. Am. Chem. Soc., 1992, **114**, 10646.
[76] S.-H.L. Chiu, L. Anderson, Carbohyd. Res., 1976, **50**, 227.
[77] M. Adamczyk, J.R. Fishpaugh, P.G. Mattingly, Tetrahedron Lett., 1999, **40**, 463.
[78] V. Bertini, F. Lucchesini, M. Pocci, A. De Munno, Tetrahedron Lett., 1998, **39**, 9263.
[79] T. Masquelin, N. Meunier, F. Gerber, G. Rossé, Heterocycles, 1998, **48**, 2489.
[80] S. Kobayashi, I. Hachiya, S. Suzuki, M. Moriwaki, Tetrahedron Lett., 1996, **37**, 2809.
[81] A. Barco, S. Benetti, C. De Risi, P. Marchetti, G.P. Pollini, V. Zanirato, Tetrahedron Lett., 1998, **39**, 7591.
[82] A. Mansour, M. Portnoy, J. Chem. Soc., Perkin 1, 2001, 952.
[83] P.W. Davis, T.A. Vickers, L. Wilson-Lingardo, J.R. Wyatt, C.J. Guinosso, Y.S. Sanghvi, E.A. DeBaets, O.L. Acevedo, P.D. Cook, D.J. Ecker, J. Med. Chem., 1995, **38**, 4363.
[84] M.R. Pavia, M.P. Cohen, G.J. Dilley, G.R. Dubuc, T.L. Durgin, F.W. Forman, M.E. Hediger, G. Milot, T.S. Powers, I. Sucholeiki, S. Zhou, D.G. Hangauer, Bioorg. Med. Chem., 1996, **4**, 659.
[85] A.M. Barber, I.R. Hardcastle, M.G. Rowlands, B.P. Nutley, J.H. Marriott, M. Jarman, Bioorg. Med. Chem. Lett., 1999, **9**, 623.
[86] A. Peyman, C. Weiser, E. Uhlmann, Bioorg. Med. Chem. Lett., 1995, **5**, 2469.
[87] X.B. Yang, A. Sierzchala, K. Misiura, W. Niewiarowski, M. Sochacki, W.J. Stec, M.W. Wieczorek, J. Org. Chem., 1998, **63**, 7097.
[88] E.E. Swayze, Tetrahedron Lett., 1997, **38**, 8643.
[89] C. Lee, E.K. Kick, J.A. Ellman, J. Am Chem. Soc., 1998, **120**, 9735.
[90] K.C. Nicolaou, N. Winssinger, J. Pastor, S. Ninkovic, F. Sarabia, Y. He, D. Vourloumis, Z. Yang, T. Li, P. Giannakakou, E. Hamel, Nature, 1997, **387**, 268
[91] J.A. Hunt, W.R. Roush, J. Am. Chem. Soc., 1996, **118**, 9998.
[92] W.K.-D. Brill, A. De Mesmaeker, S. Wendeborn, Synlett, 1998, 1085.
[93] S. Wendeborn, A. De Mesmaeker, W.K.D. Brill, Synlett, 1998, 865.
[94] B. Peschke, J.G. Bundgaard, J. Breinholt, Tetrahedron Lett., 2001, **42**, 5127.
[95] W.M. Bryan, W.F. Huffman, P.K. Bhatnagar, Tetrahedron Lett., 2000, **41**, 6997.
[96] S. Berteina, A. De Mesmaeker, S. Wendeborn, Synlett, 1999, 1121.
[97] J.J.N. Veerman, J.H. van Maarseveen, G.M. Visser, C.G. Kruse, H.E. Schoemaker, H. Hiemstra, F.P.J.T. Rutjes, Eur. J. Org. Chem., 1998, 2583.

[98] K.C. Nicolaou, D. Vourloumis, T. Li, J. Pastor, N. Winssinger, Y. He, S. Ninkovic, F. Sarabia, H. Vallberg, F. Rohschangar. M.P. King, M.R.V. Finlay, P. Giannakakou, P. Verdier-Pinard, E. Hamel, Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 1997, **36**, 2097.
[99] M.A. Marx, A.-L. Grillot, C.T. Louer, K.A. Beaver, P.A. Bartlett, J. Am. Chem. Soc., 1997, **119**, 6153.
[100] B. Borhan, J.A. Wilson, M.J. Gasch, Y. Ko, D.M. Kurth, M.J. Kurth, J. Org. Chem., 1995, **60**, 7375.
[101] A.M. Fivush, T.M. Willson, Tetrahedron Lett., 1997, **38**, 7151.
[102] D.P. Rotella, J. Am. Chem. Soc., 1996, **118**, 12246.
[103] C. Chen, L.A.A. Randall, R.B. Miller, A.D. Jones, M.J. Kurth, J. Am. Chem. Soc., 1994, **116**, 2661.
[104] U. Reiser, J. Jauch, Synlett, 2001, 90.
[105] K.C. Nicolaou, J. Pastor, N. Winssinger, F. Murphy, J. Am. Chem. Soc., 1998, **120**, 5132.
[106] K.C. Nicolaou, P.S. Baran, Y.-L. Zhong, J. Am. Chem. Soc., 2000, **122**, 10246.
[107] A.M. Bray, D.S. Chiefari, R.M. Valerio, N.J. Maeji, Tetrahedron Lett., 1995, **36**, 5081.
[108] P.C. Miller, T.J. Owen, J.M. Molyneaux, J.M. Curtis, C.R. Jones, J. Comb. Chem., 1999, **1**, 223.
[109] C.C. Leznoff, T.M. Fyles, J. Weatherston, Can. J. Chem., 1977, **55**, 1143.
[110] W.H. Pearson, R.B. Clark, Tetrahedron Lett., 1997, **38**, 7669.
[111] T.L. Boehm, H.D.H. Showalter, J. Org. Chem., 1996, **61**, 6498.
[112] B. Yang, Q. Sun, J.R. Wareing, C.F. Jewell, J. Org. Chem., 1996, **61**, 8765.
[113] W. Li, B. Yan, J. Org. Chem., 1998, **63**, 4092.
[114] C. Chen, L.A.A. Randall, B.R. Miller, A.D. Jones, M.J. Kurth, Tetrahedron, 1997, **53**, 6595.
[115] M. Reggeelin, V. Brening, R. Welcker, Tetrahedron Lett., 1998, **39**, 4801.
[116] C.L. Cavallaro, T. Herpin, B.F. McGuinness, Y.C. Shimshock, R.E. Dolle, Tetrahedron Lett., 1999, **40**, 2711.
[117] X. Beebe, N.E. Schore, M.J. Kurth, J. Am. Chem. Soc., 1992, **114**, 10061.
[118] A.R. Katritzky, D. Toader, K. Watson, J.S. Kiely, Tetrahedron Lett., 1997, **38**, 7849.
[119] P.F. Alewood, R.I. Brinkworth, R.J. Dancer, B. Garnham, A. Jones, S.B.H. Kent, Tetrahedron Lett., 1992, **33**, 977.
[120] A.V. Purandare, M.A. Poss, Tetrahedron Lett., 1998, **39**, 935.
[121] M.R. Pavia, H.V. Meyers, G. Milot, M.E. Hediger, US Patent No. WO 99/33431, July 8, 1999.
[122] P. Sieber, Tetrahedron Lett., 1987, **28**, 2107.
[123] D.R. Cody, S.H.H. DeWitt, J.C. Hodges, J.S. Kiely, W.H. Moos, M.R. Pavia, B.R. Roth, M.C. Schroeder, C.J. Stankovic, US Patent No. 5,324,483, June 28, 1994.
[124] R.H. Schlessinger, C.P. Bergstrom, Tetrahedron Lett., 1996, **37**, 2133.
[125] B. Furman, R. Thürmer, Z. Kaluza, R. Lysek, W. Volter, M. Chmielewski, Angew. Chem. Int. Ed., 1999, **38**, 1121.
[126] S. Hanessian, F. Xie, Tetrahedron Lett., 1998, **39**, 737.
[127] S. Wang, J. Am. Chem. Soc., 1973, **95**, 1328.
[128] R.S. Garigipati, B. Adams, J.L. Adams, S.K. Sarkar, J. Org. Chem., 1996, **61**, 2911.
[129] S. Chandrasekhar, M.B. Padmaja, Synth. Commun., 1998, **28**, 3715.
[130] A.S. Kiselyov, R.W. Amstrong, Tetrahedron Lett., 1997, **38**, 6163.
[131] G.A. Morales, J.W. Corbett, W.F. DeGrado, J. Org. Chem., 1998, **63**, 1172.
[132] F. Zaragoza, H. Stephensen, J. Org. Chem., 1999, **64**, 2555.
[133] C.L. Lee, K.P. Chan, Y. Lam, S.Y. Lee, Tetrahedron Lett., 2001, **42**, 1167.
[134] J. Lee, W.V. Murray, R.A. Rivero, J. Org. Chem., 1997, **62**, 3874.
[135] R.A. Scheuerman, D. Tumelty, Tetrahedron Lett., 2000, **41**, 6531.
[136] A. Hari, B.L. Miller, Tetrahedron Lett., 1999, **40**, 245.
[137] A. Kamal, G.S.K. Reddy, K.L. Reddy, Tetrahedron Lett., 2001, **42**, 6969.

[138] G.B. Phillips, G.P. Wei, Tetrahedron Lett., 1996, **37**, 4887.
[139] I. Hughes, Tetrahedron Lett., 1996, **37**, 7595.
[140] R. Di Lucrezia, I.H. Gilbert, C.D. Floyd, J. Comb. Chem., 2000, **2**, 249.
[141] J.H. Kirchhoff, S. Bräse, D. Enders, J. Comb. Chem., 2001, **3**, 71.
[142] D. Enders, J.H. Kirchhoff, J. Köbberling, T.H. Peiffer, Org. Lett., 2001, **3**, 1241.
[143] R. Lazny, M. Michalak, Synlett, 2002, 1931.
[144] R. Lazny, A. Nodzewska, K. Wolosewicz, Synthesis, 2003, 2858.
[145] J.S. Panek, B. Zhu, J. Am. Chem. Soc., 1997, **119**, 12022.
[146] B.C. Hamper, S.A. Kolodziej, A.M. Scates, Tetrahedron Lett., 1998, **39**, 2047.
[147] B.A. Lorsbach, J.T. Bagdanoff, R.B. Miller, M.J. Kurth, J. Org. Chem., 1998, **63**, 2244.
[148] C.C. Leznoff, D.M. Dixit, Can. J. Chem., 1997, **55**, 3351.
[149] E. Falb, T. Yechezkel, Y. Salitra, C. Gilon, J. Pep. Res., 1999, 53, 507.
[150] Z. Zhu, B. McKittrick, Tetrahedron Lett., 1998, **39**, 7479.
[151] H.-G. Chao, M.S. Bernatowicz, P.D. Reiss, C.E. Klimas, G.R. Matsueda, J. Am. Chem. Soc., 1994, **116**, 1746.
[152] J.A. Linn, S.W. Gerritz, A.L. Handlon, C.E. Hyman, D. Heyer, Tetrahedron Lett., 1999, **40**, 2227.
[153] K. Gordon, M. Bolger, N. Khan, S. Balasubramanian, Tetrahedron Lett., 2000, **41**, 8621.
[154] B. Thern, J. Rudolph, G. Jung, Tetrahedron Lett., 2002, **43**, 5013.
[155] M. Bodanszky, *Principles of Peptide Synthesis*, Springer, Berlin 1993.
[156] N. Sewald, H.-D. Jakubke, *Peptides: Chemistry and Biology*, Wiley–VCH, Weinheim, 2002.
[157] D.L. Griffith, M.J. O'Donnell, R.S. Pottorf, W.L. Scott, J.A. Porco Jr., Tetrahedron Lett., 1997, **38**, 8821.
[158] S.-Y. Han, Y.-A. Kim, Tetrahedron, 2004, **60**, 2447.
[159] L.A. Carpino, H. Imazumi, A. El-Faham, F.J. Ferrer, C. Zhang, Y. Lee, B.M. Foxman, P. Henklein, C. Hanay, C. Mügge, H. Wenschuh, J. Klose, M. Beyermann, M. Bienert, Angew. Chem. Int. Ed., 2002, **41**, 442.
[160] L.A. Carpino, J. Xia, C. Zhang, A. El-Faham, J. Org. Chem., 2004, **69**, 62.
[161] F. Albericio, J.M. Bofill, A. El-Faham, S.A. Kates, J. Org. Chem., 1998, **63**, 9678.
[162] A.R. Mitchell, B.W. Ericskon; M.N. Ryabtsev, R.S. Hodges, R.B. Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 1976, **98**, 7357.
[163] J.A. Camarero, B.J. Hackel, J.J. de Yoreo, A.R. Mitchell, J. Org. Chem., 2004, **69**, 4145.
[164] I. Clark-Lewis, R. Aebersold, H. Ziltener, J.W. Schrader, L.W. Hood, S.B.H. Kent, Science, 1986, **231**, 134.
[165] *Novabiochem Catalog and Peptide Synthesis Handbook*, CH 1999.
[166] J. Jones, *The Chemical Synthesis of Peptides*, Oxford University Press, Oxford, 1994.
[167] G.B. Fields, R.L. Noble, Int. J. Pept. Prot. Res., 1990, **35**, 161.
[168] N. Robertson, R. Ramage, J. Chem. Soc. Perkin 1, 1999, 1015.
[169] H.S. Trivedi, M. Anson, P.G. Steel, J. Worley, Synlett, 2001, 1932.
[170] V. Lejeune, J. Martinez, F. Cavelier, Tetrahedron Lett., 2003, **44**, 4757.
[171] D.S. Wagner, C.J. Markworth, C.D. Wagner, F.J. Schoenen, C.E. Rewerts, B.K. Kay, H.M. Geysen, Comb. Chem. High Throughput Screening, 1998, **1**, 143.
[172] H.J. Olivos, P.G. Alluri, M.M. Reddy, D. Salony, T. Kodadek, Org. Lett., 2002, **4**, 4057.
[173] N. Heine, T. Ast, J. Schneider-Mergener, U. Reineke, L. Germeroth, H. Wenschuh, Tetrahedron, 2003, **59**, 9919.
[174] R.L. Letsinger, V. Mahadevan, J. Am. Chem. Soc., 1965, **87**, 3526.
[175] K. Itakura, C.P. Bahl, N. Katagiri, J.J. Michniewicz, R.H. Wightman, S.A. Narang, Can. J. Chem., 1973, **51**, 3649.
[176] H. Ito, Y. Ike, S. Itakura, Nucleic Acids Res., 1982, **10**, 1755.

[177] J.C. Catlin, F. Cramer, J. Org. Chem., 1973, **38**, 245.
[178] M. Sekine, T. Hata, Curr. Org. Chem., 1999, **3**, 25.
[179] G.R. Gough, M.J. Brunden, P.T. Gilham, Tetrahedron Lett., 1981, **22**, 4177.
[180] F. Eckstein, *Oligonucleotides and Analogues, A Practical Approach*, Oxford Uniwersity Press. Oxford, 1991.
[181] A.B. Sierzchala, D.J. Dellinger, J.R. Betley, T.K. Wyrzykiewicz, C.M. Yamada, M.H. Caruthers, J. Am. Chem. Soc., 2003, **125**, 13427.
[182] R. Micura, Chem. Eur. J., 1999, **5**, 2077.
[183] M. Frieden, A. Grandas, E. Pedroso, Chem. Commun., 1999, 1593.
[184] A. Ohkubo, K. Seio, M. Sekine, Tetrahedron Lett, 2004, **45**, 363.
[185] D.J. Silva, H. Wang, N.M. Allanson, R.K. Jain, M.J. Sofia, J. Org. Chem., 1999, **64**, 5926.
[186] Y. Wang, H. Zhang, W, Voelter, Chem. Lett., 1995, 273.
[187] L. Yan, C.M. Taylor, R. Goodnow, D. Kahne, J. Am. Chem. Soc., 1994, **116**, 6953.
[188] R. Liang, L. Yan, J. Loebach, M. Ge, Y. Uozumi, K. Sekanina, N. Horan, J. Gildersleeve, C. Tompson, A. Smith, K. Biswas, W.C. Still, D. Kahne, Science, 1996, **274**, 1520.
[189] C. Zheng, P.H. Seeberger, S.J. Danishefsky, J. Org. Chem., 1998, **37**, 1126.
[190] T. Zhu, G.-J. Boons, Angew. Chem. Int. Ed., 1998, **37**, 1898.
[191] Y. Ito, O. Kanie, T. Ogawa., Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 1996, **35**, 2510.
[192] X. Wu, M. Grathwohl, R.R. Schmidt, Angew. Chem. Int. Ed., 2002, **41**, 4489.
[193] D. Jönsson, Tetrahedron Lett., 2002, **43**, 4793.
[194] D. Jönsson, A. Undén, Tetrahedron Lett., 2002, **43**, 3125.
[195] L.S. Richter, S. Andersen, Tetrahedron Lett., 1998, **39**, 8747.
[196] H.-C. Zhang, K.K. Brumfield, L. Jaroskova, B.E. Maryanoff, Tetrahedron Lett., 1998, **39**, 4449.
[197] M.A. Yougman, S.L. Dax, Tetrahedron Lett., 1997, **38**, 6347.
[198] J.J. McNally, M.A. Youngman, S.L. Dax, Tetrahedron Lett., 1998, **39**, 967.
[199] S. Schunk, D. Enders, Org. Lett., 2001, **3**, 3177.
[200] E. Dominguez, M.J. O'Donnell, W.L. Scott, Tetrahedron Lett., 1998, **39**, 2167.
[201] S. Kobayashi, R. Akiyama, T. Furuta, M. Moriwaki, Molecules Online, 1998, **2**, 35.
[202] C. Chiu, Z. Tang, J.W. Ellingboe, J. Comb. Chem., 1999, **1**, 73.
[203] Y. Wang, S.R. Wilson, Tetrahedron Lett., 1997, **38**, 4021.
[204] R. Lazny, A. Nodzewska, Tetrahedron Lett, 2003, **44**, 2441.
[205] T. Ruhland, L.A. Künzer, Tetrahedron Lett., 1996, **37**, 2757.
[206] S.P. Hollinshead, WO 98/08813.
[207] I. Paterson, M. Donghi, K. Gerlach, Angew. Chem. Int. Ed., 2000, **112**, 3453.
[208] M. Reggelin, V. Brenig, Tetrahedron Lett., 1996, **37**, 6851.
[209] M. Reggelin, V. Brenig, C. Zur, Org. Lett., 2000, **2**, 531.
[210] S. Kobaysashi, I. Hachiya, M. Yasuda, Tetrahedron Lett., 1996, **37**, 5569.
[211] J. Tois, A. Koskinen, Tetrahedron Lett., 2003, **44**, 2093.
[212] R.G. Franzén, Tetrahedron, 2000, **56**, 685.
[213] S. Berteina, S. Wondeborn, W.K.-D. Brill, A. De Mesmaeker, Synlett, 1998, 676.
[214] T.R. Early, R.S. Gordon, M.A. Caroll, A.B. Holmes, R.E. Shute, I.F. McConvey, Chem. Commun., 2001, 1966.
[215] M. Hiroshige, J.R. Hauske, P. Zhou, Tetrahedron Lett., 1995, **36**, 4567.
[216] B. Ruhland, A. Bombrun, M.A. Gallop, J. Org. Chem., 1997, **62**, 7820.
[217] K.-L. Yu, M.S. Deshpande, D.M. Vyas, Tetrahedron Lett., 1994, **35**, 8919.
[218] M. Hiroshige, J.R. Hauske, P. Zhou, J. Am. Chem. Soc., 1995, **117**, 11590.
[219] K. Akaji, Y. Kisio, Tetrahedron Lett., 1997, **38**, 5185.
[220] K. Akaji, K. Teruya, M. Akaji, S. Aimoto, Tetrahedron, 2001, **57**, 2293.

[221] W.Y. Yun, R. Mohan, Tetrahedron Lett., 1996, **37**, 7189.
[222] H.C. Zhang, B.E. Maryanoff, J. Org. Chem., 1997, **62**, 1804.
[223] R.N. Zuckermann, D.A. Goff, S. Ng, K. Spear, B.O. Scott, A. Sigmund, R.A. Goldsmith, C.K. Marlowe, Y. Pei, L. Richter, R. Simon (Chiron Corporation.). WO 96/40202, 1996.
[224] G.L. Bolton, J.C. Hodges, J. Com. Chem., 1999, **1**, 130.
[225] S. Berteina, S. Wondeborn, A. De Mesmaeker, Synlett, 1998, 1231.
[226] A. Suzuki, J. Organomet. Chem., 1999, **576**, 147.
[227] F.X. Woolard, J. Paetsch, J.A. Ellman, J. Org. Chem., 1997, **62**, 6102.
[228] Y. Lee, R.B. Silverman, Tetrahedron, 2001, **57**, 5339.
[229] S. Wendeborn, S. Berteina, W.K.-D. Brill, A. De Mesmaeker, Synlett, 1998, 671.
[230] R.J. Kell, P. Hodge, M. Nisar, R.T. Williams, J. Chem. Soc., Perkin 1, 2001, 3403.
[231] P.A. Tempest, R.W. Armsrtong, J. Am. Chem. Soc., 1997, **119**, 7607.
[232] S.A. Ohnmacht, T. Brenstrum, K.H. Bleicher, J. McNulty, A. Capretta, Tetrahedron Lett., 2004, **45**, 5661.
[233] M.S. Deshpande, Tetrahedron Lett., 1994, **35**, 5613.
[234] M. Larhed, G. Lindeberg, A. Hallberg, Tetrahedron Lett., 1996, **37**, 8219.
[235] S. Chamoin, S. Houldsworth, V. Snieckus, Tetrahedron Lett., 1998, **39**, 4175.
[236] M.S. Brody, M.G. Finn, Tetrahedron Lett., 1999, **40**, 415.
[237] M.C. Fagnola, I. Candiani, G. Visentin, W. Cabri, F. Zarini, N. Mongelli, A. Bedeschi, Tetrahedron Lett., 1997, **38**, 2307.
[238] M.D. Collini, J.W. Ellingboe, Tetrahedron Lett., 1997, **38**, 7963.
[239] D. Fancelli, M.C. Fagnola, D. Severino, A. Bedeschi, Tetrahedron Lett., 1997, **38**, 2311.
[240] J.K. Young, J.C. Nelson, J.S. Moore, J. Am. Chem. Soc., 1994, **116**, 10841.
[241] J.C. Nelson, J.K. Young, J.S. Moore, J. Org. Chem., 1996, **61**, 8160.
[242] S. Bräse, S. Dahmen, J. Heuts, Tetrahedron Lett., 1999, **40**, 6201.
[243] Y. Liao, R. Fathi, M. Reitman, Y. Zhang, Z. Yang, Tetrahedron Lett., 2001, **42**, 1815.
[244] M. Erdelyi, A. Gogoll, J. Org. Chem., 2003, **68**, 6431.
[245] C.C. Leznoff, J.Y. Wong, Can. J. Chem., 1973, **51**, 3756.
[246] U. Gerigk, M. Gerlach, W.P. Neumann, R. Vieler, V. Weintritt, Synthesis, 1990, 448.
[247] A.L. Marzinzik, E.R. Felder, J. Org. Chem., 1998, **63**, 723.
[248] T. Doi, I. Hijikuro, T. Takahashi, J. Am. Chem. Soc., 1999, **121**, 6749.
[249] J.M. Salvino, S. Kieslow, R. Darnbrough, R. Labaudiniere, J. Comb. Chem., 1999, **1**, 134.
[250] J.K. Bang, K. Hasegawa, T. Kawakami, S. Aimoto, K. Akaji, Tetrahedron Lett., 2004, **45**, 99.
[251] D.A. Heerding, D.T. Takata, C. Kwon, W.F. Huffman, J. Samenen, Tetrahedron Lett., 1998, **39**, 6815.
[252] J. Pernerstorfer, M. Schuster, S. Blechert, Synthesis, 1999, 138.
[253] M. Schuster, J. Pernerstorfer, S. Blechert, Angew. Chem. Int. Ed., 1996, **35**, 1979.
[254] V. Chaleix, V. Sol, M. Guilloton, R. Granet, P. Krausz, Tetrahedron Lett., 2004, **45**, 5295.
[255] A.G.M. Barrett, A.J. Hennessy, R. Le Vézouët, P.A. Procopiou, P.W. Seale, S. Stefaniak, R.J. Upton, A.J.P. White, D.J. Wiliams, J. Org. Chem., 2004, **69**, 1028.
[256] G.D. Cuny, J. Cao, J.R. Hauske, Tetrahedron Lett., 1997, **38**, 5237.
[257] G.D. Cuny, J. Cao, J.R. Hauske, Mol. Diversity, 1998, **3**, 173.
[258] G.D. Cuny, J. Cao, A. Sidhu, J.R. Hauske, Tetrahedron, 1999, **55**, 8169.
[259] S.C.G. Biagini, S.E. Gibbon, S.P. Keen, J. Chem. Soc. Perkin 1, 1998, 2485.
[260] R. Lazny, A. Nodzewska, M. Sienkiewicz, K. Wolosewicz, J. Comb. Chem., 2005, **7**, 109.
[261] A.L. Marzinzik, E.R. Felder, Tetrahedron Lett., 1996, **37**, 1003.
[262] S. Hanessian, J. Ma, W. Wang, Tetrahedron Lett., 1999, **40**, 4631.

[263] M.J. O'Donnell, C.W. Lugar, R.S. Pottorf, C. Zhou. W.L. Scott, C.L. Cwi, Tetrahedron Lett., 1997, **38**, 7163.
[264] M.J. O'Donnell, C. Zhou, W.L. Scott, J. Am. Chem. Soc., 1996, **118**, 6070.
[265] H. Moon, N.E. Schore, M.J. Kurth, Tetrahedron Lett., 1994, **35**, 8915.
[266] M.J. O'Donnell, J. Alsina, W.L. Scott, Tetrahedron Lett., 2003, **44**, 8403.
[267] Q. Ren, W. Huang, P. Ho, Reactive Polymers, 1989, **11**, 237.
[268] F. Bevacqua, A. Basso, R. Gitto, M. Bradley, A. Chimirri, Tetrahedron Lett., 2001, **42**, 7683.
[269] J. Yli-Kuahaluoma, Tetrahedron, 2001, **57**, 7053.
[270] B.R. Stranix, G.D. Darling, J. Org. Chem., 1997, **62**, 9001.
[271] V. Yedidia, C.C. Leznoff, Can. J. Chem., 1980, **58**, 1144.
[272] J.D. Winkler, W. McCoull, Tetrahedron Lett., 1998, **39**, 4935.
[273] J. Barluenga, C. Mateos, F. Aznar, C. Valdés, Org. Lett, 2002, **4**, 3667.
[274] A. Kiriazis, T. Leikoski, I. Mutikainen. J. Yli-Kauhaluoma, J. Comb. Chem., 2004, **6**, 283.
[275] D. Brohm, N. Philippe, S. Metzger, A. Bhargava, O. Müller, F. Lieb, H. Waldmann, J. Am. Chem. Soc., 2002, **124**, 13171.
[276] P. Lan, D. Berta, J.A. Porco, Jr, M.S. South, J.J. Parlow, J. Org. Chem., 2003, **68**, 9678.
[277] N. Kaval, J. Van der Eycken, J. Caroen, W. Dehaen, G.A. Strohmeier, C.O. Kappe, E. Van der Eycken, J. Comb. Chem., 2003, **5**, 560.
[278] D.V. Patel, M.F. Gordeev, B.P. England, E.M. Gordon, Mol. Diversity Combin. Chem: Lib. Drug Discovery, 1996, 58.
[279] M.F. Gordeev, D.V. Patel, B.P. England, S. Joannalagadda, J.D. Combs, E.M. Gordon, Bioorg. Med. Chem., 1998, **6**, 883.
[280] H. Richter, G. Jung, Tetrahedron Lett., 1998, **3**, 2729.
[281] A.M. Strocker, T.A. Keating, P.A. Tempest, R.W. Armstrong, Tetrahedron Lett., 1996, **37**, 1149.
[282] A.M.M. Mjalli, S. Sarshar, T.J. Baiga, Tetrahedron Lett., 1996, **37**, 2943.
[283] C. Zhang, E.J. Moran, T.F. Woiwode, K.M. Short, A.M.M. Mjalli, Tetrahedron Lett., 1996, **37**, 751.
[284] K.M. Short, A.M.M. Mjalli, Tetrahedron Lett., 1997, **38**, 359.
[285] A.M.L. Hoel, J. Nielsen, Tetrahedron Lett, 1999, **40**, 3941.
[286] K.M. Short, B.W. Ching, A.M.M. Mjalli, Tetrahedron Lett., 1996, **37**, 7489
[287] A.K. Szardenings, T.S. Burkoth, H.H. Lu, D.W. Tien, D.A. Campbell, Tetrahedron, 1997, **53**, 6573.

Praca wpłynęła do Redakcji 8 lipca 2005

WIADOMOŚCI 2005, 59, 11-12
chemiczne PL ISSN 0043-5104

PEGYLACJA – METODA ZMIANY WŁAŚCIWOŚCI LEKÓW POLIPEPTYDOWYCH, SUBSTANCJI BIOLOGICZNIE AKTYWNYCH

PEGYLATION – A METHOD OF MODIFICATION OF PROPERTIES OF POLYPEPTIDIC DRUGS AND BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS

Jakub Ferenc, Katarzyna Kieć-Kononowicz

Katedra Technologii i Biotechnologii Środków Leczniczych Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego, ul. Medyczna 9, 30-688 Kraków

Abstract
Wprowadzenie
1. Połączenia z polimerami
2. Właściwości PEG
3. Proces pegylacji;
   3.1. Zalety i wady pegylacji
      3.1.1. Zmniejszenie antygenowości i immunogenności; 3.1.2. Zabezpieczenie przed enzymatyczną degradacją leku; 3.1.3. Zmniejszenie klirensu nerkowego, zwiększenie okresu półtrwania; 3.1.4. Zwiększenie rozpuszczalności w wodzie, oraz zmniejszenie wrażliwości leku na zmiany pH i temperatury; 3.1.5. Zmniejszenie toksyczności; 3.1.6. Zwiększenie penetracji do tkanek nowotworowych (efekt EPR); 3.1.7. Zmniejszenie aktywności leku *in vitro*;
   3.2. Reakcja pegylacji pierwszej generacji
   3.3. Reakcja pegylacji drugiej generacji; 3.3.1. Zastosowanie polimerów o większej masie cząsteczkowej oraz usunięcie zanieczyszczeń diolem; 3.3.2. Zastosowanie polimerów rozgałęzionych; 3.3.3. Zastosowanie trwałych wiązań z grupą aminową; 3.3.4. Zastosowanie wiązań PEG z cysteiną; 3.3.5. Przyłączenie PEG do części cukrowej glikoprotein; 3.3.6. Powolne uwalnianie leku
4. Inne peptydy i białka modyfikowane przez połączenie z PEG
5. Połączenia polimerów z lekami małocząsteczkowymi
Podsumowanie
Piśmiennictwo cytowane

Jakub Ferenc – urodził się w 1980 roku w Krakowie. W latach 2000–2005 studiował farmację na Wydziale Farmaceutycznym *Collegium Medicum* Uniwersytetu Jagiellońskiego. W 2005 roku wykonał w Katedrze Technologii i Biotechnologii Środków Leczniczych Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego pracę magisterską pt. „Badania nad zmianą właściwości fizykochemicznych połączeń aktywnych biologicznie".

Prof. dr hab. Katarzyna Kieć-Kononowicz – absolwentka Wydziału Chemii Politechniki Łódzkiej w 1971 r. Przez rok pracowała w Katedrze Medycyny Sądowej Akademii Medycznej w Krakowie, następnie na stanowisku asystenta oraz adiunkta w Katedrze Chemii Farmacutycznej Akademii Medycznej w Krakowie obecnie *Collegium Medicum* Uniwersytetu Jagiellońskiego. Od 1993 roku jest kierownikiem początkowo Zakładu Technologii Środków Leczniczych Katedry Chemii Farmaceutycznej, a od 2004 roku Katedry i Zakładu Technologii i Biotechnologii Środków Leczniczych CM UJ. Uzyskała tytuł doktora nauk farmaceutycznych w 1978 r., w 1992 r. dr hab nauk farmaceutycznych, w zakresie chemia leków, w 2000 roku tytuł profesora nadzwyczajnego. Odbyła długoterminowe staze naukowe w Uniwersytecie Stanowym Stony Brook (NY) w USA (1979 r.), w Instytucie Chemii Farmaceutycznej Uniwersytetu Westfalskiego w Münster (1987–1988 r.) oraz w Instytucie Chemii Farmaceutycznej Wolnego Uniwersytetu w Berlinie (1991–1992, 1995 r.)

Tematyka prowadzonych badań dotyczy zagadnień związanych z poszukiwaniem nowych związków biologicznie aktywnych. Prowadzone badania mają na celu znalezienie struktur wykazujących działanie przeciwdrgawkowe, na układ krążenia, aktywność przeciwgruźliczą. Rozpatrywany jest mechanizm działania poprzez receptory adenozynowe, histaminowe, miejsce wiązące benzodiazepiny w receptorze GABA. Osobnym obszarem działalności są badania z dziedziny biotechnologii farmaceutycznej: badania nad katalizą enzymatyczną przy uzyciu mikroorganizmów, izolowanych bądź rekombinowanych enzymów (nie)immobilizowanych, przeciwciał katalitycznych. Przeprowadzane są próby symulacji metabolizmu przy zastosowaniu metod *in silico* i eksperymentalnych.

ABSTRACT

This review attempts to briefly summarize the recent developments in the area of PEGylation. Pegylation, the process by which polyethylene glycol chains are attached to as well protein and peptide drugs as low molecular weight molecules is used to modify the properties of drugs, biologically active structures. It has influence on pharmacokinetic and pharmacodynamic properties, stability and immunogenicity of structures. The advantages and drawbacks of such modifications were discussed. Pegylation of polypeptide and protein structures as well as small molecules was presented. Pegylation process was divided in two groups: pegylation of the first and second generation. Both processess were presented. Examples of pegylated drugs (Adagen, Oncaspar – first generation; PEG-intron, Pegasys, Somavert, Neulasta – second generation) already introduced into the market were shortly presented, structures being under investigation were mentioned.

Słowa kluczowe: biokoniugacja, pegylacja, leki pegylowane, białka pegylowane

Key words: bioconjugation, PEGylation, pegylated drugs, pegylated proteins

WSTĘP

Wykorzystanie białek i peptydów jako leków od dawna stanowiło obiekt zainteresowań lekarzy i farmaceutów [1–3]. Jednak istnieją dwie istotne przeszkody, ażeby móc je skutecznie stosować.

Pierwszą z nich jest trudność w otrzymaniu odpowiedniej ilości danego białka lub peptydu. Peptydy o mniejszej masie cząsteczkowej mogły być syntetyzowane chemicznie, natomiast te większe uzyskać można było jedynie przez ekstrakcje z naturalnych źródeł. Rozwiązaniem tego problemu okazała się być inżynieria genetyczna, dzięki której otrzymanie dużych ilości czystego produktu stało się możliwe [2–6].

Drugą istotną trudnością jest dostarczenie otrzymanego produktu do organizmu. Doustne podanie białka lub peptydu jest niemożliwe, ze względu na to, że są one rozkładane przez enzymy przewodu pokarmowego. Natomiast białka i peptydy podane parenteralnie cechuje niezadowalająca farmakokinetyka. Mają krótki okres półtrwania, ponieważ szybko usuwane są przez nerki oraz są rozkładane enzymatycznie. Wykazują także antygenowość i immunogenność, co znacznie może obniżyć skuteczność terapii oraz wywołać działania niepożądane u pacjenta [7].

Zaproponowano wiele rozwiązań tego problemu m.in. poprzez:

- zmianę sekwencji aminokwasów, celem obniżenia immunogenności i wrażliwości na rozkład enzymatyczny
- połączenie z immunoglobulinami i białkami osocza (albuminami), w celu przedłużenia okresu półtrwania,
- inkorporację leku do nośnika (liposomy), w celu ochrony i przedłużenia okresu półtrwania [8]
- połączenie leku z naturalnym lub syntetycznym polimerem.

Jak do tej pory najkorzystniejsza zdaje się być ostatnia metoda, której głównym przykładem jest **pegylacja**, czyli **kowalencyjne połączenie leku z glikolem polietylenowym** (PEG) [7, 9].

1. POŁĄCZENIA Z POLIMERAMI

Polimery nie są stosowane jedynie do wiązania z białkami i peptydami [10], ale także przy ich użyciu można modyfikować cukry, oligonukleotydy, lipidy, liposomy oraz leki niskocząsteczkowe [11, 12].

Polimery wykorzystywane do połączeń z białkami można podzielić na dwie grupy. Pierwszą grupę stanowią polimery monofunkcyjne, takie jak np. mPEG, poli(*N*-winylopirolidon), poli(*N*-akryloilomorfolina), alkohol poliwinylowy oraz polioksazoliny. Druga grupa to polimery wielofunkcyjne, do których można zaliczyć PEG, dekstran, DIVEMA (ko-polimer eteru diwinylowego i bezwodnika kwasu maleinowego) oraz SMA (ko-polimer styrenu i bezwodnika kwasu maleinowego).

Wybór odpowiedniego polimeru zależy od rodzaju leku z jakim ma się on połączyć. Polimery monofunkcyjne preferowane są w przypadku łączenia z cząsteczkami o dużej masie, posiadającymi wiele grup funkcyjnych, takimi jak białka. Natomiast polimery polifunkcyjne wykorzystywane są głównie do łączenia z małymi cząsteczkami posiadającymi jedną grupę funkcyjną, a to ze względu na brak ryzyka wystąpienia wiązań krzyżowych.

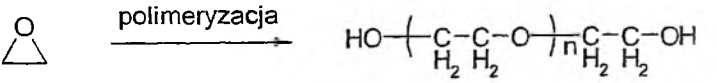
Każdy polimer charakteryzuje się nieco odmiennymi właściwościami fizykochemicznymi, decydującymi o zachowaniu się w organizmie. Zachowanie polimerów *in vivo* podlega następującym zasadom:

1. Łańcuch węglowy jest degradowany jedynie w rzadkich przypadkach.
2. Polimery o strukturze bardziej rozgałęzionej skuteczniej zabezpieczają lek przed chemicznym i enzymatycznym rozkładem.
3. Polimery hydrofilowe usuwane są powoli przez nerki.
4. Polimery hydrofobowe częściej kumulują się w różnych organach.
5. Duża masa cząsteczkowa polimeru wpływa na specyficzną lokalizacje koniugatu (efekt EPR), skąd jest on pobierany przez komórki na drodze endocytozy.
6. Degradacja polimerów wewnątrz komórek może nastąpić pod wpływem działania specyficznych, bardzo aktywnych lizosomalnych enzymów lub pod wpływem kwaśnego środowiska w endosomach.
7. Polimery, szczególnie te, których masa cząsteczkowa jest większa od masy połączonych z nimi leków, decydują o zachowaniu koniugatu w organizmie.

Najczęściej stosowanym polimerem jest glikol polietylenowy PEG [13].

2. WŁAŚCIWOŚCI PEG

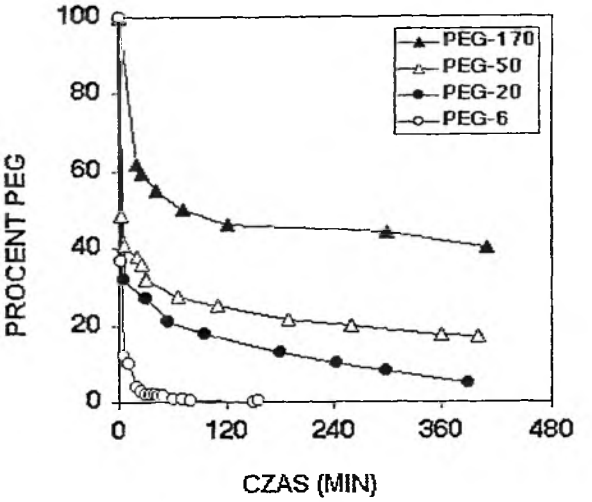
Glikol polietylenowy jest polimerem powstałym w wyniku procesu polimeryzacji anionowej tlenku etylenu z otwarciem pierścienia epoksydowego (Rys. 1). Proces inicjowany jest nukleofilowym atakiem grupy hydroksylowej na pierścień tlenku etylenu [14].



Rysunek 1 Polimeryzacja tlenku etylenu

Glikol polietylenowy charakteryzuje się dobrą rozpuszczalnością zarówno w wodzie jak i rozpuszczalnikach organicznych. Ponadto w roztworach wodnych wiąże 2–3 cząsteczki wody na każdą jednostkę, zwiększając tym samym swoją wielkość, co w znaczący sposób wpływa na jego farmakokinetykę. Wykazuje także niski współczynnik polidyspersji w stosunku do innych polimerów, wynoszący odpowiednio Mw/Mn = 1,01 dla PEG o masie cząsteczkowej < 5 kDa i Mw/Mn = 1,1 dla PEG

o masie cząsteczkowej > 50 kDa. PEG o masie cząsteczkowej < 20 kDa usuwany jest z organizmu z moczem, natomiast o masie większej z moczem i kałem [15].

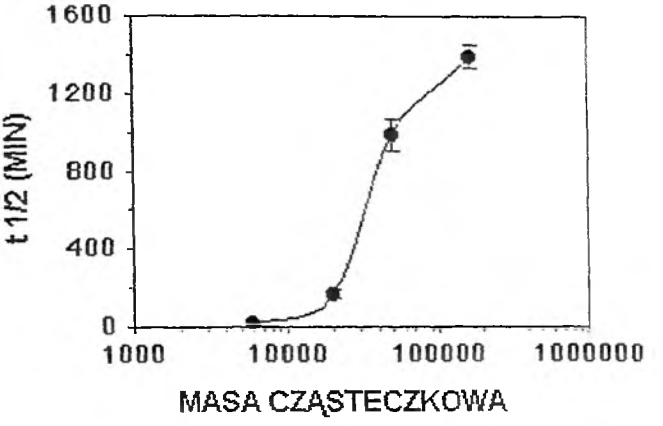


Rysunek 2. Zmiany poziomu PEG o różnych masach cząsteczkowych we krwi po podaniu dożylnym [16]

Szybkość usuwania PEG z organizmu jest uzależniona od masy polimeru. Im większa masa polimeru tym jest ona mniejsza (Rys. 2), co związane jest przede wszystkim z wielkością porów w ścianach kapilar kłębuszków nerkowych. Polimery o większej masie cząsteczkowej będą charakteryzowały się dłuższym okresem półtrwania $t_{0,5}$, oraz większym polem pod krzywą AUC (Tab. 1). Wykres zależności okresu półtrwania od masy cząsteczkowej polimeru przybiera formę sigmoidalną (Rys. 3).

Tabela 1. AUC i okres półtrwania PEG o różnych masach cząsteczkowych po podaniu dożylnym [16]

Parametr	PEG-6	PEG-20	PEG-50	PEG-170
AUC	6,17	110	600	1110
$t_{0,5}$ (min)	17,6	169	987	1390



Rysunek 3. Zależność pomiędzy okresem półtrwania PEG a jego masą cząsteczkową [16]

Większa masa cząsteczkowa polimeru także wpływa na dłuższy czas jego retencji w miejscu podania, w przypadku iniekcji domięśniowej lub podskórnej. PEG o niskiej masie cząsteczkowej < 400 Da jest degradowany w organizmie przez dehydrogenazę alkoholową do toksycznych metabolitów. PEG o większej masie cząsteczkowej praktycznie nie jest rozkładany i nie jest toksyczny. PEG nie kumuluje się w tkankach [16].

3. PROCES PEGYLACJI

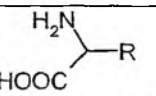
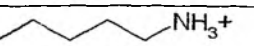
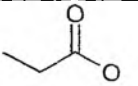
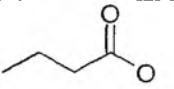
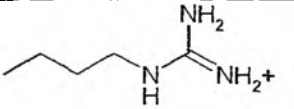
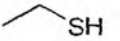
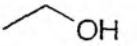
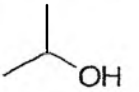
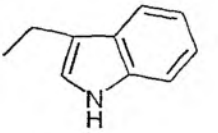
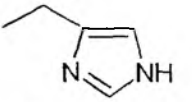
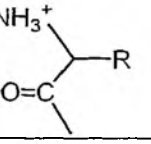
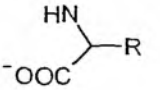
Pierwszym etapem połączenia PEG i cząsteczki leku jest aktywacja grup funkcyjnych któregoś z reagentów. Najczęściej mamy do czynienia z aktywacją grup funkcyjnych PEG z uwagi na to, że białko zawiera więcej niż jedną grupę. W pewnych przypadkach konieczne może być wprowadzenie nowej grupy funkcyjnej do leku lub do polimeru. Można to uzyskać poprzez:

- chemiczną transformację obecnej grupy funkcyjnej
- użycie reagentu dwufunkcyjnego
- oraz wprowadzenie technikami rekombinacji genetycznej aminokwasu do białka (np. cysteiny zawierającej grupę tiolową, lizyny zawierającej grupę aminową).

Odpowiednia aktywacja daje możliwość przyłączenia PEG do białka poprzez aminokwasy, takie jak: lizyna, cysteina, metionina, tryptofan, histydyna, arginina, kwas asparaginowy, kwas glutaminowy, glutamina, seryna, treonina, tyrozyna oraz poprzez grupę C-terminalną lub N-terminalną (Tab. 2) [13, 15, 17, 18].

Reakcja tworzenia koniugatu polega na ataku nukleofilowych grup występujących w białku, na odpowiednio aktywowaną cząsteczkę PEG. Nukleofilowość może być modulowana poprzez zmianę pH środowiska. Nukleofilowy atak ma miejsce w przypadku gdy pH jest wyższe lub równe pK_a [13].

Tabela 2. Potencjalne miejsca wiązania PEG z białkiem [13]

Aminokwas	
Lizyna	
Kwas asparaginowy	
Kwas glutaminowy	
Arginina	
Cysteina	
Metionina	
Seryna	
Treonina	
Tyrozyna	
Tryptofan	
Histydyna	
Grupa N-terminalna	
Grupa C-terminalna	

Najbardziej powszechną metodą modyfikacji jest połączenie aktywowanego PEG z grupą aminową lizyny, czy też z grupą N-terminalną [17]. Lizyna jest jednym z najczęściej występujących aminokwasów w białkach, mogąc stanowić nawet do 10% wszystkich aminokwasów. Zatem przyłączenie licznych łańcuchów PEG do białka może skutkować otrzymaniem heterogenicznej mieszaniny [15].

Rozwój procesu pegylacji można podzielić na dwa etapy: pierwszy, starszy, w którym występuje wiele problemów i drugi, młodszy, w którym problemy te zostały w pewnym stopniu rozwiązane [8, 15].

3.1. ZALETY I WADY PEGYLACJI

Do zalet procesu pegylacji leków należy zaliczyć:

1. Zmniejszenie antygenowości i immunogenności
2. Zabezpieczenie przed enzymatyczną degradacją leku
3. Zmniejszenie klirensu nerkowego, zwiększenie okresu półtrwania [8, 11, 13, 15, 19]
4. Zwiększenie rozpuszczalności w wodzie, oraz zmniejszenie wrażliwości leku na zmiany pH i temperatury
5. Zmniejszenie toksyczności [11]
6. Zwiększenie penetracji do tkanek nowotworowych (efekt EPR) [13, 19].

Jedyną wadą procesu pegylacji jest możliwość zmniejszenia aktywności leku *in vivo* [20].

3.1.1. Zmniejszenie antygenowości i immunogenności

Mimo, iż obecny, zaawansowany stan nauki pozwala poprzez zastosowanie technik rekombinowanego DNA uzyskać białka wysoce kompatybilne z ludzkim systemem immunologicznym, użycie tych białek jako leków jest w dalszym ciągu ograniczone ze względu na ich negatywne właściwości immunogenne.

Przyłączenie cząsteczki PEG do białka w znacznym stopniu wpływa na redukcje antygenowości i immunogenności, co zostało potwierdzone w licznych badaniach. Zjawisko to związane jest z osłanianiem epitopów struktur białkowych przez polimer. Dodatkową zaletą PEG jest, wspomniany wcześniej, wysoki stopień uwodnienia, dzięki czemu dostępność koniugatu dla przeciwciał jest jeszcze mniejsza. Antygenowość i immunogenność białka jest tym silniej redukowana, im więcej łańcuchów jest przyłączanych do tego białka, i im ich masa cząsteczkowa jest większa. Liczba łańcuchów oraz ich kształt zdaje się mieć tu większe znaczenie, niż ich masa cząsteczkowa. Szczególnie korzystny wpływ wywierają polimery rozgałęzione, o których jeszcze będzie mowa w dalszej części pracy. Czynnikami, które również mają znaczenie w jakim stopniu nastąpi redukcja antygenowości i immunogenności, są miejsce i sposób przyłączenia polimeru. Stabilne wiązanie jest pod tym względem korzystniejsze [19].

3.1.2. Zabezpieczenie przed enzymatyczną degradacją leku

Leki o charakterze białkowym są narażone na degradację pod wpływem działania enzymów takich jak trypsyna czy chymotrypsyna. Zasada działania PEG, jako czynnika osłaniającego przed enzymami, jest analogiczna do omówionej wyżej ochrony przed przeciwciałami. Również w tym przypadku obowiązuje reguła, iż skuteczność osłony białka przed enzymami jest wprost proporcjonalna do: ilości przyłączonych łańcuchów PEG, stopnia rozgałęzienia tych łańcuchów, oraz wielkości masy cząsteczkowej łańcuchów. Fakt ten został potwierdzony w licznych badaniach m.in. w badaniu polegającym na 50-minutowej inkubacji L-asparaginazy, PEG-L-asparaginazy i rozgałęzionej PEG-L-asparaginazy z trypsyną. Po inkubacji aktywność biologiczna wynosiła odpowiednio 5%, 25%, i 98% [11].

3.1.3. Zmniejszenie klirensu nerkowego, zwiększenie okresu półtrwania

Filtracja nerkowa jest główną drogą eliminacji związków z organizmu. O szybkości eliminacji będą decydowały takie czynniki jak wielkość cząstek, ich ładunek oraz ich kształt.

Graniczna masa cząsteczkowa, powyżej której cząsteczki nie bedą przechodziły do moczu wynosi ok. 70 kDa, co w przybliżeniu odpowiada wielkości albumin osoczowych. Białka o wyższej masie cząsteczkowej będą eliminowane innymi sposobami, jak np. poprzez wychwyt w wątrobie i usuwanie z żółcią, poprzez proteolityczny rozkład oraz w wyniku działania układu immunologicznego. Białka i peptydy używane w terapii często mają mniejszą masę cząsteczkową niż albuminy. Przyłączenie łańcuchów PEG skutecznie zwiększa masę cząsteczkową. Koniugaty charakteryzuje duża objętość wynikająca z hydratacji PEG.

Ładunek nie ma tak istotnego znaczenia jak masa cząsteczki. Stwierdzono jednak, że cząsteczki naładowane ujemnie podlegają wolniejszej filtracji w nerkach, niż cząsteczki neutralne czy też naładowane dodatnio. Przyłączenie PEG do grup aminowych występujących w białku, prowadzi do utraty ładunku dodatniego, co może dodatkowo obniżać klirens nerkowy [19].

3.1.4. Zwiększenie rozpuszczalności w wodzie, oraz zmniejszenie wrażliwości leku na zmiany pH i temperatury

Hydrofilowy charakter PEG stwarza możliwość wykorzystania go jako solubilizatora. Przykładem leku trudno rozpuszczalnego w wodzie jest taksol. Dzięki połączeniu go z PEG jego rozpuszczalność w wodzie wzrosła 6-krotnie. Poprawę rozpuszczalności obserwuje się również w przypadku metotreksatu, doksorubicyny, artemizyny oraz kamptotecyny [13]. Kolejną zaletą pegylacji jest zmniejszenie wrażliwości leku na zmiany pH i temperatury. Korzystniejsze pod tym względem jest stosowanie rozgałęzionego PEG [11].

3.1.5. Zmniejszenie toksyczności

Toksyczność leku o charakterze białkowym z jednej strony wynika z samych właściwości danego leku np. stosowanie Pegaspargazy, powodującej hamowanie syntezy białek przez organizm może prowadzić do hipoalbuminemii. Z drugiej strony działania niepożądane mogą się pojawić jako efekt odpowiedzi układu immunologicznego na obce białko [21].

Zmniejszenie toksyczności leku związanego z polimerem odbywa się na drodze dwóch mechanizmów. Po pierwsze, połączenie leku z polimerem powoduje poprawę jego farmakokinetyki, dzięki czemu może on być podawany rzadziej i w mniejszych dawkach. Prowadzona w ten sposób terapia zapewnia stałe stężenie leku we krwi i tym samym mniej działań niepożądanych. W przypadku leku niezwiązanego, konieczne jest częste jego podawanie w wysokich dawkach. Znaczne wahania stężenia leku we krwi, będące konsekwencją tego typu terapii, sprzyjają nasileniu działań niepożądanych. Po drugie, jak już wcześniej wspomniano, antygenowość i immunogenność białka po połączeniu z polimerem znacznie się zmniejsza [11].

3.1.6. Zwiększenie penetracji do tkanek nowotworowych (efekt EPR)

Zwiększenie penetracji koniugatu do tkanek nowotworowych związane jest ze specyfiką tych tkanek. Tkanki nowotworowe charakteryzuje zwiększona przepuszczalność w obrębie naczyń kapilarnych oraz zmniejszony odpływ limfy, co określane jest jako EPR (ang. *enhanced permeability and retention*). Większa przepuszczalność naczyń włosowatych sprzyja przechodzeniu większych cząstek oraz zatrzymywaniu ich w obrębie nowotworowo zmienionej tkanki, z uwagi na utrudniony odpływ limfy [13, 19]. Do lecznictwa został wprowadzony lek przeciwnowotworowy Prothecan, będący połączeniem kamptotecyny z PEG. Trwają badania nad możliwością tworzenia koniugatów z innymi lekami przeciwnowotorowymi, np. daunomycyną, doksorubicyną, melfalanem, czy też taksolem [13].

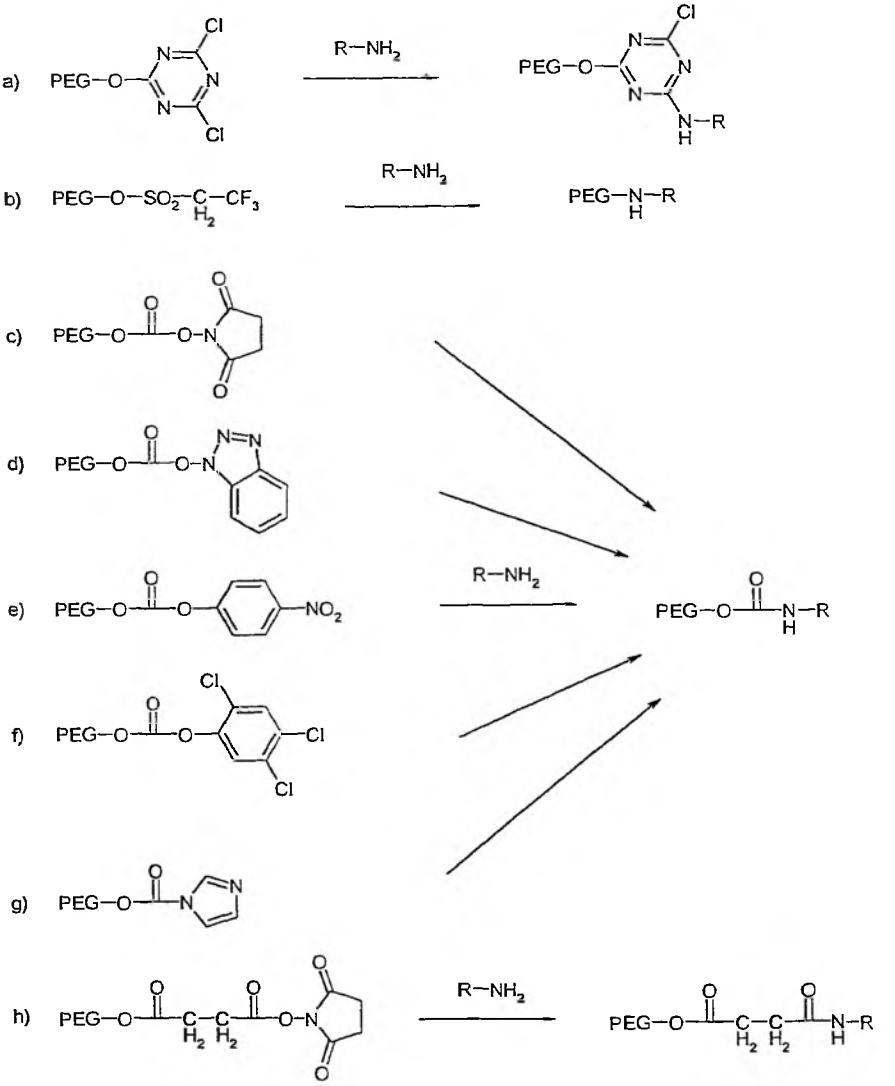
3.1.7. Zmniejszenie aktywności leku *in vitro*

Zmniejszenie aktywności leku *in vitro* związane jest z możliwością przyłączenia polimeru do miejsca aktywnego białka. Ze względu jednak na wszystkie wyżej wymienione zalety, aktywność koniugatu *in vivo* jest mimo to zdecydowanie większa, niż w przypadku wolnych białek [20].

3.2. REAKCJA PEGYLACJI PIERWSZEJ GENERACJI

Pierwszą generację reakcji pegylacji charakteryzują:

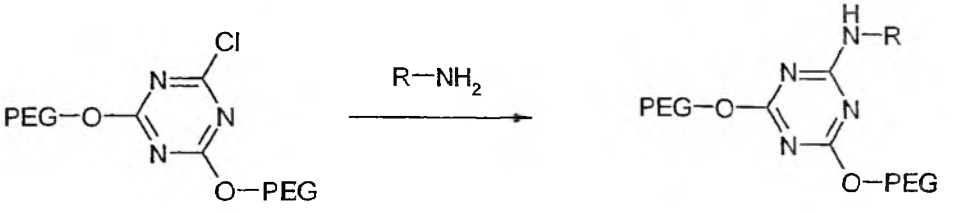
- przyłączenie PEG do grupy ε-aminowej lizyny lub grupy N-terminalnej.
- stosowanie polimeru liniowego o masie cząsteczkowej poniżej 12 kDa.
- często, występowanie niestabilnych wiązań pomiędzy polimerem a lekiem, które może być częściowo rozkładane podczas przygotowywania i wstrzykiwania.
- oraz obecność zanieczyszczeń mPEG diolem skutkująca powstawaniem wiązań krzyżowych [8, 15].



Rysunek 4. Pegylacja pierwszej generacji – przyłączenie aktywnych PEG do grupy aminowej [15]

Przykładami aktywnych pochodnych PEG stosowanych w metodach pierwszej generacji są: PEG-dichlorotriazyna, 1,1,1-trifluoroetylosulfonylo-PEG, węglan PEGylowo-sukcyn-imidylowy, węglan PEGylowo-benzotriazolowy, węglan PEGylowo-*p*-nitrofenylowy, węglan PEGylowo-2,4,6-trichlorofenylowy, PEG-karbonyloimidazol i bursztynian PEGylowo-sukcynimidylowy.

PEG-dichlorotriazyna może reagować z licznymi nukleofilowymi grupami funkcyjnymi aminokwasów takich jaki lizyna, seryna, tyrozyna, cysteina i histydyna. W wyniku reakcji, jeden atom chloru zostaje zastąpiony przez drugorzędowe wiązanie aminowe (Rys. 4a). Pozostały atom chloru jest mniej podatny na zastąpienie go przez kolejną cząsteczkę. Jednakże reakcja ta może zajść, powodując powstanie wiązań krzyżowych. Rozwiązaniem tego problemu jest zastosowanie 2,4-bis(mPEG)-6-chlorotriazyny, która stanowi przykład PEG rozgałęzionego (Rys. 5).



Rysunek 5. Reakcja z 2,4-bis(mPEG)-6-chlorotriazyną jako przykład otrzymywania PEG rozgałęzionego [15]

Kolejnym przykładem pochodnej z pierwszej generacji jest 1,1,1-trifluoroetylosulfonylo-PEG. Wykazuje większą wybiórczość w stosunku do grupy aminowej, niż poprzednia pochodna. W przypadku tej pochodnej, oprócz koniugatów połączonych za pomocą stabilnego, drugorzędowego wiązania aminowego (Rys. 4b), mogą powstawać także koniugaty połączone za pomocą łatwo rozkładanego wiązania sulfaminianowego.

Następnymi pochodnymi są węglan PEGylowo-sukcynimidylowy (Rys. 4c) i węglan PEGylowo-benzotriazolowy (Rys. 4d), które reagują głównie z grupą aminową lizyny, wytwarzając koniugat z wiązaniem uretanowym. Pochodne te mogą także reagować z histydyną i tyrozyną. Węglan PEGylowo-sukcynimidylowy jest produktem bardziej odpornym na hydrolizę, niż węglan PEGylowo-benzotriazolowy.

Innymi przykładami aktywowanego PEG są: węglan PEGylowo-*p*-nitrofenylowy (Rys. 4e), węglan PEGylowo-2,4,6-trichlorofenylowy (Rys. 4f), i PEG-karbonyloimidazol (Rys. 4g), które łączą się z białkiem również poprzez wiązanie uretanowe. W porównaniu do poprzednich dwóch pochodnych, wykazują znacznie mniejszą reaktywność. Reakcje z ich udziałem zachodzą wolniej, ale są bardziej wybiórcze w stosunku do grupy aminowej [15].

Ostatnim przykładem aktywowanego PEG pierwszej generacji jest bursztynian PEGylowo-sukcynimidylowy (Rys. 4h). Produkt reakcji tej pochodnej z grupą aminową lizyny wchodzącej w skład cząsteczki białka charakteryzuje się obecnością wiązania estrowego oraz wiązania amidowego. Wiązanie estrowe jest dosyć wrażliwe na hydrolizę, co znacząco zmniejsza korzyści wynikające ze stosowania koniugatu. Z drugiej strony pozostała reszta kwasu bursztynowgo, połączona wiązaniem amidowym z białkiem, może działać jak hapten, zwiększając immunogenność białka.

Przykładami leków otrzymanych metodami pierwszej generacji są Pegademaza (Adagen) i Pegaspargaza (Oncaspar) [15].

Pegademaza (Adagen)

Pegademaza jest produktem pegylacji deaminazy adenozynowej (ADA). Jest ona wykorzystywana w leczeniu zespołu ciężkiego, złożonego niedoboru odporności (SCID). SCID jest wrodzonym zaburzeniem układu odpornościowego wywołanym brakiem ADA. Zanim do lecznictwa została wprowadzona Pegademaza, SCID leczone było poprzez transfuzję czerwonych krwinek, które zawierają ADA. Aktywność ADA utrzymywała się 2–4 tygodni po transfuzji. Skutkami ujemnymi tej terapii była możliwość przeładowania organizmu żelazem, oraz wirusowego zakażenia. Ponadto Pegademaza wykazuje 1800-krotnie większą aktywność na mililitr, w porównaniu do czerwonych krwinek [8, 11].

Pegaspargaza (Oncaspar)

Pegaspargaza jest produktem pegylacji L-asparaginazy. Enzym L-asparaginaza przeprowadza proces hydrolizy L-asparaginy do kwasu asparaginowego i amoniaku. Enzym ten znalazł zastosowanie w leczeniu ostrej białaczki limfoblastycznej i przewlekłej białaczki szpikowej. Większość ludzkich tkanek posiada enzym, syntazę asparaginową (AS), dzięki której L-asparagina może zostać odtworzona z L-glutaminy. Natomiast wspomniane komórki nowotworowe, mające bardzo niski poziom AS, nie są w stanie odtworzyć tego aminokwasu, co prowadzi do ich śmierci. Enzym po podaniu domięśniowym charakteryzuje się krótkim okresem półtrwania oraz silną immunogenością. Połączenie L-asparaginazy z PEG skutkuje zwiększeniem okresu półtrwania z 20 do 357 godzin oraz redukcją odpowiedzi ze strony układu immunologicznego, przez co jakość życia pacjenta ulega wyraźnej poprawie [21].

3.3. REAKCJA PEGYLACJI DRUGIEJ GENERACJI

Drugą generację reakcji pegylacji charakteryzują:

1. zastosowanie polimerów o większej masie cząsteczkowej oraz usunięcie zanieczyszczeń diolem
2. zastosowanie polimerów rozgałęzionych
3. zastosowanie stabilnych wiązań z grupą aminową
4. zastosowanie wiązań PEG z cysteiną
5. przyłączenie PEG do części cukrowej glikoprotein
6. powolne uwalnianie leku [15].

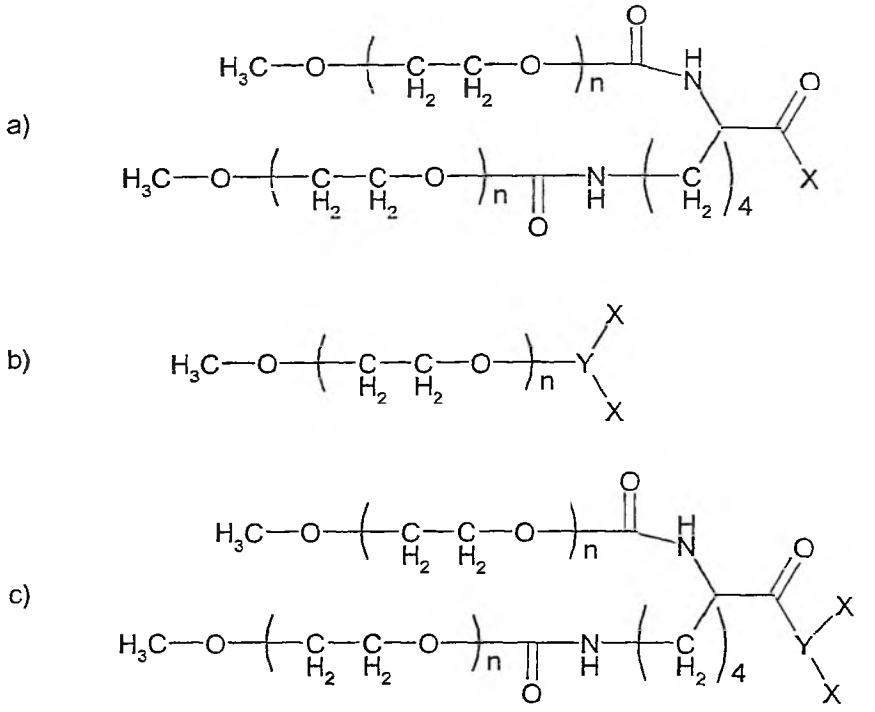
3.3.1. Zastosowanie polimerów o większej masie cząsteczkowej oraz usunięcie zanieczyszczeń diolem

Polimery o większej masie cząsteczkowej w większym stopniu redukują klirens nerkowy, tym samym okres półtrwania ulega znacznemu wydłużeniu. Usunięcie zanieczyszczeń diolem gwarantuje brak powstawania niekorzystnych wiązań krzyżowych [15].

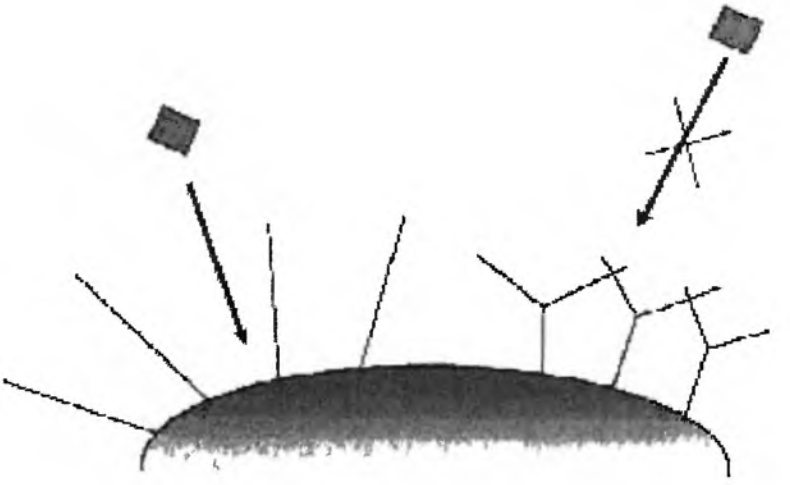
3.3.2. Zastosowanie polimerów rozgałęzionych

PEG rozgałęziony zapewnia większą ochronę przed proteolizą, większą redukcję immunogenności i antygenowości, oraz w mniejszym stopniu wpływa na redukcję aktywności *in vitro*. Wspomnianym już wcześniej przykładem rozgałęzionego PEG jest pochodna, 2,4-bis(mPEG)-6-chloro-triazyna (Rys. 5). Innym przykładem jest struktura oparta na rdzeniu lizyny (Rys. 6a). Otrzymana jest ona przez przyłączenie dwóch cząsteczek węglanu PEGylowo-sukcynimidylowego lub węglanu PEGylowo-benzotriazolowego do grup α i ε aminowych lizyny wiązaniami amidowymi. Tak otrzymany rozgałęziony PEG cechuje się lepszymi właściwościami w porównaniu do PEG liniowego o tej samej masie cząsteczkowej.

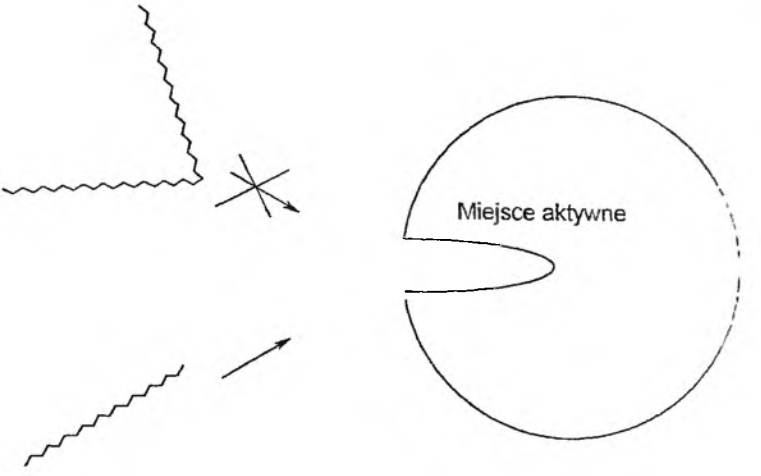
Jest on w stanie skuteczniej zabezpieczyć cząsteczkę białka przed działaniem enzymów, czy też przeciwciał. Rozgałęziony PEG na powierzchni połączonego z nim białka tworzy strukturę parasola, utrudniającą dostęp do białka (Rys. 7) [19, 22]. Drugą zaletą rozgałęzionego PEG jest to, iż zdecydownie mniej chętnie niż liniowy PEG, przyłącza się do aminokwasów, zlokalizowanych w centrum aktywnym białka (Rys. 8). Wpływa to na mniejszą redukcję aktywności biologicznej białka [22]. Do rozgałęzionych PEG można zaliczyć także układ przypominający widelec (Rys. 6b), który posiada dwie grupy aktywne na jednym końcu łańcucha mPEG. Strukturę taką uzyskuje się w reakcji mPEG ze związkiem posiadającym trzy grupy funkcyjne jak np. kwas glutaminowy lub seryna. Możemy mieć również do czynienia z połączeniem obydwu przypadków (Rys. 6c) [15].



Rysunek 6 Rozne struktury PEG [15]
X = cząsteczka,łącznik i/lub grupa funkcyjna, Y = grupa posiadająca atom węgla umozliwiający rozgałęzienie cząsteczki



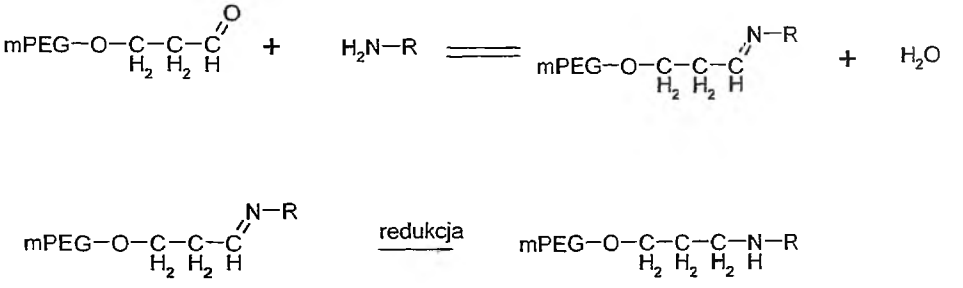
Rysunek 7 Struktura rozgałęzionego PEG w kształcie parasola zapewnia lepszą ochronę przed enzymami i przeciwciałami niż PEG liniowy przyłączony do białka [19 22]



Rysunek 8. Przyłączenie rozgałęzionego PEG do miejsca aktywnego białka jest trudniejsze niż w przypadku PEG liniowego [22]

3.3.3. Zastosowanie trwałych wiązań z grupą aminową

Trwałe wiązanie, oraz pewną selektywność w stosunku do grupy N-terminalnej można uzyskać stosując PEG-propionaldehyd w środowisku kwaśnym. W pH 5, reakcja zachodzi głównie z grupą N-terminalną, natomiast w mniejszym stopniu z grupami aminowymi lizyn. Całkowita selektywność nie jest osiągnięta, jednak heterogenność wynikająca z łączenia się z lizyną jest znacznie zmniejszona. Redukując zasadę Schiffa otrzymuje się trwałe drugorzędowe wiązanie aminowe (Rys. 9). Stabilne wiązanie gwarantuje trwałość leku podczas jego przygotowywania, przechowywania i wstrzykiwania [15].



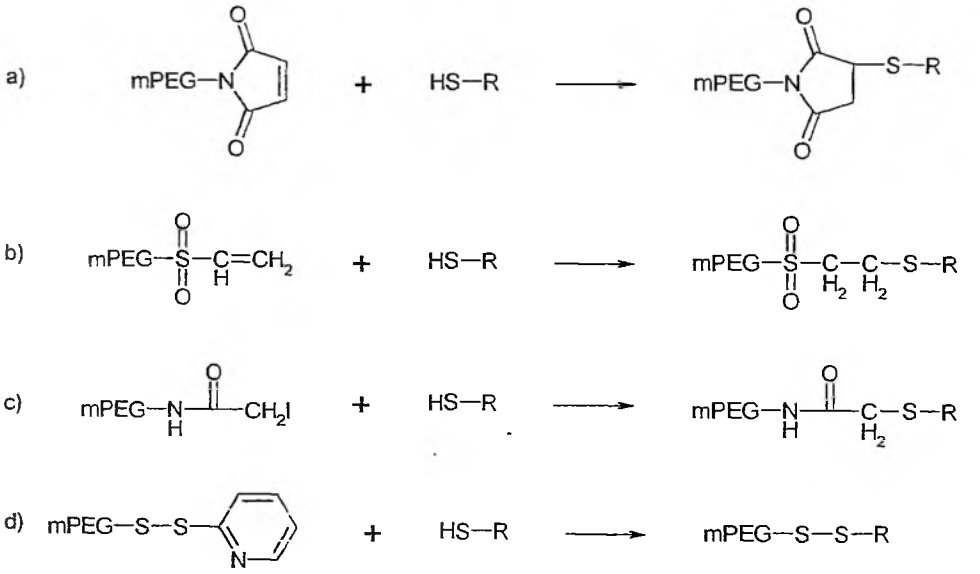
Rysunek 9. Pegylacja drugiej generacji – utworzenie trwałego, drugorzędowego wiązania aminowego [15]

3.3.4. Zastosowanie wiązań PEG z cysteiną

Przyłączenie PEG do białka poprzez cysteinę znacznie obniża możliwość heterogeniczności produktu z uwagi na to, iż aminokwas ten występuje z reguły rzadko, w przeciwieństwie do lizyny. Jeżeli cysteina nie występuje w białku w ogóle, można ją wprowadzić na drodze inżynierii genetycznej. Dodatkową zaletą połączenia PEG z tak zmienionym białkiem jest minimalizacja ryzyka utraty jego aktywności biologicznej, z którą mamy do czynienia gdy PEG zwiąże się z białkiem w miejscu aktywnym. Do połączenia z cysteiną wykorzystywane są pochodne PEG takie jak: PEG-maleinimid [23], winylosulfonylo-PEG, jodoacetamido-PEG i disulfid PEGylowo-*o*-pirydylowy.

Winylosulfonylo-PEG reaguje powoli w pH 7–8 z grupą tiolową, tworząc stabilne wiązanie tioeterowe (Rys. 10b). Reakcja zachodzi szybciej przy wyższym pH, jednak istnieje ryzyko połączenia również z lizyną.

PEG-maleinimid jest bardziej reaktywny nawet w niższym pH 6–7, jednak jest nietrwały w środowisku wodnym, w którym może dojść do rozerwania pierścienia lub addycji cząsteczki wody do wiązania podwójnego. PEG-maleinimid wiąże się z białkiem stabilnym wiązaniem tioeterowym (Rys. 10a).



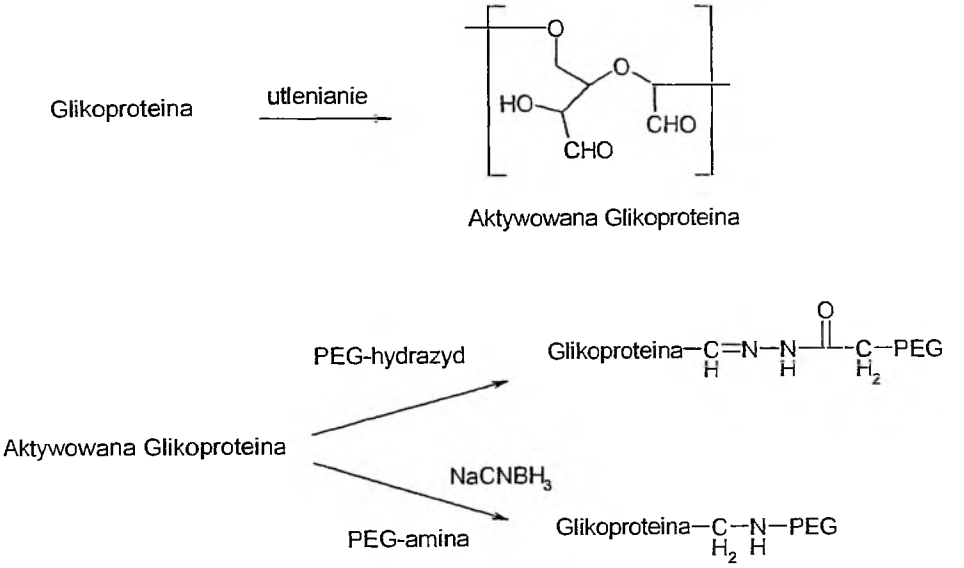
Rysunek 10. Pegylacja drugiej generacji – przyłączenie aktywnych PEG do grupy tiolowej [15]

Jodoacetamido-PEG reaguje powoli z grupą tiolową na drodze substytucji nukleofilowej tworząc trwałe wiązanie tioeterowe (Rys. 10c).

Disulfid PEGylowo-*o*-pirydylowy łączy się z cysteiną w zakresie pH 3–10 wiązaniem disulfidowym. Wiązanie to może być rozłożone w środowisku redukującym (Rys. 10d) [15].

3.3.5. Przyłączenie PEG do części cukrowej glikoprotein

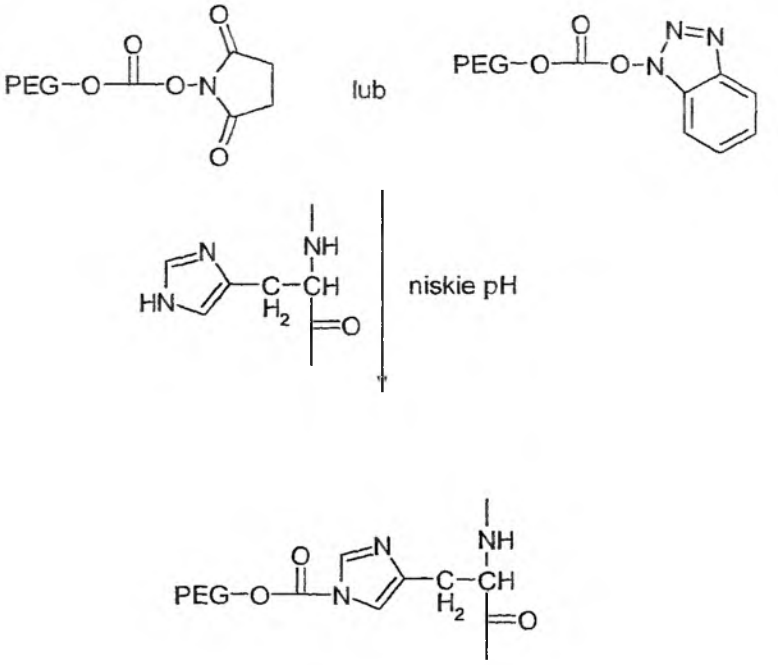
Glikoproteiny mogą być modyfikowane także z użyciem ich części cukrowej. W pierwszym etapie należy uaktywnić resztę cukrową, poprzez utlenienie metodami enzymatycznymi lub chemicznymi. Uzyskane w ten sposób grupy aldehydowe mogą przereagować z PEG-hydrazydem, tworząc hydrazon lub PEG-aminą, tworząc zasadę Schiffa. W wyniku redukcji wiązań otrzymanych produktów otrzymuje się stabilne wiązania hydrazydowe i aminowe drugorzędowe. W przypadku zastosowania PEG-aminy istnieje ryzyko powstania wiązań krzyżowych pomiędzy grupami aminowymi w białku, a aldehydowymi w cukrze. Korzystniejsze jest zatem zastosowanie PEG-hydrazydu. W środowisku kwaśnym przy pH 5 grupy aminowe w białku są uprotonowane, w przeciwieństwie do słabszej zasady jaką jest hydrazyd, co zapewnia selektywność reakcji. Aktywację poprzez utlenienie grup hydroksylowych mozna także zastosować w przypadku białek z N-terminalną seryną lub treoniną [15].



Rysunek 11. Pegylacja drugiej generacji – przyłączenie PEG do aktywowanej glikoproteiny [15]

3.3.6. Powolne uwalnianie leku

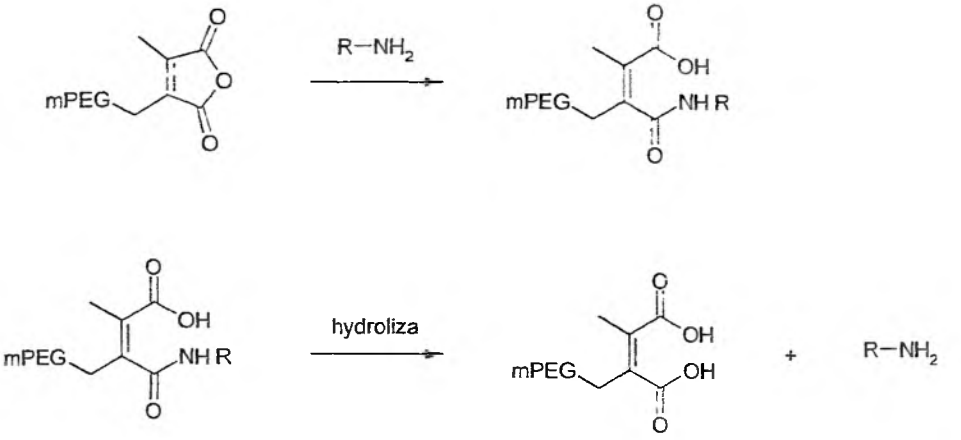
W większości przypadków procesów pegylacji drugiej generacji mamy do czynienia z wytworzeniem stabilnego wiązania pomiędzy polimerem a białkiem. Stabilne wiązanie zapewnia możliwość łatwiejszego oczyszczania, oraz długotrwałego przechowywania leku, bez ryzyka jego rozkładu. Z drugiej strony stabilne wiązanie może powodować redukcję aktywności biologicznej białka, ze względu na możliwość przyłączenia się polimeru do miejsca aktywnego białka. Optymalnym rozwiązaniem byłoby zastosowanie połączenia gwarantującego polepszoną farmakokinetykę leku, bez wpływu na jego aktywność biologiczną. Zastosowanie wiązania powoli rozkładanego w organizmie, prowadziłoby do uwalniania wolnej cząsteczki leku o pełnej aktywności biologicznej. Przykładem występowania tego typu wiązania jest zastosowany w lecznictwie PEG-intron. PEG-intron powstaje w wyniku reakcji węglanu PEGylowo-sukcynimidylowego lub węglanu PEGylowo-benzotriazolowego z interferonem α-2b przy pH ok. 5. Łańcuch PEG łączy się wiązaniem uretanowym z pierścieniem imidazolowym histydyny (Rys. 12). W organizmie wiązanie to jest powoli hydrolizowane i uwalniany jest wolny interferon.



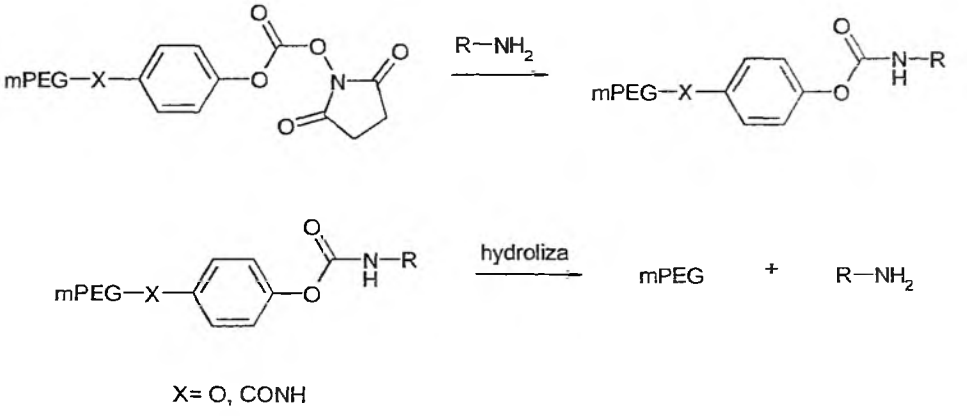
Rysunek 12. Pegylacja drugiej generacji – przyłączenie aktywnych PEG do histydyny interferonu α-2b [15]

Powolne uwalnianie leku z koniugatu może odbywać się pod wpływem hydrolizy [24, 25], czy też redukcji. Poniżej podane są przykłady koniugatów posiadają-

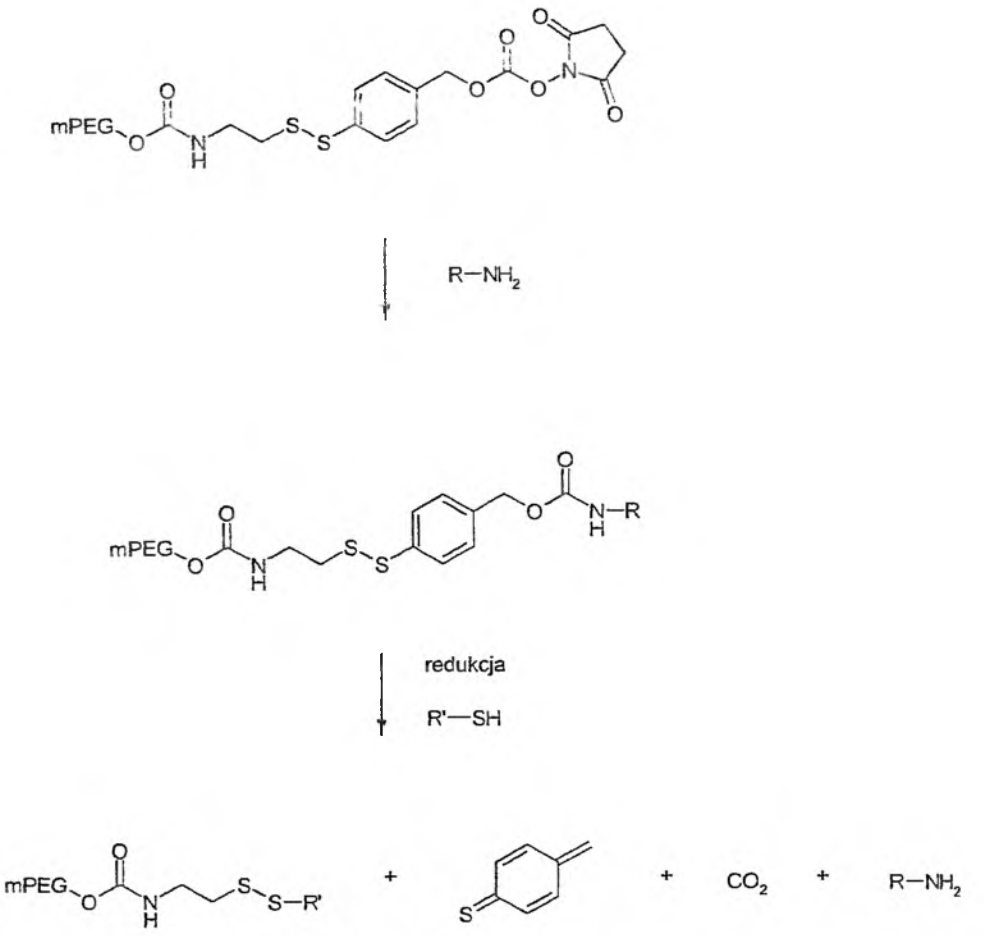
cych wiązanie hydrolizujące (Rys. 13, 14) oraz koniugatu, którego wiązanie rozkładane jest w środowisku redukującym (Rys. 15).



Rysunek 13. Pegylacja drugiej generacji – powstawanie koniugatu i powolne uwalnianie leku z koniugatu na drodze hydrolizy [15]



Rysunek 14. Pegylacja drugiej generacji – powstawanie koniugatu i powolne uwalnianie leku z koniugatu na drodze hydrolizy [15]



Rysunek 15. Pegylacja drugiej generacji – powstawanie koniugatu i powolne uwalnianie leku z koniugatu na drodze redukcji [15]

Przykładami leków otrzymanych metodami drugiej generacji są Peginterferon α-2b (PEG-intron), Peginterferon α-2a (Pegasys), Pegvisomant (Somavert) i Pegfilgrastim (Neulasta) [15].

Peginterferon α-2b (PEG-intron) i Peginterferon α-2a (Pegasys)

Interferony są cytokinami produkowanymi przez wszystkie komórki organizmu w odpowiedzi głównie na infekcje wirusami, ale także bakteriami i na kontakt z antygenami i mitogenami. Interferony hamują zakażanie kolejnych komórek przez wirusy, jak również mnożenie się komórek nowotworowych. Rekombinowane interferony wykorzystywane są w leczeniu przede wszystkim wirusowego zapalenia wątroby

typu C, ale także nowotworów, takich jak przewlekła białaczka szpikowa, chłoniak nieziarniczy, czerniak złośliwy [26].

Infekcje wirusem typu C są główną przyczyną przewlekłych chorób wątroby oraz nowotworów tego narządu, prowadzących do konieczności transplantacji. Terapia interferonem w WZW typu C nie prowadzi do całkowitego wyleczenia pacjenta, ale jest w stanie zahamować namnażanie się wirusa. Dodatkowe zastosowanie doustne Ribawiryny zwiększa skuteczność terapii. Zwiększenie skuteczności można również osiągnąć, przez zastosowanie PEG-interferonów [27].

Peginterferon α-2b (PEG-intron) otrzymuje się przez przyłączenie jednego mPEG 12 kDa do interferonu α-2b. W rekacji, wykorzystywany jest węglan PEGylowo-sukcynimidylowy, który przy pH 6,5 przyłącza się w największym stopniu do azotu pierścienia imidazolowego histydyny (His^{34}). W organizmie interferon jest powoli uwalniany z połączenia z PEG, dzięki czemu aktywność biologiczna leku rośnie. PEG-intron podawany jest pacjentom raz w tygodniu (interferon podawany jest 3 razy w tygodniu), w postaci podskórnego wstrzyknięcia [26].

Peginterferon α-2a (Pegasys) powstaje przez przyłączenie jednej cząsteczki rozgałęzionego mPEG 40 kDa do interferonu α-2a. Reakcja zachodzi pomiędzy aktywowaną grupą karboksylową rozgałęzionego mPEG a grupą aminową lizyny, z utworzeniem stabilnego wiązania amidowego. Spośród 11 możliwych miejsc połączeń, interferon wiąże się głównie z Lys^{31}, Lys^{121}, Lys^{131}, Lys^{134}. Pegasys podawany jest pacjentom raz w tygodniu, w postaci podskórnego wstrzyknięcia [28].

Pegvisomant (Somavert)

Pegvisomant jest antagonistą receptora dla hormonu wzrostu (GHR) i stosowany jest w leczeniu akromegalii. Akromegalia jest chorobą wywołaną nadczynnością przysadki mózgowej w zakresie produkcji hormonu wzrostu (GH) po okresie dojrzewania. Hormon wzrostu oddziałuje poprzez receptor GHR znajdujący się w wątrobie, nerkach, kościach, mięśniach, tkance tłuszczowej, mózgu i sercu, pobudzając produkcję insulinopodobnego czynnika wzrostu (IGF-1). W akromegalii nadmiar IGF-1 objawia się powiększeniem dłoni, stóp, nosa, uszu, języka , pogrubieniem rysów twarzy, zgrubieniem skóry i stwardnieniem włosów, wydłużeniem zuchwy, nadciśnieniem, cukrzycą i w konsekwencji zwiększoną śmiertelnością. GH będący polipeptydem składającym się ze 191 aminokwasów można zmodyfikować, zastępując glicynę, argininą w pozycji 120. Uzyskany tak polipeptyd jest antagonistą kompetycyjnym GHR, który normalizuje poziom IGF-1 we krwi. Posiada on jednak bardzo krótki okres półtrwania < 20 min, dlatego w terapii stosowany jest tylko po połączeniu z PEG. Okres półtrwania Pegvisomantu wynosi 70 godzin [29].

Pegfilgrastim (Neulasta)

Pegfilgrastim jest stosowany w neutropenii indukowanej chemioterapią. Jednym z efektów ubocznych chemioterapii nowotworów jest supresja szpiku, prowadząca do neutropenii. Skutkami neutropenii są gorączka, oraz zwiększona podatność na infekcje bakteryjne. W związku z tym często wymagana jest dodatkowo antybiotykoterapia. Jakość życia pacjenta ulega pogorszeniu, a koszty leczenia są zwiększone. Filgrastim jest rekombinowanym, ludzkim czynnikiem wzrostu granulocytów (rh G-CSF), który wzmaga dojrzewanie i uwalnianie neutrofili ze szpiku do krwi [30]. Zastosowanie Filgrastimu jest ograniczone krótkim okresem półtrwania. Poprzez przyłączenie mPEG 20 kDa do N -terminalnej metioniny rh G-CSF stabilnym drugorzędowym wiązaniem aminowym, uzyskano Pegfilgrastim o znacznie poprawionej farmakokinetyce [31].

4. INNE PEPTYDY I BIAŁKA MODYFIKOWANE PRZEZ POŁĄCZENIE Z PEG

Prócz wymienionych powyżej pegylowanych struktur wprowadzonych do lecznictwa, w Tabeli 3 zebrano inne struktury pegylowane stosowane już w lecznictwie i te dla których badania są w toku (Tab. 3) [13, 32–39].

Tabela 3. Enzymy i białka modyfikowane przez połączenie z PEG [13, 32–39]

Enzymy	Białka
deaminaza adenozynowa, fosfataza alkaliczna, argmaza, asparaginaza, katalaza, chymotrypsyna, cytochrom C, galaktozydaza alfa i beta, beta- glukuronidaza, glutaminaza-asparaginaza, kalikreina, lipaza, peroksydaza, fosforylaza purynowa, streptokinaza, stafylokinaza [34], dysmutaza ponadtlenkowa [38], tkankowy aktywator plazminogenu, trypsyna, tryptofanaza, urokinaza, urykaza	albumina, antygen E, butroxobina, erytropoetyna, czynnik VIII, G-CSF, GM-GSF, Hb, h-GH, GRF [29, 33], hirudyna, jad pszczoły, IgG, immunotoksyna, insulina [36], interferon α-2a i α-2b [39], interferon β-1a [32], interferon β-1b, interleukina-2, interleukina-6, inhibitor proteinazy alfa-1 [23], somatostatyna, TNF [25], sTNF-RI [34, 40] oraz przeciwciała i ich fragmenty [37]

5. POŁĄCZENIA POLIMERÓW Z LEKAMI NISKOCZĄSTECZKOWYMI

Jak już wcześniej wspomniano proces pegylacji nie ogranicza się jedynie do struktur białkowych. Poprawę właściwości fizykochemicznych leku obserwuje się także w przypadku leków niskocząsteczkowych (Tab. 4) [13].

Tabela 4. Leki niskocząsteczkowe modyfikowane przez połączenie z polimerami

PEG	Inne polimery
Doksorubicyna	Doksorubicyna
Taxol	Melfalan
Metotreksat	Norfloksacyna
Kamptotecyna (Prothecan)	Daunomycyna
Indometacyna	Cyklofosfamid
Artemizyna	5-fluorouracyl
Teofilina [41]	

PODSUMOWANIE

Wytwarzanie koniugatów polimerów zarówno z prostymi strukturami jak i ze strukturami o budowie złożonej typu peptydy, enzymy, przeciwciała i ich fragmenty czy olinukleotydy w celu dostarczania leków budzi coraz większe zainteresowanie w przemyśle farmaceutycznym. Labilne oligonukleotydy, włączając struktury antysensowe, są sprzęgane z pozytywnym efektem z polimerami w celu zwiększenia ich penetracji do wnętrza komórek i zwiększenia trwałości względem nukleaz. Najważniejszy obszar badań, zarówno prowadzonych aktualnie jak i dających nadzieję na kontynuację w przyszłości dotyczy polipeptydów i białek. Wynika to z jednej strony z rosnącej dostępności tych substancji, które mogą być produkowane obecnie na dużą skalę metodami inzynierii genetycznej, z drugiej zaś z ich specyficznych właściwości utrudniających bezpośrednie podawanie pacjentom. Białka są łatwo rozkładane przez *endo* i *egzo*-peptydazy zarówno we krwi jak i innych rejonach organizmu, wiele z nich jest immunogennych, a także ulega szybkiemu wydalaniu na drodze filtracji nerkowej. Kowalencyjne przyłączenie polimerów na powierzchni białek rozwiązuje lub minimalizuje te problemy. Opracowano już wiele oryginalnych leków – połączeń z polimerami – produktów pegylacji, a ogromna liczba dalszych jest w badaniach o róznym stopniu zaawansoawania. Rozwijana jest biokoniugacja – dziedzina chemii, która opracowuje metody syntetyczne umozliwiające z duzą specyficznością i w bardzo łagodnych warunkach przyłączać struktury polimerowe, co prowadzi do otrzymania cząsteczek o pożądanej masie cząsteczkowej, kształcie, strukturze i ściśle zaprojektowanym miejscu i rodzaju koniugacji. Zarówno pegylacja, jak i biokoniugacja z innymi peptydami są dziedzinami, które będą w przyszłości intensywnie rozwijane, w dziedzinie polipeptydów, białek, enzymów, przeciwciał monoklonalnych, kwasów nukleinowych, a także struktur niskocząsteczkowych.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

[1] G. Walsh, *Biopharmaceuticals Biochemistry and Biotechnology*, wyd. II, John Wiley & Sons, Chichester 2003.

[2] W. Kreis, D. Baron, G. Stoll, *Biotechnologie der Arzneistoffe*, Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart 2001.

[3] T. Dingermann, *Gentechnik Biotechnik*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart 1999.

[4] O. Kayser, R. H. Müller, *Pharmaceutical Biotechnology Drug Discovery and Clinical Applications*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA 2004.

[5] K. Kieć-Kononowicz, Biotechnologia, 2004, **66**, 87.

[6] K. Kieć-Kononowicz, Farmacja Polska, 2005, **61**, 407.

[7] F.M. Veronese, Adv. Drug Deliv. Rev., 2002, **54**, 453.

[8] J.M. Harris, R.B. Chess, Nature Rev. Drug Discov., 2003, **2**, 214.

[9] F.F. Davis, Adv. Drug Deliv. Rev., 2002, **54**, 457.

[10] J.M. Harris, F.M. Veronese, Adv. Drug Deliv. Rev., 2003, **55**, 1259.

[11] J.M. Harris, N.E. Martin, M. Modi, Clin. Pharmacokinet., 2001, **40**, 539.

[12] R. Duncan, Nature Rev. Drug Discov., 2003, **3**, 347.

[13] F.M. Veronese, M. Morpurgo, Il Farmaco, 1999, **54**, 497.

[14] C. Elvira, A. Gallardo, J.S. Roman, A. Cifuentes, Molecules, 2005, **10**, 114.

[15] M.J. Roberts, M.D. Bentley, J.M. Harris, Adv. Drug Deliv. Rev., 2002, **54**, 459.

[16] R. Mehvar, J. Pharm. Pharmaceut. Sci., 2000, **3**, 125.

[17] O. Kinstler, G. Molineux, M. Treuheit, D. Ladd, C. Gegg, Adv. Drug Deliv. Rev., 2002, **54**, 477.

[18] H. Sato, Adv. Drug Deliv. Rev., 2002, **54**, 487.

[19] P. Caliceti, F.M. Veronese, Adv. Drug Deliv. Rev., 2003, **55**, 1261.

[20] R.K. Reddy, Ann. Pharmacother., 2000, **34**, 915.

[21] M.L. Graham, Adv. Drug Deliv. Rev., 2003, **55**, 1293.

[22] F.M. Veronese, Biomaterials, 2001, **22**, 405.

[23] A.M. Cantin, D.E. Woods, D. Cloutier, E.K. Dufour, R. Leduc, Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., 2002, **27**, 659.

[24] H. Tsubery, M. Mironchik, M. Fridkin, Y. Shechter, J. Biol. Chem., 2004, **279**, 38118.

[25] S. Tsunoda, T. Ishikawa, Y. Yamamoto, H. Kamada, K. Koizumi, J. Matsui, Y. Tsutsumi, T. Hirano, T. Mayumi, J. Pharmacol. Exp. Ther., 1999, **290**, 368.

[26] Y-S. Wang, S. Youngster, M. Grace, J. Bausch, R. Bordens, D. F. Wyss, Adv. Drug Deliv. Rev., 2002, **54**, 547.

[27] D.E. Bakrr, Rev. Gastroenterol. Disord., 2001, **1**, 87.

[28] R.K. Reddy, M.W. Modi, S. Pedder, Adv. Drug Deliv. Rev., 2002, **54**, 571.

[29] C. Parkinson, J.A. Scarlett, P.J. Trainer, Adv. Drug Deliv. Rev., 2003, **55**, 1303.

[30] W.P. Petros, Pharmacotherapy, 2003, **23**, 1S.

[31] G. Molineux, Pharmacotherapy, 2003, **23**, 3S.

[32] R.B. Pepinsky, D.J. Lepage, A. Gill, A. Chakraborty, S. Vaidyanthan, M. Green, D.P. Baker, E. Whalley, P.S. Hochman, P. Martin, J. Pharmacol. Exp. Ther., 2001, **297**, 1059.

[33] P. Esposito, L. Barbero, P. Caccia, P. Caliceti, M. D'Antonio, G. Piquet, F.M. Veronese, Adv. Drug Deliv. Rev., 2003, **55**, 1279.

[34] C.K. Edwards, S.W. Martin, J. Seely, O. Kinstler, S. Buckel, A.M. Bendele, M.E. Consenza, U. Feige, T. Kohno, Adv. Drug Deliv. Rev., 2003, **55**, 1315.

[35] R.W. Moreadith, D. Collen, Adv. Drug Deliv. Rev., 2003, **55**, 1337.

[36] K.D. Hinds, S.W. Kim, Adv. Drug Deliv. Rev., 2002, **54**, 505.

[37] A.W. Chapman, Adv. Drug Deliv. Rev., 2002, **54**, 531.

[38] F.M. Veronese, P. Caliceti, O. Schiavon, M. Sergi, Adv. Drug Deliv. Rev., 2002, **54**, 587.
[39] M.J. Grace, S. Lee, S. Bradshaw, J. Chapman, J. Spond, S. Cox, M. DeLorenzo, D. Brassard, D. Wylie, S. Cannon-Carlson, C. Cullen, S. Indelicato, M. Voloch, R. Bordens, J. Biol. Chem., 2005, **280**, 6327.
[40] B.A. Kerwin, B.S. Chang, C.V. Gegg, M. Gonnelli, T. Li, G.B. Strambini, Protein Sci., 2002, **11**, 1825.
[41] M. Zacchigna, G. Di Luca, F. Cateni, S. Zorzet, V. Maurich, Il Farmaco 2003, **58**, 1307.

Praca wpłynęła do Redakcji 26 lipca 2005

WIADOMOŚCI 2005, 59, 11-12
chemiczne PL ISSN 0043-5104

PEPTYDY SYGNAŁOWE ROŚLIN

PLANT SIGNALING PEPTIDES

Agata Bahyrycz, Danuta Konopińska, Katarzyna Szymanowska

Wydział Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego,
ul. F. Joliot-Curie 14, 50-383 Wrocław
e-mail. dk@wchuwr.chem uni.wroc.pl

Abstract
Wstęp
Systemina
  Badania konformacyjne systeminy
Fitosulfokiny (PSK)
  Odkrycie i właściwości biologiczne fitosulfokin
  Prekursor fitosulfokin
  Receptor fitosulfokin
  Zależność między strukturą a funkcją fizjologiczną PSK
Inne peptydy sygnałowe roślin
  ENOD40
  CLAVATA3 (CLV3)
  S-locus
Podsumowanie
Piśmiennictwo cytowane

Dr Agata Bahyrycz ukończyła studia na Wydziale Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego, gdzie następnie wykonała pracę doktorską dotyczącą chemii peptydów sygnałowych roślin.

Po uzyskaniu stopnia doktora nauk chemicznych w 2005 r. została zatrudniona na tutejszym Wydziale Chemii UWr. na stanowisku asystenta.

Główne kierunki jej zainteresowań to badania w zakresie biologicznie czynnych peptydów, w tej liczbie hormonów peptydowych pochodzenia roślinnego. Dotyczą one syntezy i badań stereochemicznych.

Mgr Katarzyna Szymanowska ukończyła studia na Wydziale Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego w 2004 r. Obecnie jest studentką II roku Studium Doktoranckiego na tutejszym wydziale. Przedmiotem jej pracy magisterskiej były substancje sygnałowe roślin. Obecnie bada peptydy miotropowe owadów.

Prof. dr hab. Danuta Konopińska jest kierownikiem Zespołu Chemii Produktów Naturalnych na Wydziale Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego. Przedmiotem jej zainteresowania i badań są biologicznie czynne peptydy. W ostatnich 20 latach prace swoje skupiła na hormonach peptydowych owadów, takich jak: proktolina, hormony adypokinetyczne, leukopirokinina oraz hormonach peptydowych roślin. Jest autorką lub współautorką 190 oryginalnych publikacji.

ABSTRACT

Subject of the paper are a signaling plant peptides. There are peptides of a new generation, regulating processes of growth, differentiation and other physiological plant function.

Here will presented the literature data and results of our studies. Especially the results of structure/function relationship studies will presented for systemin and phytosulfokine-α.

Key words: plant peptide hormons, phytosulfokine-α, PSK-α

Słowa kluczowe: hormony peptydowe roślin, fitosulfokina-α, PSK-α

WSTĘP

Już w XIX wieku zwrócono uwagę, że w organizmach roślinnych występują przekaźniki chemiczne, które regulują fizjologiczne procesy roślin. Pierwszych odkryć w tym zakresie dokonano w latach 30. XX wieku, kiedy wyizolowano z roślin auksynę, hormon wzrostowy o nieskomplikowanej strukturze chemicznej [1, 2]. W następnych latach wyodrębniono szereg dalszych hormonów roślin o zróżnicowanej strukturze chemicznej, takich jak: giberelina [3], cytokininy [4], kwas abscysynowy [5], jasmoniany [6], etylen [7] lub brasinosteroidy [8]. Substancje te są odpowiedzialne za procesy wzrostu, rozwoju, namnażania się i podziału komórek, występowanie tropizmów, dojrzewania, starzenia się i procesy syntezy enzymów w organizmach roślin. Zadziwiające było to, że wśród omawianych substancji, aż do lat 90. XX stulecia nie opisano substancji o charakterze peptydowym. Wcześniej wyodrębniano z roślin niższych i wyższych wiele połączeń o charakterze peptydowym, ale były to przeważnie metabolity roślin jak np. antybiotyki lub toksyny. Dopiero w ostatnim dziesięcioleciu XX wieku zostały zidentyfikowane endogenne peptydy sygnałowe i wzrostowe roślin. Odkrycie tych hormonów daje początek nowym kierunkom badań w zakresie fitochemii i fizjologii roślin.

Obecnie znamy pięć grup hormonów peptydowych takich jak: systemina [9], fitosulfokiny [10–13], peptydy ENOD40 [14–17], CLAVATA3 [18] oraz S-locus [19–22], które będą przedmiotem niniejszego artykułu.

Badania dotyczące systeminy i fitosulfokiny-α są w większym stopniu reprezentowane w literaturze i zostaną szerzej omówione w niniejszym artykule.

SYSTEMINA

Systemina, oktadekapeptyd o sekwencji Ala-Val-Gln-Ser-Lys-Pro-Pro-Ser-Lys--Arg-Asp-Pro-Pro-Lys-Met-Gln-Thr-Asp został wyodrębniony po raz pierwszy w 1991 roku przez Ryana i wsp. [9] ze zranionych liści pomidorów (*Lycopersicon esculentum*). Zranienie może być wynikiem działania żerujących na roślinie owadów lub innego uszkodzenia mechanicznego. Systemina aktywuje syntezę inhibitorów proteinaz nie tylko w uszkodzonych tkankach, ale także w odległych nieuszkodzonych częściach rośliny [23].

W dalszych badaniach peptyd ten został wyodrębniony również z innych gatunków roślin z rodziny psiankowatych (*Solanaceae*), jak: ziemniak, pieprz turecki oraz psianka czarna [24].

Systemina znajduje się w całej roślinie z wyjątkiem podstaw korzenia [25]. Poszukiwanie systeminy u innych gatunków roślin, jak łubin [26], czy liście topoli [27] nie przyniosły oczekiwanych rezultatów. Sekwencje aminokwasowe systeminy izolowanej z różnych gatunków roślin z rodziny *Solanaceae* nieznacznie różnią się od siebie (Tabela 1) [24].

Tabela 1. Sekwencje aminokwasowe systeminy u różnych gatunków roślin [40]

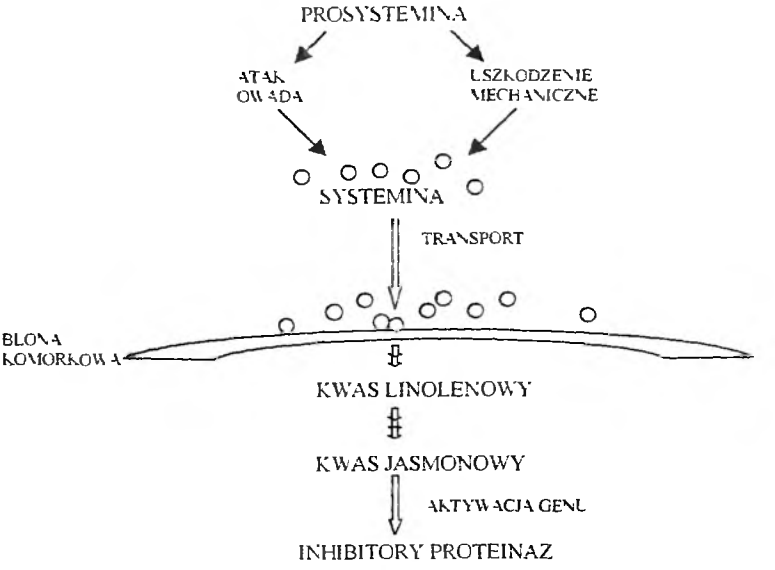
Rodzaj rośliny	Sekwencja aminokwasowa
Lycopersicon esculentum	AVQSKPPSKRDPPKMQTD
Solanum tuberosum-2	AVHSTPPSKRDPPKMQTD
Solanum tuberosum-2	AAHSTPPSKRDPPKMQTD
Solanum nigrum	AVRSTPPPKRDPPKMQTD
Capsrum annuum	AVHSTPPSKRPPPKMQTD

Jak wykazały badania, systemina jest uwalniana z prekursora, prosysteminy [23, 28] i jest jej oktapeptydowym fragmentem występującym w pozycji 179–196, zajmującym obszar w pobliżu jej C-końca. Peptyd ten od N-końca graniczy z resztą Leu, a od C-końca z fragmentem tetrapeptydowym: H-Asn-Asn-Lys-Leu-OH (Rysunek 1).

MGTPSYDIKNKGDDMQEEPKVKLHHEKGGDEKEKIIEKETPSQDENN
KDTISSYVLRDDTQEIPKMEHEEGGYVKEKIVEKETESQYIIKIEGD
DDAQEKLKVEYEEEEYEKEKIVEKETPSQDINNKGDDAQEKPDVEH
EEGDDKETPSQDIIKMEGEGALEITKVVCEKIIVREDL**AVQSKPPSKRD**
PPKMQTDNNKL

Rysunek 1. Sekwencja aminokwasowa prosysteminy z zaznaczoną sekwencją aminokwasową systeminy (reszty 179–196) [24]

Z uwagi na to, że prosystemina jest prekursorem systeminy, należy poświęcić jej nieco uwagi. Składa się ona z 200 reszt aminokwasowych i zawiera 43% polarnych reszt aminokwasowych [23]. W roślinach jest zmagazynowana w nieznacznych ilościach w liściach, a poziom jej wzrasta w odpowiedzi na zranienie rośliny [28]. Stres wywołany uszkodzeniem rośliny uruchamia biosyntezę prosysteminy wraz z zespołem enzymów proteolitycznych, które mają za zadanie uwolnienie systeminy [23]. Należy też wspomnieć, że np. w pomidorach transgenicznych dochodzi do nadmiernej ekspresji prosysteminy (tak jakby rośliny były stale uszkadzane), co wskazuje, że nadekspresja prosysteminy jest wystarczającym czynnikiem do uruchamiania szlaku oktanowego [24]. Ryan i wsp. [29] na podstawie prowadzonych przez siebie badań zaproponowali mechanizm działania systeminy u roślin. Jest to złożony proces regulowanych enzymatycznie przemian uruchamiających całą skomplikowaną kaskadę sygnałową w roślinie [30]. W konsekwencji prowadzi to do uwolnienia kwasu jasmonowego aktywującego gen obronny (Rysunek 2).



Rysunek 2. Mechanizm uwalniania systeminy z jej prekursora [25]

Ten system sygnałowy wykazuje analogię z systemem sygnalizacji eikozanowej u zwierząt [31]. Podobieństwo między sygnalizacją obronną u roślin i sygnalizacją obronną u zwierząt sugeruje, ze obie ścieżki sygnałowe mogły rozwijać się od wspólnego rodowego początku [31].

Meindl i wsp. [32] oraz Scheer i Ryan [33, 34] w pracach dotyczących wiązania systeminy z miejscami receptorowymi na membranach roślin stwierdzili, ze miejscem wiązącym systeminę jest białko o masie 160 kDa, nazwane przez nich receptorem-160 systeminy. Badania wykonali na kulturach komórkowych pochodzących z ziemniaka (*Lycopersicon peruvianum*) oraz radioizotopowo znakowanego analogu systeminy [^{125}J-Tyr^{2},Ala^{15}]-systeminy jako ligandu [33].

Systemina pod względem strukturalnym jest peptydem wysoce polarnym, zawierającym w swoim łańcuchu reszty aminokwasów zasadowych i kwaśnych. Poza tym uderza w nim obecność czterech reszt Pro (pozycje 6 i 7 oraz 12 i 13), ważnego elementu strukturalnego mającego wpływ na konformację peptydu. Systemina wyodrębniona z liści pomidorów zawiera w pozycji 3 resztę Gln, podczas gdy systemina z ziemniaków i pieprzu tureckiego zawiera w pozycji 3 resztę His. Systemina pochodząca z psianki czarnej, *S. nigrum* ma w pozycji 3 resztę Arg, a w położeniu 11 resztę Pro 4 (Tabela 1).

W badaniach dotyczących zależności między strukturą a funkcją biologiczną systeminy podjęto syntezę serii jej analogów. Modyfikacje systeminy polegały na syntezie:

1/ analogów pozbawionych N-terminalnej reszty Ala i C-terminalnej Asp,

2/ C-terminalnego fragmentu H-Met-Gln-Thr-Lys-OH,

3/ syntezie łańcucha peptydowego konsekwentnie podstawionego przez Ala.

W badaniach biologicznych systeminy i jej analogów oceniono ich właściwość jako aktywatorów biosyntezy inhibitora proteinazy [35]. Okazało się, że wymiana Pro-13 na Ala obniżała drastycznie aktywność biologiczną, a wprowadzenie Ala w miejsce Thr-17 prowadziło do zaniku aktywności biologicznej [35]. W dalszych badaniach stwierdzono, że analogi te miały działanie antagonistyczne. Analogi systeminy pozbawione reszt N- i C-terminalnej z łańcucha systeminy traciły zdolność indukowania biosyntezy inhibitorów. Słabą aktywność systeminy zachowywał C-terminalny fragment tetrapeptydowy systeminy. Uzyskane wyniki, zdaniem autorów, wskazują że Thr-17, Pro-13 oraz N- i C-końcowa reszta aminokwasowa mają istotne znaczenie dla oddziaływania systeminy z receptorem [35].

Uderzające jest symetryczne występowanie w systeminie dwóch par Pro w pozycjach 6 i 7 oraz 12 i 13. Ta ogólna symetria jest uzupełniona przez obecność trzech reszt Lys i Arg, a pomiędzy parami Pro występuje tetrapeptyd Ser-Lys-Arg-Asp. Interesujące jest również występowanie w pozycji 3 i 16 reszt Gln (Rysunek 1).

W 2001 roku z liści tytoniu wyizolowano oktadekapeptydy, które nazwano TobHypSysI i TobHypSysII (Tabela 2) [36]. Wykazują one podobieństwo funkcjonalne z wcześniej opisaną systeminą. Podobnie jak systemina te oktadekapeptydy uwalniane są przez komórki roślinne w odpowiedzi na uszkodzenie tkanki przez patogeny i wywołują syntezę inhibitorów proteinaz. W toku dalszych badań z liści pomidora wyizolowano i scharakteryzowano kolejne peptydy wykazujące aktywność systeminy [37]. Zbudowane są one odpowiednio z 18 (TomHypSysI), 20 (TomHypSysII) i 15 (TomHypSysIII) reszt aminokwasowych (Tabela 2). Każdy z tych peptydów zawiera sekwencję aminokwasową bogatą w reszty hydroksyproliny (Hyp) otoczone przez polarne reszty aminokwasowe. Zdaniem autorów [36, 37] związki te są glikopeptydami, chociaż jak dotąd nie ustalono miejsc przyłączenia reszt cukrowych do łańcucha peptydowego.

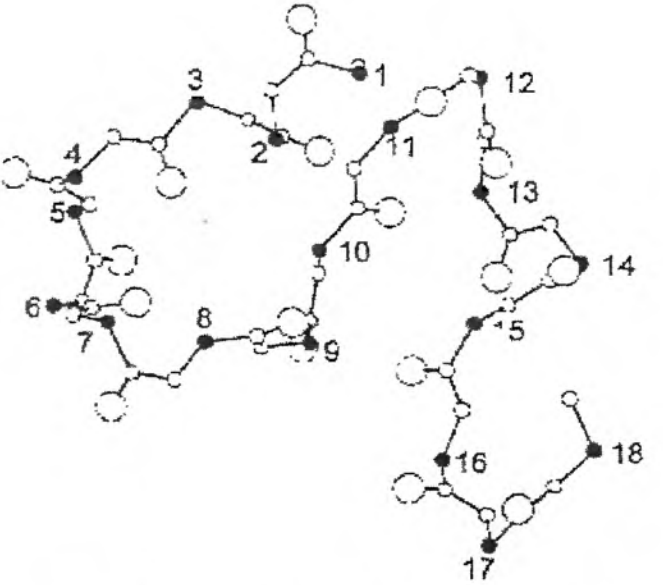
Tabela 2. Sekwencje aminokwasowe systemin: TobHypSysI, TobHypSysII, TomHypSysI, TomHypSysII oraz TomHypSysIII porównane z sekwencją systeminy wyizolowanej z pomidora

Peptyd	Sekwencja	Ilość grup cukrowych podstawionych do łańcucha peptydowego
TobHypSysI	RGANLPOOSOASSOOSKE	9
TobHypSysII	NRKPLSOOSOKPADQRP	6
TomHypSysI	RTOYKTOOOOTSSSOTHQ	8–17
TomHypSysII	GRHDYVASOOOOKPQDEQRQ	12–16
TomHypSysIII	GRHDSVLPOOSOKTD	10
systemina	AVQSKPPSKRDPPKMQTD	0

Niemniej jednak obecność elementu cukrowego jest niezbędna dla zachowania właściwości biologicznych omawianych glikopeptydów.

BADANIA KONFORMACYJNE SYSTEMINY

Budowa I rzędowa systeminy znajduje odbicie w strukturze II- i III-rzędowej oraz ma zapewne istotne znaczenie dla funkcji biologicznej systeminy. Przesłanki te były inspiracją do podjęcia studiów konformacyjnych [38, 39]. Badania takie prowadzono techniką CD [43] i NMR [39]. Na podstawie swoich badań techniką CD Toumadje i Johnson [38] postulują, że centralna część łańcucha systeminy ma strukturę analogiczną z poliproliną II. Ślósarek i wsp. stosując technikę dwuwymiarowego NMR [39] stwierdzili obecność w molekule systeminy izomeru *cis* wskazującego na to, że systemina przyjmuje konformację beta *Z*-podobną (ang. *Z-like β-sheet*) (Rysunek 3).



Rysunek 3. Konformacja łańcucha głównego systeminy [39]

Z przedstawionych danych wynika, że systemina została jak dotąd zidentyfikowana u roślin z rodziny psiankowatych. Jej aktywność biologiczna jest zależna od struktury, a modyfikacje sekwencji aminokwasowej prowadzą do związków o obniżonych właściwościach biologicznych.

FITOSULFOKINY (PSK)

ODKRYCIE I WŁAŚCIWOŚCI BIOLOGICZNE FITOSULFOKIN

Fitosulfokiny, kolejne sygnałowe peptydy roślin o sekwencji H-Tyr(SO_3H)-Ile-Tyr(SO_3H)-Thr-Gln-OH (PSK-α) i H-Tyr(SO_3H)-Ile-Tyr(SO_3H)-Thr-OH (PSK-β) zostały wyizolowane w 1996 roku przez Matsubayashi i wsp. z tkanki miękiszowej liści szparagów – *Asparagus officinalis* [10], ryżu – *Oryza sativa* [11], cynii – *Zinnia elegans* [12] oraz marchwi – *Daucus carota* [13]. Peptydy te mają właściwości mitogenne i są odpowiedzialne za ważny proces proliferacji komórek u roślin, mający wpływ na namnażanie się oraz wzrost liczby komórek [10] oraz na ich odróżnicowywanie się jak np. przekształcenie komórek miękiszowych liści w elementy naczyniowe [12].

Obydwa peptydy PSK-α i PSK-β stymulują namnażanie się komórek roślinnych już przy stężeniu 10^{-9} M, przy czym PSK-β działa słabiej, zachowuje 8% aktywności PSK-α [40].

Po raz pierwszy obecność fitosulfokin stwierdzono w pożywce kondycjonowanej, stosowanej w hodowli kultury komórek miękiszowych szparagów *A. officinalis* [10]. Aktywność mitotyczna pojedynczych komórek w kulturze jest silnie związana z tak zwaną inicjującą gęstością komórek [10] (jest to minimalna gęstość komórek niezbędna do zainicjowania procesów podziału i różnicowania się komórek w kulturze). W kulturze o niskiej gęstości populacji można ją zainicjować wprowadzając do kultury pożywkę kondycjonowaną. Fitosulfokiny, obok aktywowania procesu proliferacji i różnicowania się komórek, pełnią w roślinach inne funkcje. Mają wpływ na syntezę chlorofilu w liścieniach kukurydzy *Zea mays* [41], zwiększają jego zawartość w nasionach rzodkiewnika *Arabidopsis*, hodowanych w warunkach wysokich temperatur [42]. Ponadto promują tworzenie się korzeni przybyszowych u kukurydzy [43], formowanie się pączków bocznych u *Antirrhinum majus* [44], wzmacniają częstotliwość embriogenezy somatycznej w kulturze komórek marchwi [13, 45], a także wpływają na aktywację syntezy alkaloidów u *Atropa belladonna* [46]. Różnorodność gatunkowa roślin, u których stwierdzono występowanie fitosulfokin, jak i różnorodność funkcji jakie pełnią te związki sugeruje, że są to uniwersalne hormony peptydowe roślin.

PREKURSOR FITOSULFOKIN

Po odkryciu fitosulfokin podjęto próbę poszukiwania ich prekursora [47]. Okazało się, że prekursorem PSK-α jest preprofitosulfokina (PP–PSK) składająca się z 89 reszt aminokwasowych (Rysunek 4), a omawiany pentapeptyd jest z niej uwalniany na drodze proteolizy. Preprofitosulfokina została wyodrębniona z komórek ryżu linii Oc, które odznaczają się wysoką zawartością PSK-α w porównaniu z innymi gatunkami roślin [47].

Rys. (4A)

Rys. (4B) FDSAKWEEFHTDYIYTQDVKNP

Rysunek 4A i 4B. Budowa białkowego prekursora PSK-α [47]
(Rys. A) Przedstawia strukturę prekursora PSK-α zawierający przy N-końcu fragment sygnałowy składający się z 22 reszt aminokwasowych, prohormon i zaznaczony fragment PSK-α
(Rys. B) Sekwencja prohormonu, fragment [68–89] – PP–PSK z zaznaczoną sekwencją PSK-α

W strukturze PP–PSK dają się wyróżnić dwa ważne dla właściwości biologicznych fragmenty łańcucha peptydowego. Pierwszy z nich to N-końcowy fragment sygnałowy składający się z 22 reszt aminokwasowych, zawierający 10 reszt Leu, drugi natomiast to fragment 80–84 – fitosulfokina-α, granicząca od N- i C-końca z resztami Asn [47]. W łańcuchu peptydowym PP–PSK występują 22 reszty aminokwasów o charakterze hydrofobowym. Natomiast wśród reszt hydrofilowych obserwuje się częste występowanie aminokwasów kwaśnych (Asp i Glu) oraz ich pochodnych (Asn i Gln).

Mechanizm uwalniania PSK-α z jej prekursora nie jest jeszcze do końca poznany i niewiele wiadomo o samych miejscach procesowych, w których dochodzi do odszczepienia hormonu z udziałem enzymów endoproteolitycznych.

Jest interesujące, że PP–PSK nie wykazuje homologii z żadnym znalezionym dotychczas białkiem roślinnym. Istnieją natomiast nieznaczne analogie z preprohormonami zwierzęcymi, jak np. epidermalnym czynnikiem wzrostu (EGF) szczura [48]. Podobieństwa te są takie, że podobnie jak preprohormony zwierzęce, PP–PSK posiada 22-aminokwasowy N-końcowy peptyd sygnałowy, po usunięciu którego powstaje 67-aminokwasowy prohormon [47]. Porównując prohormony zwierzęce i prohormon PSK dokonano obserwacji, że sekwencja PSK-α, w odróżnieniu od prohormonów pochodzenia zwierzęcego, jest zapisana tylko raz w C-końcowym odcinku prekursora [47].

RECEPTOR FITOSULFOKIN

Dalsze studia dotyczące fitosulfokin miały na celu poszukiwanie miejsca receptorowego u roślin. Do badań tych użyto znakowanego jodem J^{125} analogu fitosulfokiny-α zawierającego kwas 4-azydosalicylowy [N^{ϵ}-(4-azydosalicylo)Lys5]PSK-α)]. Wyniki badań wskazują na istnienie w błonie plazmatycznej ryżu dwóch białek receptorowych o masie odpowiednio 120 i 160 kDa [49].

Cennych informacji na temat receptora PSK dostarczyły dalsze badania prowadzone przez Matsubayashi [50], w których wykorzystano [3H]PSK-α. Dzięki nim wykazano wpływ pH oraz wybranych jonów metali na specyficzność wiązania do receptora. Wyniki tych badań [50] sugerują, że wiązanie ligand–receptor jest kontrolowane przez jonowe interakcje z łańcuchami bocznymi zasadowych reszt aminokwasowych zlokalizowanych blisko miejsca aktywnego receptora, co może mieć znaczący wpływ na konformację cząsteczki receptora.

ZALEŻNOŚĆ MIĘDZY STRUKTURĄ A FUNKCJĄ FIZJOLOGICZNĄ PSK

Struktura fitosulfokiny-α odznacza się obecnością dwu reszt Tyr(SO_3H). Aminokwas ten, którego grupa 4'-OH przy pierścieniu aromatycznym jest zestryfikowana kwasem siarkowym, występuje w pozycji 1 i 3 łańcucha peptydowego. Dla zbadania zależności między strukturą a funkcją biologiczną PSK-α przeprowadzono syntezę serii jej analogów peptydowych (Tabela 3).

Tabela 3. Aktywność biologiczna analogów PSK-α. Komórki mezofilu *Asparagus officinalis* inkubowano w obecności odpowiedniego analogu PSK-α. Aktywność mitogeniczną oceniano w 6-ścio dniowej kulturze, zaś wartość ED_{50} opisano jako stężenie analogu wymagane do wywołania podziałów u 50% komórek [51]

Peptyd	ED_{50} (nM)	Relatywna aktywność
H-Tyr(SO_3H)-Ile-Tyr(SO_3H)-Thr-Gln-OH	4	100
H-Tyr(SO_3H)-Ile-Tyr(SO_3H)-Thr-OH	50	8
H-Tyr(SO_3H)-Ile-Tyr(SO_3H)-OH	20	20
H-Tyr(SO_3H)-Ile-OH	>1000	<0,1
H-Ile-Tyr(SO_3H)-Thr-Gln-OH	>1000	<0,1
H-Tyr(SO_3H)-Ile-Tyr(SO_3H)-Thr-Gln-Gly-Gly-Gly-OH	100	4
H-Gly-Gly-Gly-Tyr(SO_3H)-Ile-Tyr(SO_3H)-Thr-Gln-OH	500	0,8
H-Tyr(SO_3H)-Ile-Tyr(SO_3H)-Thr-Gln-Gly-Gly-Gly-Cys-OH	40	10
H-Tyr(SO_3H)-Ile-Tyr(OH)-Thr-Gln-OH	100	4
H-Tyr(OH)-Ile-Tyr(SO_3H)-Thr-Gln-OH	700	0,6
H-Tyr(OH)-Ile-Tyr(OH)-Thr-Gln-OH	>1000	<0,1
H-Tyr(SO_3H)-Val-Tyr(SO_3H)-Thr-Gln-OH	100	4
H-Tyr(SO_3H)-Ile-Tyr(SO_3H)-Ser-Gln-OH	200	2

Efekty biologiczne tych peptydów oceniono stosując między innymi testy, w których opisano aktywność mitotyczną PSK-α i jej analogów w odniesieniu do komórek *A. officinalis* [51], oraz wiązanie do białka membranowego marchwi z użyciem radioizotopowo znakowanego peptydu [3H]PSK-α [52].

Tabela 4. Aktywność biologiczna analogów fitosulfokiny-α modyfikowanych w pozycji 1 łańcucha peptydowego [60, 61]

Peptyd	Aktywność biologiczna (%)
H-D-Tyr(SO_3H)-Ile-Tyr(SO_3H)-Thr-Gln-OH (I)	<0,1
H-Phe(4-SO_3H)-Ile-Tyr(SO_3H)-Thr-Gln-OH (II)	<0,1
H-D-Phe(4-SO_3H)-Ile-Tyr(SO_3H)-Thr-Gln-OH (III)	<0,1
H-Phe(4-$NHSO_2CH_3$)-Ile-Tyr(SO_3H)-Thr-Gln-OH (IV)	<0,1
H-D-Phe(4-$NHSO_2CH_3$)-Ile-Tyr(SO_3H)-Thr-Gln-OH (V)	3
H-Phe(4-NO_2)-Ile-Tyr(SO_3H)-Thr-Gln-OH (VI)	10
H-D-Phe(4-NO_2)-Ile-Tyr(SO_3H)-Thr-Gln-OH (VII)	<0,1
H-Phe(4-Cl)-Ile-Tyr(SO_3H)-Thr-Gln-OH (VIII)	30
H-Phe(4-Br)-Ile-Tyr(SO_3H)-Thr-Gln-OH (XIX)	3
H-Phe(4-F)-Ile-Tyr(SO_3H)-Thr-Gln-OH (X)	<0,1
H-Phe(4-I)-Ile-Tyr(SO_3H)-Thr-Gln-OH (XI)	30
H-Tyr(PO_3H_2)-Ile-Tyr(SO_3H)-Thr-Gln-OH (XII)	<0,1
H-D-Tyr(PO_3H_2)-Ile-Tyr(SO_3H)-Thr-Gln-OH (XIII)	<0,1
H-Phg(4-SO_3H)-Ile-Tyr(SO_3H)-Thr-Gln-OH (XIV)	<0,1
H-D-Phg(4-SO_3H)-Ile-Tyr(SO_3H)-Thr-Gln-OH (XV)	<0,1
H-Phg(4-$NHSO_2CH_3$)-Ile-Tyr(SO_3H)-Thr-Gln-OH (XVI)	<0,1
H-Phe(4-NO_2)-Ile-Tyr(SO_3H)-Thr-Gln-OH (XVII)	10
H-D-Phg(4-NO_2)-Ile-Tyr(SO_3H)-Thr-Gln-OH (XVIII)	1
H-Phg(4-OSO_3H)-Ile-Tyr(SO_3H)-Thr-Gln-OH (XIX)	1
H-Phg(4-OPO_3H_2)-Ile-Tyr(SO_3H)-Thr-Gln-OH (XX)	<0,1
H-Hpa(4-NO_2)-Ile-Tyr(SO_3H)-Thr-Gln-OH (XXI)	<0,1

Modyfikacje struktury w badaniach prowadzonych przez Matsubayashi i wsp. [51] polegały na:

– pozbawieniu PSK-α reszt siarczanowych i wprowadzeniu nie estryfikowanych reszt Tyr,

– jednoczesnym usunięciu reszt C- i N-końcowych łańcucha PSK,
– usunięciu tylko N-końcowej reszty w sekwencji PSK,
– wymianie Ile^2 na resztę Val, lub wymianie Thr^4 na Ser,
– przedłużeniu łańcucha peptydowego przez fragment tri-Gly od N- lub C-końca.

Po ocenie ich aktywności biologicznej stwierdzono, że wszystkie zmiany strukturalne w pierwszej serii analogów prowadziły do drastycznego obniżenia aktywności biologicznej w porównaniu z natywnym peptydem z wyjątkiem H-Tyr(SO_3H)-Ile-Tyr(SO_3H)-OH, zachowującego 20% aktywności (Tabela 2). Z uwagi na niewystarczającą ilość danych podjęto dalsze studia nad zależnością między strukturą a funkcją biologiczną fitosulfokiny [53, 54]. W tym celu zmodyfikowaną jej strukturę przez:
– zamianę reszt Tyr(SO_3H) w pozycji 1 lub 3 oraz jednoczesną wymianę obydwu reszt Tyr(SO_3H) w pozycji 1 i 3 na inne aminokwasy białkowe lub niebiałkowe,
– wprowadzenie w miejsce L-aminokwasów w pozycji 1 lub 3 oraz 1 i 3 równocześnie na izomery D,
– zamianę Thr^4 na Ser (Tabela 4, Tabela 5, Tabela 6).

Tabela 5. Aktywność biologiczna analogów fitosulfokiny-α modyfikowanych w pozycji 3 lub 4 łańcucha peptydowego [60, 61]

Peptyd	Aktywność biologiczna (%)
H-Tyr(SO_3H)-Ile-Phe(4-NO_2)-Thr-Gln-OH (XXII)	3
H-Tyr(SO_3H)-Ile-Phe(4-Cl)-Thr-Gln-OH (XXIII)	30
H-Tyr(SO_3H)-Ile-Phe(4-F)-Thr-Gln-OH (XXIV)	10
H-Tyr(SO_3H)-Ile-Tyr(PO_3H_2)-Thr-Gln-OH (XXV)	10
H-Tyr(SO_3H)-Ile-D-Tyr(PO_3H_2)-Thr-Gln-OH (XXVI)	<0.1
H-Tyr(SO_3H)-Ile-Phg(4-NO_2)-Thr-Gln-OH (XXVII)	<0.1
H-Tyr(SO_3H)-Ile-Hpa(4-NO_2)-Thr-Gln-OH (XXVIII)	<0.1
H-Tyr(4-SO_3H)-Ile-Tyr(4-SO_3H)-Val-Gln-OH (XIX)	<0.1
H-Tyr(SO_3H)-Ile-Tyr(SO_3H)-Ile-Gln-OH (XXX)	<0.1

Wśród tej serii analogów największe powinowactwo do receptora (30%) wykazywały [Phe(4-Cl)^1]-, [Phe(4-I)^1]- i [Phe(4-Cl)^3]-PSK-α, podczas gdy [Phe(4-NO_2)^1]-, [Phg(4-NO_2)^1]- [Phe(4-F)^3]- oraz [Tyr(PO_3H_2)^3]-PSK-α zachowywały 10% aktywności peptydu natywnego (Tabela 4, Tabela 5). Niewielkie powinowactwo do receptora (3%) zaobserwowano dla analogu PSK-α modyfikowanego w pozycji 1 łańcucha peptydowego przez Phe(4-Br) oraz D-Phe(4-$NHSO_2CH_3$). Również [D-Phg(4-NO_2)]- i [Phg(4-OSO_3H)]-PSK-α zachowywały niską aktywność receptorową (1%). Pozostałe analogi były praktycznie nieaktywne.

Tabela 6. Aktywność biologiczna analogów fitosulfokiny-α modyfikowanych w pozycji 1 i 3 łańcucha peptydowego [60, 61]

Peptyd	Aktywność biologiczna (%)
H-Phe(4-SO_3H)-Ile-Phe(4-SO_3H)-Thr-Gln-OH (XXXI)	<0,1
H-Phe(4-NO_2)-Ile-Phe(4-NO_2)-Thr-Gln-OH (XXXII)	<0,1
H-Phe(4-Cl)-Ile-Phe(4-Cl)-Thr-Gln-OH(XXXIII)	<0,1
H-Phe(4-F)-Ile-Phe(4-F)-Thr-Gln-OH (XXXIV)	<0,1
H-Tyr(PO_3H_2)-Ile-Tyr(PO_3H_2)-Thr-Gln-OH (XXXV)	<0,1
H-D-Tyr(PO_3H_2)-Ile-D-Tyr(PO_3H_2)-Thr-Gln-OH (XXXVI)	<0,1
H-Phe(4-Cl)-Ile-Tyr(3-SO_3H)-Thr-Gln-OH (XXXVII)	<0,1
H-Phe(4-Br)-Ile-Tyr(3-SO_3H)-Thr-Gln-OH (XXXVIII)	<0,1
H-Phe(4-F)-Ile-Tyr(3-SO_3H)-Thr-Gln-OH (XXXIX)	<0,1
H-Phe(4-I)-Ile-Tyr(3-SO_3H)-Thr-Gln-OH (XL)	<0,1
H-Tyr(3-SO_3H)-Ile-Phe(4-Cl)-Thr-Gln-OH (XLI)	<0,1
H-Tyr(3-SO_3H)-Ile-Phe(4-F)-Thr-Gln-OH (XLII)	<0,1
H-Phg(4-NO_2)-Ile-Phg(4-NO_2)-Thr-Gln-OH (XLIII)	<0,1
H-Hpa(4-NO_2)-Ile-Hpa(4-NO_2)-Thr-Gln-OH (XLIV)	<0,1

W oparciu o te dane trudno jest dyskutować rolę poszczególnych reszt aminokwasowych dla aktywności biologicznej u roślin. Niemniej jednak należy stwierdzić, że obecność estrów siarczanowych w pozycji 4' przy pierścieniu reszt Tyr w pozycji 1 i 3 łańcucha peptydowego PSK-α jest istotna dla zachowania funkcji biologicznej. Z badań tych wynika również, że konfiguracja reszt Tyr w pozycji 1 i 3 ma zasadnicze znaczenie dla zachowania aktywności PSK-α, gdyż zamiana L-Tyr na D-Tyr prowadziła do utraty aktywności biologicznej.

INNE PEPTYDY SYGNAŁOWE ROŚLIN

ENOD40

W korzeniach roślin strączkowych występują brodawki (nodule), organy w których azot atmosferyczny jest wiązany i redukowany do amoniaku. Brodawki te są aktywowane przez sygnałową cząsteczkę lipochityno-oligosacharydową (ang. *nod factor*) syntezowaną przez bacterie *Rhizobia* [55]. Proces ten jest inicjowany przez

lokalne komórki korzenia. Jak wykazały badania prowadzone na kilku gatunkach roślin strączkowych ważną rolę w odpowiedzi na nod factor odgrywają geny nodulo-specyficzne. Jeden z nich to gen ENOD40 [14–17], który jest wykrywany w soi w ciągu jednego dnia od zaszczepienia bakteriami z rodzaju *Rhizobia*. Indukuje on namnażanie się i podział komórek w wewnętrznej części kory korzenia, we wczesnym etapie organogenezy noduli, stąd nazwa (ang. *Early NOD*) [55, 56].

Struktura tego genu została szczegółowo opisana w licznych pracach, do których odsyłamy czytelnika [14–17].

Tabela 7. Sekwencje aminokwasowe ENOD40 u róznych gatunków roślin [30]

Rodzaj rośliny	Sekwencja ENOD40
Medicago sativa	MKLLCWQKSIHGS
Medicago trunculata	MKLLCWEKSIHGS
Pisum sativum	MKFLCWQKSIHGS
Vicia sativa	MKLLCWQKSIHGS
Glicine max-1	ME - LCWQTSIHGS
Glicine max-2	ME - LCWLTTIHGS
Lupinus luteus	ME - LSWQKSIHGS
Nicotiana tobacum	MQ - - -WDEAIHGS

Na podstawie analizy sekwencyjnej genów pochodzących z kilku gatunków roślin strączkowych wydedukowano sekwencje peptydów zaliczanych do grupy ENOD40 (Tabela 7). W łańcuchach tych peptydów obserwuje się stałe występowanie reszty Trp i powtarzalnego C-końcowego fragmentu peptydowego IHGS (Tabela 7) [30].

Obecność tych peptydów u roślin odgrywa, jak się zdaje, istotną rolę w wiązaniu azotu w nodulach roślin. Jak należy przypuszczać ekspresja genów ENOD40 może być elementem inicjującym nodule do działania hormonalnego w komórkach korzeni roślin strączkowych [56]. Na podstawie dotychczas przeprowadzonych niezbyt licznych badań trudno jest ustalić ostateczną rolę i mechanizm działania tych peptydów.

CLAVATA3 (CLV3)

CLAVATA3 (CLV3) jest polipeptydem sygnałowym znalezionym u rzodkiewnika – *Arabidopsis thaliana* [18]. Struktura tego peptydu, podobnie jak ENOD40, została wydedukowana na podstawie analizy sekwencyjnej genu CLV3 [18]. Składa się on

z 96 reszt aminokwasowych, a oktadekanopeptydowa sekwencja sygnałowa jest zlokalizowana przy N-końcu i jest fragmentem hydrofobowym, bogatym w reszty Leu (ang. *Leu-rich repeat*) (Rysunek 5). Peptyd ten jest odpowiedzialny za proces namnażania się komórek w wierzchołku wzrostowym roślin i prawdopodobnie przeciwdziała nadmiernej proliferacji komórek [57]. Wierzchołek wzrostu (część tkanki twórczej – meristemum) kontroluje stały przyrost długości pędów i korzeni, różnicowanie komórek oraz wbudowywanie ich w liście i pąki kwiatowe. Jak wykazały badania, w stożku wzrostowym łodygi rzodkiewnika pospolitego (*A. thaliana*) za utrzymanie stanu równowagi pomiędzy procesem proliferacji i różnicowania się komórek odpowiedzialne są trzy geny: CLV1, CLV2 i CLV3. Rola poszczególnych genów była przedmiotem szerszych badań, obejmującym również badania na roślinach transgenicznych [57–59]. Dla klarowności wywodu zrezygnujemy z opisu roli poszczególnych genomów i mechanizmu ich działania odsyłając czytelnika do literatury [60].

MDSKSFVLLLLLFCFLFLHDASDLTQAHAHVQGLSNRKMMMMKMESEWVGANGEAEKA
KTKGLGLHEELRTVPSGPDPLHHHVNPPRQPRNNFQLP

Rysunek 5. Sekwencja aminokwasowa CLV3 z zaznaczoną sekwencją sygnałową zlokalizowaną w N-końcowym odcinku łańcucha peptydowego [18]

Jak do tej pory CLAVATA3 jest przedmiotem badań fizjologów roślin i nie doczekała się jeszcze badań dotyczących zależności między strukturą a funkcją biologiczną peptydu.

S-LOCUS

W locus S znajdują się trzy geny: *SLG*, *SRK*, i *SCR* [61]. Kodują one białka, które mają istotny wpływ na mechanizm samoniezgodności (ang. *Self Incompatibility*, SI). Ten złożony proces zapobiega samozapyleniu roślin przez własny pyłek kwiatowy. W procesie zapylenia pyłek ogarnia żeńskie znamię słupka kwiatowego i styka się z brodawką znamienia. Jeżeli pyłek zostaje rozpoznany przez polimorficzne białkowe receptory (S-locus) jako własny, to proces zapylenia zostaje zatrzymany. Proces ten zapobiega samozapyleniu, a w dalszej kolejności przeciwdziała degeneracji roślin.

Samoniezgodność (samobezpłodność) jest najbardziej skutecznym mechanizmem zabezpieczającym przed samozapyleniem polegającym na tym, że niezgodne ziarna pyłkowe wcale nie kiełkują, bądź w przypadku uruchomienia kiełkowania, krótkie łagiewki nie penetrują znamienia. Samoniezgodność u *Brassicaceae* jest kontrolowana przez pojedynczy wieloalleliczny locus S. Gdy na znamieniu ląduje ziarno pyłku, które niesie ze sobą allele identyczne z allelami znamienia słupka, pyłek ten zostaje rozpoznany jako „własny" i odrzucony. Zaś „obcy" pyłek może rozwijać się normal-

nie, co w konsekwencji prowadzi do zapłodnienia komórki [62]. Zjawisko to zostało najlepiej, jak dotąd, zbadane u roślin z rodziny *Brasicaeceae*.

Gen *SRK* koduje białko funkcjonujące jako żeński determinant samoniezgodności [62]. Rola białka *SLG* nie została jeszcze zbadana. Na podstawie zgromadzonych dowodów wysunięto hipotezę, że białka *SLG* mogą: (1) być koniecznym składnikiem kompleksu receptorowego [63], (2) uczestniczyć w posttranskrypcyjnym dojrzewaniu SRK [64], (3) brać udział w adhezji pyłku do znamienia [65], (4) funkcjonować jako przenośnik liganda pyłkowego [66].

SP11-9

*MK-SAIYALLCFIFIVSSHVQEV-E--A*NLRKT-CVHRLNSGGSCGKSGQHD

CEAFYTNKTNQKAFYCNCT-SPFRTRYCDCAIKCKVR

SP11-8

*MK-SAVYALLCFIFIVSGHIQEL-E--A*NLMKR-CTRGFRKLGKCTTLEEEK

CKTLYP-R-----GQCTCSDSKMNTHSCDC-KSC

SP11-12

*MK-SAIYALLCFIFIVSSHVQELTE*VG*A*D--KQQCKKNFP--GHCETS--ERC

ENTYK-RLNKKVFDCHCQ--PFGRRLCTC-K-C

SP11-52

*MK-SVLYALLCFIFIVSSHVQDV-E--A*NLMNR-CTRELPFPGKCGSSEDGG

CIKLYS SEKKLHPSRCEC-EPRYKARFCRC-KIC

PCP-A1

*MKNTVKLSLIGFVMLTVLLLGETVI--A*QKRKP-CYSQEP-DKTCEVN---
RCKANCV KKHKKILAFTSCIKENNGNMYCRCQYPCPP

Rysunek 6. Sekwencja aminokwasowa czterech allelicznych typów SP11 i PCP-A1. Czcionką pochyłą zaznaczono sekwencje sygnałowe, zaś czcionką pogrubioną reszty cysteinowe obecne w łańcuchu peptydowym [70]

Najlepiej rozpoznany jest gen *SCR* (ang. *S-locus cysteine – rich protein*), znany również pod nazwą *SP11* [67, 68], który został wyizolowany w 1999 roku z roślin *Brassica compestis* (rapa) [68]. *SCR* koduje białko pełniące rolę męskiego determinanta samoniezgodności [68]. Jest to polipetyd sygnałowy zawierający od 74 do 83 reszt aminokwasowych i charakteryzuje się obecnością 8 reszt Cys (tzw. *Cys – rich*

peptide). Sekwencja tego polipeptydu została wydedukowana na podstawie sekwencji genu S_8 kodującego SCR/SP11 [67]. SCR jest nowym członkiem rodziny białek PCP (ang. *Pollen Coat Protein*) [69] (Rysunek 6).

Jak dotąd nie prowadzono jeszcze studiów zależności między strukturą a funkcją biologiczną peptydu Locus S. Jest on przedmiotem intensywnych badań biologicznych.

PODSUMOWANIE

Odkrycie hormonów peptydowych roślin daje początek nowym kierunkom badań w zakresie fitochemii i fizjologii roślin. Bodźcem do podjęcia tych badań był nie tylko aspekt poznawczy, ale i praktyczny szczególnie ważny w uprawie roślin spożywczych. Przedstawione tu rezultaty badań dotyczących peptydów sygnałowych roślin są głównie wynikami badań wykonanych przez biologów. Materiał zawarty w niniejszym artykule jest niejednolity z uwagi na to, że niektóre peptydy są opisane bardziej szczegółowo pod względem chemicznym, inne mniej. Prace te możemy zaliczyć do badań pionierskich, mających na celu wyjaśnienie niepoznanych do końca mechanizmów fizjologicznych u roślin na poziomie molekularnym, kontrolowanych przez endogenne substancje peptydowe roślin. Publikacja ta ma na celu uporządkowanie danych i zainteresowanie szerszej grupy uczonych, którzy podjęliby trud wyjaśnienia roli poszczególnych prezentowanych tu czynników dla funkcji fizjologicznej roślin. Nie mniej jednak, na tym etapie przedstawione badania mają wartość poznawczą i pozwalają na rozpoznanie zagadnień związanych z funkcjonowaniem roślin.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

[1] F.W. Went, Rec. Trav. Bot. Neerl., 1928. **25**, 1.
[2] N. Cholodny, Planta, 1928, **6**, 118.
[3] E. Kurosawa, Nat. Hist. Soc. Formosa, 1926, **16**, 213.
[4] C.O. Miller, F. Skoog, H.M. von Saltza, F.S. Okumura, Strong F.M., J. Am. Chem. Soc., 1955, **77**, 2662.
[5] F.T. Addicott, J.L. Lyon, K. Ohkuma, W.E. Thiessen, H.R. Carns, O.E. Smith, J.W. Cornforth, B.V. Milborrow, G. Ryback, P.F. Wareing, Science, 1968, **159**, 1943.
[6] D.C. Aldridge, S. Galt, D. Giles, W.B. Turner, J. Chem. Soc. Chem. Commun. C 1971, 1623.
[7] W. Crocker, A.E. Hitchcock, P.W. Zimmerman, Contrib. Boyce Thompson Inst. 1935, **7**, 231.
[8] M.D. Grove, G.F. Spencer, W.K. Rohwedder, N. Mandawa, J.F. Worley, J.D. Warthen, G.L. Steffens, J.L. Flippen-Anderson, J.C. Cook, Nature, 1979, **281**, 216.
[9] G. Pearce, D. Strydom, S. Johnson, C.A. Ryan, Science, 1991, **253**, 895.
[10] Y. Matsubayashi, Y. Sakagami, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1996, **93**, 7623.
[11] Y. Matsubayashi, L. Takagi, Y. Sakagami, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1997, **94**, 13357.
[12] Y. Matsubayashi, L. Takagi, N. Omura, A. Morita, Y. Sakagami, Plant Physiol., 1999, **120**, 1043.

[13] T Kobayashi. C.H. Eun, H. Hanai. Y. Matsubayashi. Y Sakagami, H. Kamada. J Exp Bot., 1999, **50**, 1123.
[14] W. Yang, P. Katinakis, P. Hendriks, A. Smolders. F de Vries, J. Spee, A van Kammen, T Bisseling, H. Franssen, Plant J., 1993, **3**, 573.
[15] P. Mylona, K. Pawlowski, T. Bissleing. Plant Cell. **7**, 1995, 869.
[16] K. van de Sande, K. Pawlowski, I. Czaja, U. Wieneke. J Schell, J. Schmidt, R Walden, M. Matvienko, J. Wellink, A. van Kammen, H. Frannsen. T Bisseling. Science. 1996, **273**, 370
[17] H Kouchi, K. Takane, R.B. So, J.K. Ladha, P.M Reddy. Plant J., 1999, **18**, 121
[18] J C. Fletcher, U. Brand, M P. Running, R. Simon, E.M. Meyerowitz, Science, 1999, **283**, 1911
[19] J C. Stein, B. Howlett, D.C. Boyes, M.E Nasrallah, J.B. Nasrallah. Proc Natl Acad. Sci USA, 1991, **88**, 8816.
[20] J.C. Stein, R. Dixit, M.E. Nasrallah, J.B. Nasrallah, Plant Cell, 1996, **8**, 429.
[21] C R. Schopfer, J.B. Nasrallah, M E. Nasrallah, Science. 1999, **286**, 1697.
[22] G. Suzuki, N. Kai N., T. Hirose, T. Nishio, S. Takayama, A. Isogai, M. Watanabe. K. Hinata. Genetics, 1999, **153**, 391.
[23] B McGurl, C.A. Ryan. Plant Mol. Biol., 1992, **20**, 405.
[24] C P. Constabel, L. Yip, C.A. Ryan, Plant Mol. Biol., 1998, **36**, 55.
[25] C.A. Ryan, G. Pearce, S. Johnson, B. McGurl, M. Orozco-Cardenas. E.E. Farmer, Mech. Plant Def Resp., 1993, 196.
[26] M. Radłowski, S Bartkowiak, K. Gulewicz, M. Giel-Pietraszuk, P. Mucha, P. Rekowski, G Kupryszewski, J Braciszewski, J. Plant Physiol., 1997, **150**, 220.
[27] J.B. Hollick, M.P. Gordon, Plant Mol. Biol., 1993, **22**, 561.
[28] B. McGurl, G. Pearce, M. Orozco-Cardenas, C.A. Ryan, Science, 1992, **255**, 1570.
[29] C.A Ryan, Biochem. Biophys. Acta, 2000, **1477**, 112.
[30] A. Schaller Plant Mol. Biol., 1999, **40**, 763.
[31] D. Bergey, G. Howe, C.A. Ryan, Proc. Natl. Acad Sci. USA, 1996, **93**, 12053.
[32] T. Meindl, T. Boller, G. Felix, Plant Cell. 1998, **10**, 1561.
[33] J.M. Scheer, C.A. Ryan, Plant Cell, 1999, **11**, 1525.
[34] J.M. Scheer, C.A. Ryan, Proc. Natl. Acad Sci. USA, 2002, **99**, 9585.
[35] G. Pearce, S. Johnson, C.A. Ryan, J. Biol. Chem., 1993, **268**, 212.
[36] G. Pearce, D.S. Moura, J. Stratman, C.A. Ryan, Nature, 2001, **411**, 817.
[37] G. Pearce, C.A. Ryan, J. Biol. Chem., 2003, **278**, 30044.
[38] A. Toumadje, W.C. Jr. Johnson, J. Am. Chem. Soc., 1995, **117**, 7023.
[39] G. Ślósarek, P. Mucha. P. Rekowski, G. Kupryszewski, M.G. Pietraszuk, M. Szymański, J. Barciszewski, J. Struct. Biol., 1995, **115**, 30.
[40] Y. Matsubayashi, H. Hanai, O. Hara, Y. Sakagami, Bioch. Bioph. Res. Com., 1996, **225**, 209.
[41] S. Yamakawa, Y. Matsubayashi, Y. Sakagami. H. Kamada, S. Satoh, Biosci. Biotechnol Biochem., 1998, **62**, 2441.
[42] S. Yamakawa, Y. Matsubayashi, Y. Sakagami. H. Kamada. S. Satoh, Biosci. Biotechnol Biochem., 1999, **63**, 2240.
[43] S. Yamakawa, C. Sakurai, Y. Matsubayashi. Y. Sakagami. H. Kamada, S. Satoh, J. Plant Res., 1998, **111**, 453.
[44] G. Yang, S. Shen, T. Kobayashi, Y. Matsubayashi, Y. Sakagami, H. Kamada, Plant Biotechnol., 1999, **16**, 231.
[45] H. Hanai, T. Matsuno, M. Yamamoto, Y. Matsubayashi, H. Kamada, Y. Sakagami, Plant Cell Physiol., 2000, **41**, 27.
[46] K. Sasaki, T. Ishise, K. Shimomura, T. Kobayashi, Y. Matsubayashi, Y. Sakagami, H. Umetsu, H. Kamada. Plant Growth Regulation, 2001, **00**, 1.

[47] G. Yang, Y. Matsubayashi, K. Nakamura, Y. Sakagami, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1999, **96**, 13560.
[48] R.J. Simpson, J.A. Smith, R.L. Moritz, M.J. O'Hare, P.S. Rudland, J.R. Morrison, C.J. Lloyd, B. Grego, A.W. Burgess, E.C. Nice, Eur. J. Biochem., 1985, **153**, 629.
[49] Y. Matsubayashi, Y. Sakagami, J. Biol. Chem., 2000, **275**, 15520.
[50] Y. Matsubayashi, Y. Sakagami, Eur. J. Biochem., 1999, **262**, 666.
[51] Y. Matsubayashi, H. Hanai, O. Hara, Y. Sakagami, Bioch. Bioph. Res. Com., 1996, **225**, 209.
[52] Y. Matsubayashi, M. Ogawa, A. Morita, Y. Sakagami, Science, 2002, **296**, 1470.
[53] A. Bahyrycz, Y. Matsubayashi, M. Ogawa, Y. Sakagami, D. Konopińska, J. Peptide Sci., 2004, **10**, 462.
[54] A. Bahyrycz, Y. Matsubayashi, M. Ogawa, Y. Sakagami, D. Konopińska, J. Peptide Sci. J. Peptide Sci., 2005, **11**, 589.
[55] J. Kopcewicz, S. Lewak, *Fizjologia roślin*, PWN, Warszawa, 2002.
[56] C. Charon, C. Johansson, E. Kondorosi, A. Kondorosi, M. Crespi, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1997, **94**, 8901.
[57] U. Brand, J.C. Fletcher, M. Hobe, E.M. Meyerowitz, R. Simon, Science, 2000, **289**, 617.
[58] S.E. Clark, M.P. Running, E.M. Meyerowitz, Development, 1993, **119**, 397.
[59] S.E. Clark, M.P. Running, E.M. Meyerowitz, Development, 1995, **121**, 2057.
[60] A. Trotochaud T. Hao, G. Wu, Z. Yang, S. Clark, 1999, **3**, 393.
[61] S. Takayama, Y. Sakagami Curr. Opin. Plant Biol., 2002, **5**, 382.
[62] S.J. Hisock S.M. Mc Innis Trends in Plant Science, 2003, **8**, 606.
[63] S. Takayama, H. Shimosato, H. Shiba, M. Funato, F. Che, M. Watanabe, M. Iwano, A. Isogai, Nature, 2001, **413**, 534.
[64] R. Dixit, J.B. Nasrallah, M.E. Nasrallah, Plant Physiol., 2000, **124**, 297.
[65] B.P. Kemp, J. Doughty, J. Exp. Bot., 2003, **54**, 157.
[66] A. Kachroo, C.R. Schopfer, J.B. Nasrallah, M.E Nasrallah, Science, 2001, **293**, 1824.
[67] C.R. Schopfer, J.B. Nasrallah, M.E. Nasrallah, Science, 1999, **286**, 1697.
[68] G. Suzuki, N. Kai, T. Hirose, T. Nishio, S. Takayama, A. Isogai, M. Watanabe, K. Hinata, Genetics, 1999, **153**, 391.
[69] J. Doughty, F. Hedderson, A. Mc Cubbin, H. Dickinson, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1993, **90**, 467.
[70] S. Takayama, H. Shiba, M. Iwano, H. Shimosato, F-C. Che, N. Kai, M. Watanabe, G. Suzuki, K. Hinata, A. Isogai, PNAS, 2000, **97**, 1920.

Praca wpłynęła do Redakcji 15 listopada 2005

WIADOMOŚCI 2005, 59, 11-12
chemiczne PL ISSN 0043-5104

PRZEGLĄD STOSOWANYCH BIOINDYKATORÓW DO MONITOROWANIA SKAŻENIA ŚRODOWISKA PRZYRODNICZEGO

BIOINDICATORS IN ENVIRONMENTAL POLLUTION MONITORING – A REVIEW

Krystyna Srogi

Instytut Chemicznej Przeróbki Węgla,
ul Zamkowa 1, 41-803 Zabrze

Abstract
Wprowadzenie
1. Przegląd stosowanych bioindykatorów do monitorowania skażenia środowiska przyrodniczego
   1.1. Mchy, porosty
   1.2. Igły sosny
   1.3 Wykorzystanie trawy, grzybów i innych organizmów (organów) jako zintegrowanych próbników do pobierania próbek zanieczyszczeń środowiska
   1.4. Wykorzystanie włosów jako biowskaźników
2. Zastosowanie roślinności jako biowskaźników jakości środowiska
Podsumowanie
Piśmiennictwo cytowane

Dr Krystyna Srogi jest absolwentem Wydziału Analityki Medycznej Śląskiej Akademii Medycznej w Sosnowcu. W latach 1996–2002 studiowała chemię w ramach studiów doktoranckich na Wydziale Chemii Politechniki Śląskiej w Gliwicach. Tematem rozprawy doktorskiej, zakończonej w 2002 z uzyskaniem tytułu doktora nauk chemicznych była absorpcyjna spektrometria atomowa i pulsowa polarografia różnicowa w analizie produktów i odpadów z przeróbki paliw stałych i w analizie mchów, z uwzględnieniem kontroli jakości uzyskiwanych wyników analitycznych i wykorzystaniem elementów Systemu Kontroli i Zapewnienia Jakości.

Jest współautorem 8 publikacji, autorem 7 publikacji. Obecnie pracuje w Instytucie Chemicznej Przeróbki Węgla w Zabrzu.

ABSTRACT

The aim of the study was a review using bioindicators in biomonitoring. As it well known, bioindicative methods are commonly used in the evaluation of environmental purity levels. Various types of plants are used as popular indicators of contamination, form mosses and lichens to trees or plants. Also, the monitor metal pollutions the following were suggested as bioindicators: pine bark. bacteria, fungi, grasses, ferns, algae, animals or human hair and laying hen feathers. It should be noted that monitoring with mosses as well as other bioindicators/biomonitors provides low-cost information on the nature and quantity of pollutant deposition and since the accumulation of elements by mosses is high, this creates ideal conditions for analysis and overcomes problem related to analytical sensitivities.

WPROWADZENIE

Od kilkudziesięciu lat w wielu krajach praktyczne zastosowanie w ocenie stopnia zanieczyszczenia środowiska znajdują metody bioindykacyjne, wykorzystujące w systemie monitoringu zanieczyszczeń organizmy żywe, czyli tzw. biowskaźniki [1, 2].

Z wykorzystaniem metod biologicznych do celów analitycznych wiążą się dwa pojęcia [5, 6]:

– biowskaźniki (bioindykator), który może stanowić organizm lub wspólnota organizmów. Biowskaźniki dostarczają informacji o stanie (jakości) środowiska oraz co do natury zmian w środowisku. Oceny stopnia zagrożenia danego elementu środowiska dokonuje się na podstawie analizy wizualnej.

– biomonitor, który również stanowi organizm lub wspólnotę organizmów, będące źródłem informacji na temat ilościowych aspektów jakości środowiska i zmian w nim zachodzących. Źródłem informacji są w tym przypadku wyniki analiz odpowiednio dobranych fitotestów.

Biowskaźnikiem może być cały organizm, bądź tylko jedna z jego części [3].

W stosunku do biowskaźników stawiane są wysokie wymagania. Aby wskaźnik był wartościowy musi charakteryzować się wąską „skalą tolerancji ekologicznej" tzn. reagować specyficznie na jeden czynnik środowiska (typ skażeń). Wśród biowskaźników można wyróżnić dwie główne grupy: (1) biowskaźniki właściwe (ang. *sensitive indicator*), które reagują na zmiany w środowisku w sposób widoczny, m.in. zmianami: morfologicznymi, składu gatunkowego, histologicznymi, w zachowaniu, w strukturze populacji organizmów, w przebiegu procesów metabolicznych; (2) biowskaźniki o niewidocznej reakcji organizmu (ang. *accumulative indicator*), lecz gromadzące różne substancje (zanieczyszczenia), których stężenia mogą być zmierzone [4–6].

W literaturze [7, 8] spotkać można również inny podział na:

– aktywne bioindykatory (ang. *active bioindicators*), używane zwykle w laboratorium celem sprawdzenia zawartości skumulowanych pierwiastków, związków po ich ekspozycji w określonym czasie i na terenie (technika woreczkowa, bądź transplantacyjna),

– pasywne bioindykatory (ang. *passive bioindicators*) – organizmy lub ich naturalne biotypy zdolne do akumulacji związków i pierwiastków, stosowane do badania aktualnego skażenia środowiska na obszarze ich występowania.

Specyficzną zdolność biowskaźników do bioakumulacji określonych pierwiastków wykorzystuje się często do celów biogeochemicznej prospekcji, przy której bada się zmienny skład chemiczny właśnie roślin wskaźnikowych.

Dla pełnego obrazu stosowanych metod bioindykacyjnych w Tabeli 1 [9] przedstawiono ich zalety i wady. W badaniach biomonitoringowych, z użyciem np. igliwia, mchów czy porostów analizowana jest siarka, a w szczególności jej związki (SO_2) [10–12], której zmiany w zawartości uznawane są za jedno z fizjologicznych kryte-

riów subtelnego naruszenia metabolizmu pod wpływem zanieczyszczeń powietrza i stopnia ich działania na drzewa i roślinność. Szczególnie niezwykle ważne wydają się badania oceny stopnia skażenia SO_2 w bioindykatorach pobranych w najbliższym otoczeniu emiterów w/w związku, np. elektrowni. Analizowane są również metale ciężkie, głównie kadm i ołów, których poziom zawartości w roślinach odzwierciedla stopień odżywienia, a niedobory o niedostatecznej ich zawartości w glebie lub o degradacji środowiska, spowodowanej głównie przez zanieczyszczenia komponentów tegoż środowiska, np. gleby [13]. Jak wiadomo metale spełniają różną rolę w życiu roślin, najczęściej analizowane cynk, miedź i żelazo pełnią ważne funkcje fizjologiczne, są roślinom niezbędne do prawidłowego metabolizmu zarówno na poziomie komórkowym, jak i całego organizmu. m.in. jako składnik wielu enzymów, białek i chlorofilu. Rośliny pobierają metale na drodze czynnej w procesie metabolicznym, proporcjonalnie do ich stężenia w podłożu, i biernej – przy nadmiarze w środowisku. Natomiast kadm i ołów, równie często analizowane, nie spełniają w roślinach żadnych funkcji. Są, więc typowymi zanieczyszczeniami, pobieranymi przez rośliny biernie zarówno z podłoża (proporcjonalnie do stężenia form rozpuszczalnych w roztworze glebowym), jak i z zanieczyszczonego powietrza wraz z opadem pyłu. Analizowane są również i inne makro (Al, Ca, Mg, K, Na, Mn) – i mikroskładniki (Fe, As, Mo, Se, Sr, Ag, Sn, Sb, Hg, Tl, Bi, Zr, Y, Ga, Ge) [14, 15]. Należy nadmienić, iż wzrost kwasowości gleb znacznie zwiększa ich biodostępność [16].

Tabela 1. Porównanie zalet i wad monitoringu biologicznego [9]

ZALETY	WADY
1. Rośliny mają dużą zdolność pochłaniania i magazynowania zanieczyszczeń.	1. Rośliny pobierają zanieczyszczenia z powietrza i gleby, co utrudnia interpretację wyników
2. Zanieczyszczenia akumulowane w roślinach lub na ich powierzchni mogą być analizowane metodami fizycznymi i chemicznymi.	2. Wyniki oznaczeń zawartości zanieczyszczeń w roślinach nie są tak precyzyjne jak ich pomiary bezpośrednio w powietrzu.
3. Rośliny mogą być użyte do określenia źródeł emisji zanieczyszczeń, ich dyspersji i osadzania.	3. Konieczność użycia określonych taksonów
4. Wykorzystanie materiału biologicznego umożliwia realną ocenę stanu zanieczyszczenia.	4. Kondycja i stan rośliny wskaźnikowej zależy od wielu czynników: zmian klimatycznych, patogenów i itp.
5. Relatywnie niski koszt badań.	

Poziom metali w bioindikatorach jest zależny od wielu czynników. Spośród najważniejszych należy wymienić:

(1) gatunek [17] – przy porównywaniu stężeń metali ciężkich w różnych gatunkach mchów czy porostów można wnioskować o stopniu zanieczyszczeń obszarów, na których one występują, w pewnym tylko przybliżeniu, wiadomo, bowiem, że istnieją często znaczne różnice w nagromadzeniu metali ciężkich przez rozmaite ich gatunki. Jak podaje Srogi [9] kryterium, które pozwala uznać wykorzystane gatunki

mchów za użyteczne w badaniach monitoringowych jest wielkość współczynnika korelacji pomiędzy zawartością badanego analitu w poszczególnych gatunkach.

Tabela 2. Zależności (korelacje) między zawartością cynku w mchach [9]

L.p.	*Hypnum. cup.fo.f.*	*Orthodicranum montanum*	*Pleurozium schreberi*	*Plagiothenium loetum*	*Pohlia nutans*
1	0,99***	0,94***	0,91**	0.73**	0.89**
2		0.84***	0,86*	0.89*	0.72***
3			0,66**	0,74**	0.81**
4				0.69*	0,62**
5					0,57*

*** p = 0,001, ** p = 0,005, * p = 0,01
Hypnum cup.fo.f. – Hypnum cupressiforme fo. Filiforme

W Tabeli 2 [9] zestawiono współczynniki korelacji oznaczania cynku w wybranych próbkach mchów. Podobne obserwacje poczynił Kuźniewski i in. [18] analizując zawartość metali ciężkich w różnych, pod względem gatunkowym, surowcach zielarskich. Do badań pobierano również różne części anatomiczne surowca roślinnego usytuowanego w różnych miejscach poboru w stosunku do tras samochodowych (1,5 m. od jezdni) [19, 20]. Najwięcej Zn, Pb i Cd wśród badanych roślin, stwierdzono w *Digitalis purpurea* oraz w kwiatach *Sambucus nigra*. Do podobnych konkluzji doszli autorzy w pracy [21], w której wykazano, iż spośród badanych roślin leczniczych najwyższą zawartość metali ciężkich wykazuje *Taraxacum officinalis* (mniszek lekarski) i *Plantago major L.* (babka zwyczajna), więcej w korzeniu iż w liściach;

(2) część anatomiczna osobnika i jego wiek – stwierdza się wzrost zawartości .netali wraz z wiekiem biowskaźników np. akumulacja w brązowych, starszych częściach mchu jest cztery razy większa niż w częściach zielonych, młodych [17, 22, 23]. Zróżnicowane zawartości metali ciężkich w częściach zielonych i brązowych zilustrowano w Tabeli 3.

Tabela 3. Wyniki oznaczenia metali [ppm s.m.] w *Orthodicranum montanum* (widłoząb górski) z uwzględnieniem części rośliny pobranej do analizy, $n = 6$ [9]

Część brązowa	Analit [ppm]	Część zielona
638,27	Cynk	524,36
406,67	Ołów	339,15
6,78	Kadm	5,15
63,67	Nikiel	57,89
3.98	Molibden	2,92

Tabela 4. Różnice w zawartości metali ciężkich pomiędzy częściami zielonymi i brązowymi *Orthodicranum montanum* zebranymi z obszaru województwa śląskiego [9]

Stanowisko poboru	Zn	Pb	Cd	Ni	Mo
Park Gliwicko-Zabrski	6,01	5,56**	3 69	3,43	3,28
Lasek przy trasie A4, Maciejów	2,64**	13,34**	3.50**	4 01**	5 54*
Las Łabędzki, Gliwice	16,78**	8,98**	5.22*	2 14	5,35**

* p - 0,05
** p - 0,01

Tabela 4 przedstawia różnice w zawartości metali ciężkich pomiędzy częściami zielonymi i brązowymi *Orthodicranum montanum* (widłoząb górski) zebranymi z obszaru województwa śląskiego [9];

(3) pora roku – obserwuje się spadek zawartości metali ciężkich w okresie intensywnego wzrostu [24], najbardziej odpowiednią porą roku zbierania, np. próbek mchu jest wczesne lato [25];

(4) miejsce poboru próbek – winno być adekwatne do celu analizy, np. chcąc uzyskać informacje o zanieczyszczeniu powietrza atmosferycznego na terenie przylegającym do autostrady nie należy pobierać próbek tuż przy niej lecz w odległości przynajmniej 50 m od jej krawędzi; autorzy prac [26, 27] zalecają pobieranie próbek mchów w odległości 300 m od głównych szlaków komunikacyjnych, a 100 m od gospodarstw domowych, mniejszych dróg i innych lokalnych zanieczyszczeń. Rühling i Tyler [1] badali akumulację ołowiu w różnym materiale roślinnym, m.in. mchach rosnących przy ruchliwych szosach w południowej Szwecji. Wykazali oni, że na przestrzeni zaledwie 150 m od szosy następuje 9-krotne obniżenie poziomu ołowiu w mchach;

(5) warunki klimatyczne lokalizacji pobranych do analizy mchów. W Tabeli 5 przedstawiono zróżnicowane stężenia Cd, Zn, Ni, Mo i Pb w mchach zebranych z różnych miejsc poboru [17];

(6) wielkość opadów atmosferycznych [17];

(7) sposób przygotowania próbek do analizy chemicznej: chodzi tu konkretnie o uwzględnienie, bądź nie, etapu mycia próbek roślinnych [32] decydujący w konsekwencji o końcowym wyniku analizy, co z kolei jest zobrazowane w Tabeli 6 [9];

(8) stosowane metody analityczne [14].

Tabela 5. Średnie zawartości [ppm s.m.] metali w próbach mchów. $n = 4$ [9]

Opis miejsca poboru próbki	Gatunek	Zn	Cd	Ni	Mo	Pb
Park Chopina, Gliwice	*Hypnum cupressiforme fo. filiforme* (rokiet cyprysowaty)	337,12	3,61	22,14	1,12	268,54
Dąbrówka Mała – obszar rolniczy	*Orthodicranum montanum* (widłoząb górski)	267,81	5,13	19,49	1,12	164,24
Maciejów Lasek przy trasie A4	*Orthodicranum montanum* (widłoząb górski)	518,86	5,95	56,17	2,72	337,15
Park Chrobrego, Gliwice	*Plagiothecium laetum* (płaszczeniec)	607,38	12,58	58,71	0,89	115,37
Sanok, skansen	*Polytrichum formosum* (płonnik strojny)	101,11	2,22	10,23	0,50	108,52
Las Łabędzki	*Orthodicranum montanum* (widłoząb górski)	253,22	3,94	21,49	3,88	224,11
Sanok ul. 3-ego Maja 3	*Orthodicranum montanum* (widłoząb górski)	527,75	10,51	36,48	2,19	328,74
Sanok, osiedle Posada	*Pohlia nutans* (knotnik zwisły)	625,57	22,52	59,74	1,15	457,82
Park Chopina, Gliwice	*Pleurozium schreberi* (rokietnik pospolity)	425,69	21,58	42,56	2,26	212,35
Bytom – Piekary Śląskie, Zakłady Hutnicze	*Orthodicranum montanum* (widłoząb górski)	1047,14	19,62	58,83	4,31	810,32
Park Gliwicko-Zabrski	*Polytrichum formosum* (płonnik strojny)	110,32	2,11	12,21	1,72	156,71
Sanok, skansen	*Hypnum cupressiforme fo. filiforme* (rokiet cyprysowaty)	510,31	5,14	42,29	2,22	256,31

Tabela 6. Wyniki oznaczenia metali [ppm s.m.] w *Plagiothecium laetum* (cz. myta, niemyta), $n = 6$ [9]

Część myta	Analit [ppm]	Część niemyta
279,15–303,10	Cynk	314,48–328,21
235,03–258,74	Ołów	301,11–311,47
9,26–13,16	Nikiel	16,69–18,93
4,26–5,03	Kadm	6,14–7,03
0,98–1,34	Molibden	2,02–2,94

1. PRZEGLĄD STOSOWANYCH BIOINDYKATORÓW DO MONITOROWANIA SKAŻENIA ŚRODOWISKA PRZYRODNICZEGO

Wykorzystanie wskaźników biologicznych celem oszacowania poziomu zanieczyszczeń środowiska i oddziaływanie tych zanieczyszczeń na środowisko jest stosunkowo szerokie, a kryteria, które mogą być pomocne przy wyborze odpowiednich organizmów żywych jako biowskaźników podano poniżej [28–33]:

- względnie osiadły charakter życia wybranych organizmów (celem spełnienia wymogu reprezentatywności w stosunku do badanego ekosystemu),
- szerokie rozpowszechnienie geograficzne i łatwość identyfikacji oraz zbierania próbek,
- możliwość zebrania odpowiedniej ilości materiału,
- względnie duża tolerancja organizmów w stosunku do badanych zanieczyszczeń (metale ciężkie, związki organiczne),
- łatwość transplantacji organizmów w inne miejsce, a także przeniesienia do laboratorium,
- stabilność populacji wybranego organizmu celem zapewnienia możliwości wielokrotnego pobierania próbek w ciągu dłuższego okresu (badanie trendów),
- występowanie sensownej korelacji pomiędzy poziomem zanieczyszczenia danego elementu środowiska (powietrze, woda, osady, żywność), a stężeniem analitu w tkance (tkankach) wybranego organizmu,
- taka sama wartość współczynnika bioakumulacji zanieczyszczeń (zwielokrotnienie stężenia analitu w organizmie w stosunku do badanego środowiska) w różnych miejscach (wymóg ten nie zawsze jest spełniony ze względu na różne czynniki mogące wpływać na proces pobierania zanieczyszczeń ze środowiska przez dany organizm).

W praktyce biomonitoring oparty na użyciu organizmów roślinnych może być wykorzystywany w różny sposób. Zwykle wyróżnia się trzy podstawowe obszary jego stosowania [29, 30]:

- monitoring poziomu zanieczyszczenia środowiska wokół punktowego źródła emisji,
- identyfikacja źródeł emisji zanieczyszczenia, oszacowanie regionalnych ładunków zanieczyszczeń i określenie ich składu,
- monitoring długookresowy i identyfikacja trendów.

Należy w tym miejscu zaznaczyć, iż w pracy skupiono się głównie na omówieniu jednego typu zanieczyszczeń – zanieczyszczeń metalami ciężkimi oraz jednego typu wskaźników – typu akumulatorów reprezentowanych przez wiele grup organizmów, jak: rośliny naczyniowe i beznaczyniowe, porosty, grzyby, zwierzęta bezkręgowe i kręgowe, człowiek (tkanki akumulujące pierwiastki śladowe i związki organiczne, np. włosy, paznokcie, zęby).

1.1. MCHY, POROSTY

Przechodząc do omówienia poszczególnych biowskaźników trzeba zaznaczyć, że kumulacja pierwiastków w aparacie asymilacyjnym roślin jest ciągiem dynamicznym, związanym z zachodzącymi w roślinie procesami rozwoju i starzenia się. Wyraża potrzeby pokarmowe roślin w stosunku do poszczególnych składników oraz możliwości ich pobrania. Jakkolwiek pobieranie większości pierwiastków jest procesem regulowanym metaboliczne, to w „warunkach stresowych" możliwości roślin w tym zakresie są ograniczone, zwłaszcza w przypadku dopływu pierwiastków z zanieczyszczenia atmosfery. Dlatego wielu badaczy traktuje skład chemiczny, przykładowo aparatu asymilacyjnego, jako dobry wskaźnik zanieczyszczenia środowiska naturalnego.

Spośród szerokiej grupy biowskaźników, omówionych poniżej, mchy (zarówno w środowisku atmosferycznym jak i w środowisku wodnym) i porosty zostały pod koniec lat 60. po raz pierwszy, jako czułe biomarkery zastosowane do badań biomonitoringowych [34–40]. Opierając na licznych danych literaturowych określono następujące cechy mchów, które czynią z nich dobre biowskaźniki [41, 42]:

(1) mchy nie posiadają kutikuli i epidermy, dzięki czemu ich ściany komórkowe są łatwo przepuszczalne dla metali ciężkich;

(2) mchy pozbawione są korzeni i tkanek przewodzących, co powoduje, że sole mineralne czerpią z opadów atmosferycznych i suchej depozycji, a w bardzo ograniczonym stopniu z podłoża. Należy w tym miejscu zaznaczyć, iż w odróżnieniu od mchów, porosty akumulują metale jednocześnie z powietrza jak i z podłoża (kora drzew) [43];

(3) aktywnie rosnąca część osobnika czerpie pokarm ze stale obumierającej części, nie ma, więc kontaktu z podłożem;

(4) z racji swojej budowy chłoną one składniki pokarmowe całą powierzchnią ciała;

(5) pobierają metale głównie pasywnie, na drodze prostego procesu wymiany jonów;

(6) znaczna akumulacja zanieczyszczeń nie powoduje obumarcia osobnika;

(7) łatwość pobierania próbek do analizy;

(8) stała zawartość metali ciężkich podczas długiego czasu przechowywania próbek.

Porosty, które stanowią rodzinę pośrednią pomiędzy algami a grzybami, są przystosowane do życia w środowisku bardzo obciążonym przez różnego typu zanieczyszczenia [44]. Porosty stanowią grupę organizmów szczególnie przystosowanych do tego, by mogły być one wykorzystywane jako bioindykatory zanieczyszczenia środowiska. Związane to jest z następującymi parametrami [28]:

- duża pojemność akumulacyjna w stosunku do wielu typów zanieczyszczeń środowiskowych,
- odporność na szoki środowiskowe, tzn. na szok wodny – spowolnienie procesów metabolizmu w celu przeżycia w zanieczyszczonym środowisku, oraz szok

termiczny – odporność na niskie temperatury, która umożliwia niezmienną aktywność w okresie zimowym, gdy zazwyczaj poziom zanieczyszczenia powietrza atmosferycznego jest wyższy,

- wolny wzrost i długowieczność, co umożliwia dokładane oszacowanie poziomu zanieczyszczenia środowiska w skali lokalnej.

Ze względu na wymienione właściwości tej grupy roślin, organizmy te mogą być używane do badania aktualnego skażenia środowiska na obszarach o różnej powierzchni oraz do rejestracji poziomu zanieczyszczeń w określonej jednostce czasu, pozwalając na stałe monitorowanie emisji chemicznych [45]. Poprzez dokładne podanie stanowisk zbioru materiału roślinnego do analizy chemicznej istnieje możliwość powtórzenia badań [46]. W ten sposób istnieje podstawa do prześledzenia zmian w zawartości metali w mchach i do wysuwania wniosków na temat stopnia skażenia danego środowiska w przyszłości. Przy pomocy mchów pochodzących ze starych kolekcji zielnikowych można określić poziom skażenia środowiska metalami również w przeszłości [41]. Według danych [36, 37] stężenia ołowiu i niklu w *Hypnum cupressiforme fo. filiforme* (rokiet cyprysowaty), zbieranym w południowej Szwecji na przestrzeni ostatnich 150 lat, wzrosło ponad dwukrotnie. Dla miedzi i cynku stwierdzono natomiast znacznie słabszy wzrost stężenia.

Mchy, jak również i porosty stosowane są do długoterminowych badań monitoringowych na terenie wielu krajów [47, 48]. Ocena skażenia środowiska przy użyciu, biowskaźników może być dokonywana przy zastosowaniu organizmów rosnących w danym obszarze lub też za pomocą osobników pozyskanych w czystych regionach i eksponowanych w obszarach skażonych [37]. W tym drugim przypadku w ocenie skażenia środowiska używa się bądź techniki woreczkowej [41, 48], gdzie wysuszone lub świeże mchy umieszczane są w nylonowych siateczkach i wywieszane na określony czas (2 tygodnie lub 1 miesiąc) w skażonym obszarze, bądź metody transplantacyjnej [50], polegającej na przenoszeniu mchów wraz z podłożem z kontrolnego czystego obszaru w skażony teren i eksponowaniu w nim próbek, zawieszanych na drzewach na wysokości około 2 m przez kilka tygodni [11]. W obu metodach po określonym czasie mierzy się poziom akumulacji metali ciężkich. Goodman i Roberts [38] rejestrowali skażenie środowiska w południowej Anglii stosując równocześnie obie metody. Stwierdzili oni podobny poziom metali w mchach z woreczków i w mchach transplantacyjnych. W tych ostatnich jednak czas akumulacji był znacznie wolniejszy. Z tego powodu autorzy uznali pierwszą z metod (mchy – woreczki) za lepszą i bardziej godną polecenia.

Szczegółowego przeglądu stosowanych, do badań biomonitoringowych, porostów, z wykorzystaniem różnych metod oceny kontroli skażenia środowiska przy użyciu wspomnianych markerów dokonał w swej obszernej pracy Conti i Cecchetti [51].

Do stałej obserwacji różnego typu przemian w środowisku naturalnym wykorzystuje się również aparat asymilacyjny drzew iglastych, korę, próchnicę, grzyby, mikroorganizmy [52–56] oraz surowce zielarskie, paprocie [57–62] czy owady (chrząszcze) [15].

1.2. IGŁY SOSNY

Ważnym etapem rozpoznania zagrożeń środowiska leśnego jest m.in. prowadzenie monitoringu biologicznego, w którym w charakterze biomarkerów mogą być używane organizmy roślinne wspomniane i omówione powyżej, mchy i porosty, jak również igły sosny zwyczajnej, różne gatunki traw i inne.

Wielu autorów literatury przedmiotu [15, 63–66] w ocenie aktualnego zagrożenia środowiska leśnego wiele uwagi przypisuje właśnie wynikom analizy aparatu asymilacyjnego drzew iglastych. Warto w tym miejscu zaznaczyć, iż badania składu chemicznego aparatu asymilacyjnego drzew początkowo były prowadzone w aspekcie możliwości zastosowania analizy chemicznej igliwia i liści do oceny potrzeb mineralnego nawożenia drzewostanu. Według wielu badaczy [63, 65, 66], w igłach sosny normalna zawartość metali biorących udział w metabolizmie może się wahać w szerokich granicach: Fe: 70–850 ppm, Zn: 17-88 ppm, Cu: 1,3–14,0 ppm. W przypadku pozostałych metali, tj. Pb i Cd, sugerowane poziomy zawartości podwyższonej i toksycznej nie są jednoznaczne [69]. Na podstawie wielu danych literaturowych można przyjąć, że podwyższone są zawartości Pb w igłach powyżej 9, a nawet 16 ppm, a toksyczne powyżej 32 ppm. Ponadto zaobserwowano, że jego zawartość powyżej 12 ppm w igłach prowadzi do zmniejszenia liczby szpilek w pędzie [67], a tak duża zawartość w jednoręcznym pędzie głównym jest bliska dawki śmiertelnej dla sosny [68]. Za próg zawartości podwyższonej Cd w igłach uznaje się 0,63 ppm, a toksycznej 4,8 ppm. Według danych przedstawionych w pracy Malzahn [63], zawartości metali ciężkich w igłach sosny zwyczajnej w Puszczy Białowieskiej mieściła się w granicach zawartości uznawanych za tło naturalne we wszystkich latach badań (1986–2001 r), natomiast na nieuprzemysłowionych, przyległych do wschodnich granic, terenach Białorusi stwierdzono znacznie wyższe zawartości Pb, Zn i Cu, i niższe dla Cd, w stosunku do danych uzyskanych z analizy igliwia, pobranych z drzewostanu Puszczy Białowieskiej.

1.3. WYKORZYSTANIE TRAWY, GRZYBÓW I INNYCH ORGANIZMÓW (ORGANÓW) JAKO ZINTEGROWANYCH PRÓBNIKÓW DO POBIERANIA ZANIECZYSZCZEŃ ŚRODOWISKA

Dobrymi biowskaźnikami skażenia środowiska naturalnego są trawy, głównie takie gatunki jak: *Agrostis tenuis*, *Festuca rubra* i *Elytrigia repyens* [69] stosowane do oczyszczania terenów z nadmiernej zawartości Pb, ponieważ cechują się tolerancją względem tego pierwiastka. W Tabeli 7 [64] przedstawiono zawartości metali ciężkich w dwóch różnych gatunkach mchów oraz traw rosnących w obszarach oddziaływań przemysłu miedziowego.

Tabela 7. Porównanie zawartości badanych pierwiastków w dwóch różnych gatunkach mchów oraz traw rosnących w obszarach oddziaływań przemysłu miedziowego [mg/kg s.m.] [64]

Pierwiastek	*Bryum argenteum*	*Hylocomium splenders*	*Elytrigia repens* (trawa)	*Agrostis tenuis* (trawa)
Cd	1,04–2,33	1,08–5,42	0,47–8,90	0,37–6,28
Cu	21,60–46,50	25,30–78,00	12,80–49,60	8,10–28,65
Ni	37,40–59,28	28,80–68,50	2,33–49,10	1,24–17,3
Pb	64,00–331,0	95,50–516,0	2,80–479,0	1,36–670,0

Inną grupę czułych biowskaźników skażenia środowiska stanowią grzyby, które w przeciwieństwie do powyżej omówionych organizmów, pobierają metale z gleby, a nie z powietrza. Bowiem grzybnie penetrują glebę przez cały rok, podczas gdy owocnia posiada kontakt z powietrzem tylko przez krótki czas [69]. Jak podaje Kabata-Pendias [70] grzyby charakteryzują się, w szczególności wysoką akumulacją rtęci i kadmu. Podkreślić należy, iż wartość akumulacji uzależniona jest od gatunku grzybów. W pracy [74] wykazano, iż czułym wskaźnikiem monitoringu biologicznego opadu promieniotwórczego we Włoszech po katastrofie w Czarnobylu w 1986 roku okazały się grzyby, w których poziom ^{137}Cs stale wzrastał, gdyż strzępki podstawczaków kumulowały izotopy promieniotwórcze właśnie z gleby. Jednakże miało to miejsce wtedy, gdy wytworzyły się nadziemne owocniki, a cez stał się dostępny dla zwierząt żywiących się grzybami. Podkreślić należy, że w cytowanej pracy nie stwierdzono korelacji pomiędzy poziomem ^{137}Cs w grzybach a jego zawartością w glebie, co uwydatnia znaczenie, monitoringu biologicznego w odniesieniu do zanieczyszczeń promieniotwórczych.

Do użytecznych bioindykatorów należą również pióra kur nieśnych oraz sierść owiec, np. rasy merynos [69, 71]. Uwarunkowane jest to przede wszystkim budową włókien sierści wspominanej rasy owiec. Włókna zbudowane są z białka keratyny oraz ze związków mineralnych odkładających się w komórkach (włókna) bądź na ich powierzchni, i/lub w środku włókna lub w lepiszczu. Mikroelementy wraz z metalami toksycznymi (pochodzące z paszy) przedostają się do torebki włosowej, lub mogą być deponowane na powierzchni sierści, lecz nie przenikają do organizmu zwierzęcego. Jest to przyczyną (akumulacja metali ciężkich) pogorszenia właściwości fizycznych, żółknięcie wełny, co z kolei jest przyczyną zmniejszanie jakości wełny.

W przypadku omawiania tej grupy biowskaźników warto wspomnieć, iż do ekspozycji pestycydów chloroorganicznych powszechnie stosuje się analizę jaj ptasich, co jest znacznie mniej destruktywne niż zbieranie osobników dorosłych [73]. Natomiast w Finlandii [73] stosuje się pióra piskląt wielu gatunków ptaków, w określeniu stopnia ekspozycji osobników dorosłych na rtęć i jej związki.

Nie mniej ważną grupę biowskaźników stanowią organizmy zwierzęce lub ich organy z niższych rzędów systematyki, jak: skoczonogi, nicienie, dżdżownice [72, 73], a wśród nich i bakterie [74] oraz inne mikroorganizmy, ze względu na

różnorodny sposób ich odżywiania (heterotroficzne i autotroficzne) a także związane z tym procesy metaboliczne. Do grupy tej zaliczyć można również wspomniane już powyżej owady (chrząszcze, pszczoły) [75] i ryby [76]. W Tabeli 8 [69] przedstawiono zawartość metali w glebowych bakteriach heterotroficznych narażonych na obecność Cu, Cd, Ni i Cr w glebie. Do grupy tej można zaliczyć również organizmy bezkręgowe, głównie dżdżownice, np. *Aporrectodea caliginosa*, *Eisenia foetida* [77–79] pożyteczne jednakże tylko dla ekosystemów leśnych [80], agroekosystemów [81], w kontroli jakości gleb oraz w ocenie biodostępności związków chemicznych (ekspozycja dżdżownic w glebie) [82]. Należy zaznaczyć, że monitoring stężenia skażonych ryb prowadzi się na całym świecie. Na przykład program monitoringu rtęci w Brazylii [76] wykazał, że zawartość tego metalu w jadalnych częściach ryb pochodzący z rzek z terenów kopalni złota, gdzie rtęć jest powszechnie używana do ekstrakcji i oczyszczania złota, 5-krotnie przekraczała „bezpieczny" poziom w produktach spożywczych.

Tabela 8. Zawartość metali w heteroficznych bakteriach glebowych [69]

Zawartość metali [mg/kg s.m.]			
Cd	Cr	Cu	Ni
20,0–1490,0	2,23–5178,0	21,5–7984,0	0,97–11349,0

Ważną grupę biowskaźników stanowią również małże, które są źródłem pokarmu dla drapieżnych kręgowców, szczególnie ptaków np. *Brotia costula*, *Melanoides tuberculata*, *Radix ovata*, *Viviparus sp.*, *Mytilus edulis* [76, 83, 84] oraz algi [85–87], w szczególności makroalgi [88] odporne na zmiany w środowisku oraz wykazujące, tak charakterystyczną dla biowskaźników, wąską skalę tolerancji ekologicznej. Przykładowo w pracach [89, 90] wykazano, iż niezwykle czułymi biowskaźnikami zanieczyszczenia ekosystemu są *Ulva rigida* [91–93], *Ulva lactuc* [94–96] i *Enteromorpha*, ze względu na specyficzną ich akumulację toksycznych pierwiastków: ołowiu i kadmu. Mikroalgi (*Spirulina*) [97], ze względu na łatwość pobierania metali toksycznych mogą mieć zastosowanie do usuwania ich z zanieczyszczonych ścieków. 1 g biomasy mikroalgi może związać około 200 mg Cr i Cd, oraz 100 mg Cu podczas półgodzinnej inkubacji. Warto również nadmienić, iż w/w organizmy, a w szczególności małże (*Lumnaea stagnalis*) wykorzystywane są również do oceny radioekologicznego [98] monitoringu, np. podczas skażenia radioaktywnego w Czarnobylu. Ponadto [99] mogą mieć również zastosowanie w kontroli jakości wody oraz, podobnie jak mchy, w długoterminowych badaniach monitorningowych ekosystemów [100].

1.4. WYKORZYSTANIE WŁOSÓW JAKO BIOWSKAŹNIKÓW

W podsumowaniu niniejszego przeglądu literaturowego należy również wspomnieć o bardzo ważnej grupie biowskaźników, w szczególności dla zdrowia ludzkiego, czyli o włosach [101–107]. Analiza wspomnianych już biomarkerów ma zastosowanie do różnych celów, m.in. w toksykologii sądowej, patologii klinicznej, w określeniu stopnia odżywienia organizmu [108], jak również do biologicznego monitorowania ekspozycji zawodowej i środowiskowej na metale ciężkie [109–111]. Oznaczenie pierwiastków we włosach określonych populacji, szczególnie dziecięcych [112] może służyć jako sposób wykrywania terenów nadmiernie zanieczyszczonych przez poszczególne metale oraz do porównań wielkości skażeń różnych środowisk [113–115].

Z doniesień literaturowych wynika, że średnie zawartości pierwiastków we włosach mieszczą się granicach dla Fe: 142–191; 12–30 [118]; Mn: 47–246; Cu: 9,6–20; Zn: 23–72,0; 160–200 [118]; Cd: 0,03–0,17; Pb: 1,6–3,0 i Hg: 0,2–0,8 [ppm] [116–118]. Warto podkreślić, iż według WHO [119, 120], w większości przypadków, nie oznacza się Co i Cr, ze względu na znikomą przydatność w toksykologii środowiska. Zawartości pierwiastków we włosach zależą od wielu czynników [104, 113]. Do najważniejszych należy zaliczyć: wiek, płeć, dieta, zamieszkanie, kolor włosów, palenie tytoniu, przebyte choroby a także, co jest bardzo częste u małych dzieci tzw. „lizanie brudnych rąk" [121, 122]. Należy podkreślić, iż w piśmiennictwie spotyka się rozbieżne zdania dotyczące zależności zawartości metali od w/w czynników. I tak kilku autorów [123, 124] nie stwierdziło korelacji między spożyciem cynku i miedzi a stężeniem tych mikroelementów we włosach badanych populacji (młodzież i kobiety starsze). Natomiast w pracy [125] wykazano wpływ stosowanej diety na skład pierwiastkowy włosów. Poziom żelaza, miedzi i cynku był statystycznie wyższy we włosach chłopców, którzy żywili się racjonalnie przez okres pobytu w domu resocjalizacji w stosunku do grupy kontrolnej. W pracy [108] nie zaobserwowano statystycznie istotnych różnic w zawartości pierwiastków we włosach w zależności od płci. Choć w pracy [125] kobiety miały wyższy poziom miedzi we włosach niż mężczyźni. Jak wykazano w pracy [108] sposób żywienia ma istotny wpływ na zawartość żelaza we włosach, tj. u osób które nie stosowały żadnych ograniczeń dietetycznych ze względów zdrowotnych stężenie tego mikroelementu było statystycznie wyższe w porównaniu z respondentami wykluczającymi niektóre produkty z diety, np. mleko i jego przetwory.

2. ZASTOSOWANIE ROŚLINNOŚCI JAKO BIOWSKAŹNIKÓW JAKOŚCI ŚRODOWISKA

W metodach bioindykacyjnych do oceny stanu środowiska wykorzystuje się głównie reakcje organizmów roślinnych. Duże zainteresowanie biowskaźników wynika z ich szybkiej reakcji na chemiczne zmiany środowiska. W Tabeli 9 [8, 44]

zestawiono podstawowe informacje dotyczące podejść metodologicznych związanych z wykorzystywaniem roślinności jako mierników skażenia środowiska.

Tabela 9. Parametry stosowane jako mierniki skażenia środowiska [8, 44]

Oszacowanie poprzez obserwację lub wspólnoty organizmów	Pomiar poprzez badanie organizmu lub wspólnoty organizmów
Zmiany morfologiczne ▪ naprężenia międzybrodawkowe (*internodulal stretching*) ▪ wzrost krzywych gałęzi (*bending growth*) ▪ liniowy wzrost korzeni ▪ zmiany barwy igieł i/lub liści Zmiany struktury i organów (obserwowane pod mikroskopem lub w mikroskopie elektronowym). Zmiany w liczebności lub rozmieszczeniu populacji	Oznaczenie poziomu zanieczyszczeń (metale, związki organiczne) w próbkach biomasy

Jako przykłady praktycznego wykorzystania podejścia polegającego jedynie na oszacowaniu stanu środowiska poprzez obserwację organizmu (organizmów) do oceny stopnia skażenia środowiska można wymienić [44]:

- obserwacje zmian ilości mchów wodnych jako wskaźników stopnia zanieczyszczenia wód rzecznych [126],
- ocenę wizualnych symptomów uszkodzenia listowia drzew w wyniku działania ozonu troposferycznego [127], który jest jednym ze składników tzw. smogu fotochemicznego,
- oszacowanie uszkodzeń w lasach wywołanych emisją szkodliwych zanieczyszczeń przez zakłady hutnicze [128] na podstawie satelitarnych zdjęć obszarów leśnych.

PODSUMOWANIE

Można stwierdzić, iż omówione powyżej biowskaźniki są niewątpliwie czułymi wskaźnikami skażenia środowiska naturalnego i jego komponentów metalami ciężkimi [24, 129–132]. Należy podkreślić, iż nieustannie prowadzone są badania celem poszerzenia, omówionej grupy biomarkerów, w oparciu o zastosowanie tzw. „kandydatów". Autorzy pracy [133] przeprowadzili analizę zawartości wybranych metali ciężkich w kandydatach na biowskaźniki w chwastach wodnych: *Eihornia crassipes* (hiacynt wodny) i *Phragmites australis* (trzcina pływająca). Rośliny zostały pobrane z różnych zbiorników wodnych w Ismaili (Egipt), celem zidentyfikowania potencjalnego źródła skażenia na tym obszarze i oceny ich przydatności jako biowskaźników.

W podsumowaniu można stwierdzić, ze w obserwacji różnego typu przemian w środowisku – w tym w ocenie zanieczyszczenia środowiska ksenobiotykami – ważną rolę odrywają organizmy roślinne. Szczególnie cenne są w tym przypadku dwie cechy roślin: ich szybka reakcja na chemiczne zmiany składu środowiska –

będąca skutkiem ich małej zdolności do zachowania względnego stałego stanu równowagi (homeostazy) – oraz zdolności do akumulacji zanieczyszczeń w wyniku zachodzenia w nich szybkiego procesu adaptacji. Dobre właściwości wskaźnikowe powodują, że organizmy roślinne są coraz częściej wykorzystywane do badania jakości ekosystemów, oceny jego stanu oraz tempa, stopnia i zasięgu bieżących zmian, czyli biomonitoringu środowiska [44].

Ocena zanieczyszczenia atmosfery, gleby i innych komponentów środowiska, a także zdrowia ludzkiego (włosy), za pośrednictwem omówionych biowskaźników jest jednak wtedy prawdziwa, gdy stosuje się odpowiednie metody zbioru i analizy chemicznej, a także przestrzega się homogeniczności materiału badawczego [37, 134]. Bez spełnienia tych wymagań analityk otrzymać może błędną i nieporównywalną informację o poziomie zanieczyszczenia metalami poszczególnych regionów lub okresów czasowych.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

[1] A. Rühling, G. Tyler, Water, Air, Soil Pollut., 1973, **2**, 445.

[2] F.A. Yule, O.L.L., Water, Air, Soil Pollut., 1984, **21**, 261.

[3] L. Thöni, N. Schnyder, J. Hertz, Staub Reinh. der Luft., 1993, **53**, 319.

[4] K. Grodzińska, *Ocena skażenia środowiska Polski metalami ciężkimi przy użyciu mchów jako biowskaźników*, PIOŚ, Warszawa 1997.

[5] B. Markert, J. Oehlmann, M. Roth, *General Aspects of Heavy Metal Monitoring by Plants and Animals from 1997, Environmental Biomonitoring-Exposure Assessment and Specimen Banking*, ACS Symposium Series 654, A.CH.S., Washington 1997.

[6] B.A. Markert, A.M. Breure, H.G. Zechmeister, *Bioindicators and biomonitors. Trace Metals and other Contaminants in the Environment*, Volume 6, Elsevier Science Ltd. Amsterdam, 2003.

[7] B. Markert, U. Herpin, J. Berlekamp, J. Oehlmann, K. Grodzińska, B. Mankovska, I. Suchara, U. Siewers, V. Weckert, H. Lieth, Sci. Total Environ., 1996, **193**, 85.

[8] B. Markert, O. Wappelhorst, V. Weckert, U. Herpin, U. Siewers, K.Friese, G. Breulmann, J. Radioanal. Nucl. Chem., 1999, **240**, 425.

[9] K. Srogi, *Absorpcyjna spektrometria atomowa i pulsowa polarografia różnicowa w analizie produktów i odpadów z przeróbki paliw stałych i w analizie mchów*, praca doktorska. Pol. Śl., Gliwice 2002.

[10] M. Äyräs, H. Niskavaara, I. Bogatyrev, V. Chekushin, V. Pavlov, P. Carita, Jo.H. Halleraker, T.E. Finne, G. Kashulina, C. Reimann, J. Geochem. Explor., 1997, **58**, 269.

[11] Praca zbiorowa, red. J. Fabiszewski, *Bioindykacja skażeń przemysłowych i rolniczych* (materiały pokonferencyjne), PAN, Warszawa 1983.

[12] D.L. Heanes, Anal. Lett., 1990, **23**, 675.

[13] R. Bargagli, D.H. Brown, L. Nelli, Environ Polutt., 1995, **89**, 169.

[14] T. Berg, O. Rŷset, E. Steinnes, Atmos. Environ., 1995, **29**, 353.

[15] A. Mukherjee, P. Nurteva, Sci. Total Environ., 1994, **151**, 191.

[16] A. Ostrowska, S. Gawliński, Z. Szczubiałka, *Metody analizy i oceny właściwości gleb i roślin*. Katalog Instytutu Ochrony Środowiska, Warszawa 1991.

[17] K. Grodzińska, Ochrona Przyrody, 1980, **43**, 9.

[18] K. Kuźniewski, B. Hojden, K. Radwan-Pytlewska, K. Szulkowska-Wojaczek. Herba Polonica, 1993, **39**, 131.
[19] Z. Endler, K. Markiewicz, J. Michalczyk, Wiad. Zielar., 1986, **9**, 6.
[20] H. Tokarz, K. Wierzchowiska-Renke, T. Jelinowski, Wiad. Zielar., 1991, **33**, 19.
[21] W. Nowakowski, A. Kolczak, Wiad. Zielar., 1988, **2**, 5.
[22] I. Baranowska, K. Srogi, Pol. J. Environ. Stud., 2000, **9**, 329.
[23] I. Baranowska, K. Srogi, A. Włochowicz, K. Szczepaniak, Pol. J. Environ. Stud., 2002, **11**, 467.
[24] B. Markert, V. Weckert, Toxicol. Total Environ., 1993, **40**, 43.
[25] A. Kostrzewski, M. Mazurek, A. Stach, *Zintegrowany monitoring środowiska przyrodniczego, zasady organizacji, system pomiarowy, wybrane metody badań*, PIOŚ, Warszawa 1995.
[26] J. Berlekamp, U. Herpin, M. Matthies, H. Lieth, B. Markert, V. Weckert, B. Wolterbeek, T. Verburg, H.-J. Zinner, U. Siewers, Water, Air, Soil Pollut., 1998, **101**, 177.
[27] G. Ellison, J. Newham, M.J. Pichin, I. Thompson, Environ. Pollut., 1976, **11**, 167.
[28] L. Campanella, P. Ercole, Pure Appl. Anal. Chem., 1998, **1**, 87.
[29] R.J. Pakeman, P.K. Hankard, D. Osborn, Rev. Environ. Contam. Toxicol., 1998, **157**, 1.
[30] G. Ester, D. Overdieck, *Modern Ecology. Basic and Applied Aspects*, Elsevier Science, Ltd. Amsterdam, 1991.
[31] J.-P. Garrec, M.-H. Livertoux, Pollut. Atmos., 1998, **10**, 78.
[32] W. Wang, K. Freemarkt, Ecotoxicol. Environ. Saf., 1995, **30**, 289.
[33] Praca zbiorowa, red. A. Kabata-Pendias, B. Szteke, *Problemy jakości analizy śladowej w badaniach środowiska przyrodniczego*, PIOŚ, Warszawa 1998.
[34] I. Brodo, Ecology, 1961, **42**, 838.
[35] D.N. Rao, F. LeBlanc, Bryologist, 1966, **69**, 69.
[36] A. Rühling, G. Tyler, Bot. Notiser. 1968, **121**, 321.
[37] A. Rühling, G. Tyler, Oikos, 1970, **21**, 92.
[38] G.T. Goodman, T.M. Roberts, Nature, 1971, **231**, 287.
[39] J.M. Ratcliffe, Atmos. Environ., 1975, **9**, 623.
[40] S.S. Groet, Oikos, 1976, **27**, 445.
[41] Praca zbiorowa, red. H.K. Dillon, Mat H. Ho, *Biological monitoring of exposure to chemicals, metals*, John Willey & Sons, USA, New York 1991.
[42] J. Kaliszczyk, K. Kolon, E. Ślipek, *Zawartość wybranych metali ciężkich w mchu sierpowcu nerkowatym – Drepanocladus aduncus (Hedw.)*, Acta Universitatis Wratislaviensis, Prace botaniczne, LXVII, Wrocław Nr 1807, 1995, 81.
[43] L. Folkeson, Water, Air, Soil Pollut., 1979, **11**, 253.
[44] J. Namieśnik, W. Wardecki, Chem. Inż. Ekol., 2000, **7**, 189.
[45] D.H. Brown, G. Brümelis, Sci. Total Environ., 1996, **187**, 153.
[46] H. Ross, Water, Air, Soil Pollut., 1990, **50**, 63.
[47] K. Grodzińska, G. Szarek-Łukaszewska, B. Godzik, Sci. Total Environ.,1999, **229**, 41.
[48] M.R.D. Seaward, Sci. Total Environ.,1995, **176**, 129.
[49] F.A. Gailey, O.L. Lloyd, Environ. Health Perspect., 1986, **68**, 187.
[50] P. Little, M.H. Martin, Environ. Pollut., 1974, **6**, 1.
[51] M.E. Conti, G. Cecchetti, Environ. Pollut., 2001, **114**, 471.
[52] I. Türkan, E. Henden, Ü. Celik, S. Kivicim, Sci. Total Environ., 1995, **166**, 61.
[53] H. Lippo, J. Poikolainem, E. Kubin, Water, Air, Soil Pollut., 1995, **85**, 2241.
[54] P. Barrnett, L.J. Davidowski, K.W. Penaro, T.R. Copland, Anal. Chem., 1978, **56**, 1021.
[55] P. Genoni, V. Parco, A. Santagostino, Chemospfere, 2000, **41**, 729.
[56] M. Äyräs, V. Pavlov, C. Reimann, Water, Air, Soil Pollut.,1997, **98**, 361.

[57] J. Kwapuliński, J. Mirosławski, R. Rochel, D. Wiechuła, K. Kraśnicka, K. Iwanek, Pol. Tyg. Lek., 1994, **49**, 548.
[58] K. Iwanek, *Zawartość metali ciężkich w niektórych roślinach leczniczych i produktach ziełarskich*, praca doktorska, ŚLAM, Sosnowiec 1998.
[59] J. Kwapuliński, J. Mirosławski, D. Wiechuła, R. Rochel, J. Burczyk, R. Sowada, K. Iwanek, Bromat. Chem. Tok., 1996, **29**, 243.
[60] Endler Z., Markiewicz K., Michalczyk J.: Wiad. Zielar., 1991, **6**, 21.
[61] E. Królak, Pol. J. Environ. Stud., 2003, **6**, 713.
[62] K. Srogi, Bromatol. Chem. Toksykol., 2004, **37**, 291.
[63] E. Malzahn, Biuletyn Monitoringu Przyrody, 2001, **1**, 19.
[64] M. Ferdyn, Z. Strzyszcz, Arch. Ochr. Środ., 2002, **28**, 121.
[65] N. Carriõn, Z.A. Benzo, B. Moreno, Z. Fernandez, E.J. Eljuri, D. Flores, J. Anal. At. Spectrom., 1988, **2**, 813.
[66] N. Carriõn, Z.A. Benzo, B. Moreno, Z. Fernandez, E.J. Eljuri, D. Flores, J. Anal. At. Spectrom., 1988, **3**, 479.
[67] M. Nowak, S. Lidera, Arch. Ochr. Środ., 1980, **3–4**, 124.
[68] K. Sporek, Las Pol., 1988, **19**, 13.
[69] H. Górecka, Przem. Chem., 2003, **82**, 1081.
[70] A. Kabata-Pendias, H. Pendias, *Biogeochemia pierwiastków śladowych*, PWN, Warszawa 1999.
[71] B. Patkowska-Sokoła, H. Górecka, Z. Dobrzański, R. Popiołek, Chemia dla rolnictwa, seria: Konferencje, 1996, **45/26**, 368.
[72] J.C. Buckerfield, K.E. Lee, C.W. Davoren, J.N. Hannay, Soil Biol. Biochem., 1997, **29**, 547.
[73] J. Zheng, W. Goessler, W. Kosmos, R. Chem, G. Zhuang, K. Xu, G. Sui, J. Radioanal. Nucl. Chem., 1997, **233**, 149.
[74] C. Riquelme, A. Rojas, V. Florest, J. Correat, Marine Pollut. Bull., 1997, **34**, 816.
[75] K. Czarnowska, Acta Theriologic, 1988, **33**, 219.
[76] C.H. Walker, S.P. Hopkin, R.P. Silby, D.P. Peakall, *Podstawy ekotoksykologii*, PWN, Warszawa 2002.
[77] C. Emmerling, App. Soil Ecol., 2001, **17**, 91.
[78] D. Spurgeon, S.P. Hopkin, App. Soil Ecol., 1996, **4**, 147.
[78] J. Venkateswara Rao, P. Kavitha, A. Padmanabha Rao, Environ. Research, 2003, **92**, 271.
[80] B. Muys, Ph. Granval, Soil Biol. Biochem., 1997, **29**, 323.
[81] M.G. Paoletti, D. Sommaggio, M.R. Favretto, G. Petruzzelli, B. Pezzarossa, M. Barbafieri, App. Soil Ecol., 1998, **10**, 137.
[82] R. Lanno, J. Wells, J. Conder, K. Bradham, N. Basta, Ecotox. Envion. Safety, 2004, **57**, 39.
[83] S. Lau, M. Mohamed, Ch. Yen, S. Su'ut, Sci. Total Environ., 1998, **214**, 113.
[84] C. Gundacker, Environ. Pollut., 2000, **110**, 67.
[85] S. Haritonidis, P. Malea, Environ. Pollut., 1999, **104**, 365.
[86] M.-Ch Lin, Ch.-M. Liao, Aquaculture, 1999, **178**, 89.
[87] S. Mosulén, J. José Dominguez, J. Vigara, C. Vmlchez, A. Guiraum, J.M. Vega, Biomolecular Engineering, 2003, **20**, 199.
[88] P. Fong, K. Boyer, J.B. Zedler, J. Experimen. Marine Biol. Ecol., 1998, **231**, 63.
[89] M.S. Al-Masri, S. Mamish, Y. Budier, J. Environ. Radioactivity, 2003, **67**, 157.
[90] R. Villares, X. Puente, A. Carballeira, Environ. Pollut., 2002, **119**, 79.
[91] S. Haritonidis, P. Malea, Environ. Pollut., 1995, **89**, 319.
[92] M. Caliceti, E. Argese, A. Sfriso, B. Pavoni, Chemosphere, 2002, **47**, 443.
[93] R. Villares, X. Puente, A. Carballeira, Hydrobiologia, 2001, **462**, 221.
[94] N. Favero, F. Vattalini, D. Bertaggia, V. Albergoni, Arch. Environ. Cotam. Toxicol., 1996, **31**, 9.

[95] M.E. Conti, G. Cecchetti, Environ. Polutt., 2003, **93**, 99.
[96] J.O. Muse, J.D. Stripeikis, F.M. Fernández, L. d'Huicque, M.B. Tudino, C.N. Carducci, O.E. Troccoli, Environ. Pollut., 1999, **104**, 315.
[97] K. Chojnacka, A. Noworyta, Chemistry for agriculture. Czech-Pol-Trade. 2002. 2. 154.
[98] L. Frantsevich, A. Kornniushin, I. Pankov, E. Ermakov, T. Zakharchuk, Environ. Pollut., 1996, **94**, 91.
[99] J. Salánka, A. Farkas, T. Kamardina, K. Rózsa, Tox. Lett., 2003, **140-141**, 403.
[100] P. Ostapczuk, M. Burow, K. May, M. Froning, B. SüBenbach, E. Waidmann, H. Emons, Chemosphere, 1997, **34**, 2049.
[101] N. Lekouch, A. Sedki, S. Bouhouch, A. Nejmeddine, A. Pineau, J.C. Pihan, Sci. Total Environ., 1999, **243/244**, 323.
[102] K. Radomska, A. Graczyk, J. Konarski, Diag. Lab., 19991, **46**, 24.
[103] M. Schuhmacher, M. Bellés, A. Rico, J.L. Domingo J.L., Sci. Total Environ., 1996, **184**, 203.
[104] K. Srogi, Bromatol. Chem. Toksykol., 2005, **38**, 67.
[105] K. Radomska, A. Graczyk, J. Konarski, Biuletyn WAT, 1995, **44**, 143.
[106] M. Wilhelm, A. Pesch, U. Rostek, J. Begerov, N. Schmitz, H. Idel, U. Ranft, Sci Total Environ., 2002, **297**, 109.
[107] W. Wasiak, W. Ciszewska, A. Ciszewski, Anal. Chim. Acta, 1996, **335**, 201.
[108] J. Kałuża, M. Jeruszka, A. Brzozowska, Roczn. PZH, 2001, 52, 111.
[109] W. Zaborowska, J. Wierciński, Roczn. PZH, 1996, **47**, 217.
[110] W. Zaborowska, J. Wierciński, Roczn. PZH, 1997, **48**, 337.
[111] K. Srogi, Roczn. PZH, 2005, **56**, 189.
[112] J. Batista, M. Schuhmacher, J.L. Domingo, J. Corbella, Sci. Total Environ., 1996, 193, 143.
[113] T. Kozioł, *Analiza zawartości metali ciężkich we włosach jako biomarkera dla terenów rekreacyjnych*, praca doktorska, ŚLAM, Zabrze 1997.
[114] A. Teresa, S.D. Vasconcelos, M.F.T. Tavares, Sci. Total Environ., 1997, **205**, 189.
[115] S. D'illo, N. Violante, O. Senofonte, S. Caroli, Microchem. J., 2000, **67**, 343.
[116] M.D. Mingorance, M.L. Perez-Vazquez, M. Lachica, J. Anal. At. Spectrom., 1993, **8**, 853.
[117] H. Lippo, A. Särkela, At. Spectrosc., 1995, **7/8**, 154.
[118] Z. Zachwieja, M. Schlegel-Zawadzka, K. Zięba, Poziom kadmu i ołowiu we włosach dzieci wskaźnikiem zanieczyszczenia środowiska. Zagrożenia i stan środowiska przyrodniczego rejonu śląsko-krakowskiego, Wyd. SGGW-AR, Warszawa 1990.
[119] U.S. Department of Health and Human Service, Toxicological profile for chromium, Public Health Service Agency for toxic substance and Disease Registry, 1993, 95.
[120] U.S. Department of Health and Human Service, *Toxicological profile for cobalt*, Public Health *Service Agency for toxic substance and Disease Registry*, 1992, 30.
[121] R.H. Barckhavs, P.F. Schmidt, H.J. Höhling, Metal Ions Biol. Med., 1992, 2, 281.
[122] J. Chłopicka, P. Zagrodzki, Z. Zachwieja, Analyst, 1995, **5**, 120.
[123] E. Contiero, M. Folin, Biol. Trace Elem. Res., 1994, **40**, 151.
[124] R.S. Gibson, O.B. Martines, A.C. MacDonald, J. Geront., 1985, **40**, 269.
[125] N. Tsukada, A. Suchara, Jpn. J. Nutr., 1996, **54**, 33.
[126] A. Brzozowska, J. Sulkowska, *Mineral and trace element intake and status of Seneca participants in Poland*. Annual Meeting, *The role of Trace Elements for Health Promotion and Disease Prevention*, Kopenhaga, Dania, 1996.
[127] B. Papp, M. Rajczy, J. Hattori Bot. Lab., 1998, **84**, 81.
[128] J. Peñuelas, A. Ribas, B.S. Gimeno, I. Filella, Environ. Monit. Assess., 1999, **56**, 221.
[129] O. Rigina, A. Baklanov, O. Hagner, H. Olsson, Sci. Total Environ., 1999, **229**, 147.
[130] E. Steinnes, Sci., Total Environ., 1995, **160/161**, 243.

[131] Praca zbiorowa, red. F.R. Siegel, *Environmental geochemistry of potentially toxic metals*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York 2002.
[132] Praca zbiorowa, red. B.J. Alloway, D.C. Ayres, *Chemiczne podstawy zanieczyszczeń środowiska*, PWN, Warszawa 1999.
[133] E. Wahab Abd, A. Nada, A.S. Haleem Abdel, E. Zohny, Environ. Protec. Engineering, 2000, **26**, 5.
[134] J. Namieśnik, J. Łukasiak, Z. Jamrógiewicz, *Pobieranie próbek środowiskowych do analizy*, PWN, Warszawa 1995.

Praca wpłynęła do Redakcji 19 sierpnia 2005

WIADOMOŚCI chemiczne 2005, 59, 11-12
PL ISSN 0043-5104

FELIETON NAUKOWY

NOTATKI CHAOTYCZNE
LX. O POTRZEBIE LUZU

Ignacy Z. Siemion

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

Ignacy Z. Siemion, urodzony w 1932 r., ukończył studia chemiczne na Uniwersytecie Moskiewskim w 1955 r. Doktorat nauk technicznych na Politechnice Wrocławskiej – 1964. Doktor habilitowany nauk chemicznych – 1968. Profesor nadzwyczajny – 1974, profesor zwyczajny – 1981 Był kierownikiem Zakładu Chemii Organicznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego. Własne zainteresowania badawcze: chemia i stereochemia peptydów i białek. Wypromował 22 doktorów chemii, z których trzech się habilitowało. Autor 7 książek, 270 prac oryginalnych i ponad 100 artykułów przeglądowych oraz dotyczących historii nauki. W latach 1983–1994 Redaktor Naczelny „Wiadomości Chemicznych".

Praca dzisiejszego chemika coraz bardziej przypomina trud zawodowego sportowca. Ten ostatni wypacając nieomal na treningu z siebie duszę, ma (albo nie ma) za to chwilę uniesienia, kiedy zdarzy mu się wygrać zawody. Podobnie uprawiający sztukę badań naukowych: nie liczy czasu, nie oszczędza zdrowia, zaniedbuje żonę i dzieci, a wszystko dla ulotnej chwili naukowego zwycięstwa. A z jego pracy wyparowuje gdzieś i ginie codzienne zadowolenie, radość, jaką powinna ona dawać. Badacz, jak i zawodowy sportowiec, padają ofiarą przymusu osiągania „liczących się" wyników. Osobiście zawsze byłem zwolennikiem uprawiania badań na ten sposób, jaki cechuje w sporcie sportowca – amatora. Ale taka postawa w nauce zdaje się zanikać, i czy są szanse na jej powrót? Zdaje się, że przekreśla tę szansę dzisiejszy sposób finansowania badań. Ten, kto badania finansuje, żąda od nas zachowań „poważnych". Nie znosi „luzu", pewnego – wobec pracy badawczej – dystansu. Tymczasem poważne wyniki badawcze, ba, kluczowe często odkrycia, rodzą się przecież z przyczyn mało poważnych, często zabawowych niemal, jako wynik dobrego humoru odkrywcy. I tak było od prawieków, i to nawet z odkryciami o przeogromnym cywilizacyjnym znaczeniu.

Nie da się na przykład zaprzeczyć, że do takich odkryć należało opanowanie przez ludzi procesów metalurgicznych. Jak wiadomo, ślady obróbki miedzi sięgają dziesięciu tysięcy lat przed naszym czasem. Ale przez długie wieki, bo przez cztery tysiące lat, z miedzi wyrabiano wyłącznie ozdoby i zabawki [1]. A więc potrzeby estetycznej natury i chęć sprawienia radości dzieciom wyprzedzały inne, „mądrzejsze" aplikacje tego odkrycia.

Podobnie było z metalurgią żelaza. Był to dla naszych praprzodków dar niebios. Najpierw poznali żelazo meteorytyczne. O jego niebiańskim pochodzeniu świadczą najstarsze nazwy metalu. Sumeryjska nazwa żelaza to AN-BAR („metal-gwiazda"), a egipska BIZ-N. PT („metal z nieba"). Nawet starogreckie słowo SIDEROS – żelazo – kojarzono dawniej z łacińskim SIDUS, co oznaczało gwiazdę. Ten niebiański metal uzyskał więc w kulturach starożytnych wartość sakralną. Jeśli zaś chodzi o pierwsze zastosowania żelaza, to pojawiło się one w kulturze materialnej społeczności starożytnych w postaci ornamentów, amuletów i statuetek [2].

Albo weźmy inne, pierwszorzędnego znaczenia odkrycie. Odkrycie i zastosowanie koła. Wynalezione i to kilkakrotnie i w różnych miejscach w Eurazji, było też znane kulturze Azteków. Ale tam było użyte jedynie do wyrobu zabawek dziecinnych. Aztekowie nie zastosowali koła w transporcie. Jak się przypuszcza, powodem tego był brak na ich kontynencie udomowionych wielkich ssaków, które mogły by być wykorzystane jako zwierzęta pociągowe [3]. Ale przecież transportowe możliwości ludzi też by wzrosły, gdyby umieli się posłużyć odpowiednimi urządzeniami.

Ale porzućmy zamierzchłe czasy i spójrzmy na te, kiedy rodziły się badania naukowe, a więc przenieśmy się do czasów baroku. Ileż zabaw i zabawek dla gminu i możnych wymyślono wtedy, gdy w całej Europie i nawet za Oceanem rozwinęły się badania nad elektrycznością statyczną! Ich echa odnajdziemy jeszcze w „Krakowiakach i góralach", wodewilu Wojciecha Bogusławskiego [4]. Inna rzecz, że takie wykorzystanie zdobyczy nauki bardziej przypomina mi swojego rodzaju zabawy

mojego przyjaciela, Zenka Radziwolskiego, w czasie licznych zajęć popularyzatorskich, jakie były jego udziałem. Był on biologiem z wykształcenia, a filozofem z zawodu wykonywanego, zajmował się religioznastwem, no i jak powiedziałem, działalnością popularyzatorską. Występując więc przed młodzieżą szkolną lubił on na przykład dokonywać przemiany „wody w mleko" (przez strącenie siarczanu wapnia z roztworu jego chlorku), albo „wody w krew" (przez dodanie fenoloftaleiny do roztworu zasady). Ale największym jego wyczynem był sprawdzian dojrzałości uczestników wakacyjnego kursu religioznawczego, jaki prowadził gdzieś w Zielonogórskiem. Postanowił w czasie tzw. zielonej nocy postraszyć „duchami" kobiecą grupę kursantów. Wyprosił więc u mnie laskę białego fosforu, a u naszego wspólnego przyjaciela, antropologa, czaszkę ludzką. Podobno dwie uczestniczki kursu doznały ataku histerii, patrząc jak w nocy, na ścianie znajdującej się w tamtejszym parku starej wieży, podryguje świecąca fosforycznym blaskiem czaszka. A to oczywiście mój Zenek potrząsał czaszką, uwiązaną na sznurze.

No, ale do rzeczy. Liczne odkrycia chemiczne też zachowały ślady ich mało poważnych początków. Weźmy na przykład XVIII-wieczne badania pani Fulhame nad wybarwianiem jedwabiu koloidalnymi zawiesinami metali, przede wszystkim złota i srebra. Pisał o nich w swoim czasie Jan Zawidzki [5]. Zamiarem pani Fulhame było opracowanie metody złocenia, bądź posrebrzania tkanin. W tym celu skrawki jedwabnej materii nasycała roztworami soli metali, np. chlorku złota, a potem poddawała je działaniu czynników redukujących, takich jak po prostu gazowy wodór, albo eterowy roztwór fosforu. Wodór wybarwiał wysycony solą złota jedwab początkowo na kolor zielony, który przechodził w niebieski a następnie purpurowy. Jak zauważyła eksperymentatorka, obecność wody sprzyjała przekształceniom. Podobne zmiany powodowało działanie fosforu. Płat jedwabiu wybarwiał się na zielono i przez oliwkowy i niebieski zabarwiał na kolor purpurowy. Jak zauważył Zawidzki było to w gruncie rzeczy równoznaczne z opracowaniem metody redukcyjnego uzyskiwania koloidalnych rozczynów metali! A zaczęło się to wszystko od jakże kobiecej chęci wynalezienia sposobu pozłacania i posrebrzania tkanin!

Metoda uzyskiwania koloidalnych roztworów złota przy użyciu eterowego roztworu fosforu była następnie (1857) doskonalona przez Faradaya a ostateczny kształt nadał jej u progu XX wieku (1905) R. Zsigmondy. Ten sam uczony, który za prace nad metodami otrzymywania koloidalnych roztworów metali oraz ich przyrodą uzyskał Nagrodę Nobla (1924).

Podobnej, estetycznej natury względy stały u początków chromatografii bibułowej. Dodajmy już na wstępie, że sam termin „chromatografia" zrodził się zresztą nie na polu badań naukowych, a właśnie w obrębie sztuk pięknych. Słowo to zostało użyte jako tytuł wydanej w 1836 roku książki o sztuce malarskiej.

Za prekursora chromatografii bibułowej uważają niektórzy Friedlieba Ferdynanda Rungego (1795–1867). Runge zapisał się w historii chemii organicznej odkryciem kofeiny (1819), którą wydzielił z kawy *Caffea arabica L.*, a także wydzieleniem fenolu i aniliny ze smoły pogazowej (1834). Już jako bez mała 60-latek

wydał książkę pt. *Bildungstrieb der Stoffe Veranschaulicht in selbstandig gewachsenen Bilder* (Oranienburg 1855). W książce tej zebrał wyniki swoich prób wytwarzania przy użyciu chemikaliów „samoistnie powstających obrazów" a książkę zilustrował licznymi ich przykładami. Swoje obrazy otrzymywał uczony nakraplając w określonym porządku na środek arkusza bibuły roztwory odpowiednich odczynników chemicznych. Na załączonym rysunku przedstawiamy jeden z obrazów Rungego. Do jego otrzymania użyto roztworu siarczanów manganu i miedzi oraz wodorotlenku potasu. Prace Rungego nie miały jakichś celów badawczych. Była to raczej zabawa starszego pana, poszukującego odprężenia po latach trudów laboratoryjnych. Oczywiście nie rozpoznał on możliwości analitycznego zastosowania tej techniki. Ale jest faktem, że do swoich „nakropleń" używał też soków roślinnych, atramentów i barwników. Nie można mu więc odmówić roli swojego rodzaju prekursora techniki chromatografii bibułowej [6]. Swoje chemiczne obrazy Runge zaprezentował światu w 1855. Niemal w sto lat później (1952) A.J.P. Martin i R.L.M. Synge otrzymali Nagrodę Nobla za opracowanie metod chromatograficznego rozdziału związków chemicznych.

Rysunek 1 Obraz utworzony na bibule przez kolejne nakroplenie
1) roztworu siarczanu miedzi i manganu
2) roztworu KOH

O znaczeniu dla społeczności ludzkiej odkrycia technik fotograficznych nie ma co się nawet rozwodzić. A początki odkrycia też przecież można uznać za niepoważne. Ciemnienie chlorku srebra pod wpływem promieni słonecznych było znane bodaj jeszcze alchemikom. Pierwszy ślad wykorzystania tego zjawiska do wytwarzania obrazów znaleziono w pracach Schultzego, lekarza w Hale. Wpadł on (było to w roku 1727) na pomysł, by na świeżo strąconym osadzie chlorku srebra układać wycięte z papieru litery. Pod wpływem światła słonecznego tło tych liter ciemniało i ukazywały się na nim ułożone z tych liter białe napisy. Ich żywot był oczywiście krótki, ale takie znikające napisy mogły przecież zdumiewać świadków doświadczeń. Prawdziwą odbitkę obrazu otrzymał 112 lat później Talbot. Na arkuszu papieru uzyskiwał on warstewkę chlorku srebra, po czym kładł na nim wykonany na przezroczystym podłożu rysunek. Po wystawieniu na światło na arkuszu pojawiał się negatyw rysunku. Zasługą Talbota było wynalezienie sposobu utrwalania negatywu. Osiągał to traktując negatyw wrzącym roztworem soli kuchennej. W tych warunkach dochodziło do usunięcia nie przereagowanego chlorku srebra z powierzchni arkusza. Powtórzenie operacji przy użyciu negatywu jako wzorca pozwalało otrzymać pozytywowe odbicie wyjściowego rysunku [7].

Wypisywanie takich zanikających na słońcu napisów na pewno wywoływało zadziwienie obserwatorów ale i zgorszenie poważnych ludzi, że niby po co zajmować się czymś tak niepoważnym. Myślę sobie nawet, że z takiego zgorszenia mogło się rodzić przekonanie, wyrażone wiele wieków przedtem przez Św. Augustyna, który twierdził, iż „głupstwa dorosłych nazywa się zajęciami" [8]. Ale nawet higiena pracy badawczej wymaga przecież określonego luzu i poczucia swobody, wyrażającej się w uwolnieniu świadomości badacza od konieczności dokonania odkrycia. O tym zaś wiedzą dobrze badacze, zwłaszcza ci najwięksi. Chciałbym tu przytoczyć fragment autobiografii R.P. Feynmana, fizyka-Noblisty, który umiał na swoją pracę patrzeć z takiego właśnie dystansu. Czasy wojenne skierowały go do Los Alamos, do pracy nad bronią jądrową. Wyrwał się stamtąd, jak tylko skończyła się wojna i został profesorem fizyki w Cornell University w Ithace. Czuł się wtedy gruntownie wyjałowiony z jakiegokolwiek zapału badawczego.

„Przyjąłem więc – wspominał – nową postawę. Skoro nie mogę tego zmienić, że jestem wypalony i nigdy nic nie osiągnę, a mam tę ciepłą posadkę na uniwersytecie, uczenie studentów sprawia mi przyjemność i lubię czytać *Baśnie z tysiąca i jednej nocy*, będę się bawił w fizykę, kiedy mi przyjdzie na to ochota, nie zastanawiając się, czy ma to jakieś znaczenie dla świata. Kiedy mniej więcej tydzień później siedziałem w kafeterii, jakiś facet rzucił w powietrze talerz. Gdy talerz leciał przez salę, zauważyłem, że ma bicie podłużne i że czerwony herb uniwersytetu obraca się. Było dla mnie oczywiste, że jeden obrót herbu trwa krócej niż jedna faza bicia. Nie miałem nic innego do roboty, więc zacząłem obliczać ruch obracającego się talerza. Odkryłem, że jeżeli kąt bicia jest bardzo niewielki, herb obraca się dwa razy szybciej niż bicie – stosunek dwa do jednego. Wyszło mi tak z bardzo skomplikowanego równania! Pomyślałem sobie: „Czy mogę znaleźć jakąś bardziej podsta-

wową przyczynę – na przykład siły, jakie działają na talerz – dla której ten stosunek wynosi dwa do jednego?" Do dziś pamiętam, że poszedłem do Hansa Bethego i powiedziałem:

– Hej, Hans! Zauważyłem ciekawą rzecz. Jak się talerz obraca, wychodzi dwa do jednego, bo... – pokazałem mu przyspieszenia.

– To dość interesujące, Feynman, ale co z tego wynika, co? Po co to robisz?

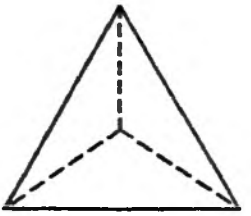
– Nic z tego nie wynika. Robię to tylko dla zabawy. – Jego reakcja nie zniechęciła mnie; miałem postanowienie, że będę się bawił fizyką i robił to, na co mi przyjdzie ochota.

Nie przestałem pracować nad równaniami bicia. Potem pomyślałem o tym, jak przemieszczają się orbity elektronów w teorii względności. Potem pojawiło się równanie Diraca z elektrodynamiki. Potem elektrodynamika kwantowa. Zanim się obejrzałem (stało się to bardzo szybko), „bawiłem się" tym samym starym problemem, który mnie tak bardzo cieszył, nad którym przestałem pracować, gdy pojechałem do Los Alamos: znowu miałem do czynienia z tymi staroświeckimi, cudownymi problemami, nad którymi siedziałem do dyplomu" [9].

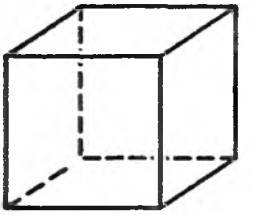
(Wspomniane w tekście „bicie", w oryginale *wobbling*, to bicie osiowe, tj. chybotanie obiektu).

Jak mi się wydaje, nic innego jak dojmująca potrzeba pewnego luzu, rodzi we współczesnych badaniach chemicznych takie objawy, jak np. wymyślanie żartobliwych skrótów dla nazw obiektów badawczych, albo technik eksperymentalnych. Nie tak dawno, przeglądając piśmiennictwo z interesującej mnie dziedziny, napotkałem skrót MIDAS. Przywołuje on natychmiast postać znanego ze szkolnej mitologii króla Frygów, tak bardzo doświadczonego przez Dionizosa. A oznacza metal ion dependent adhesion site pewnego białka receptorowego. Mitologia dostarczała niegdyś gotowych kryptonimów dla utajnianych w ten sposób substancji alchemików. I tak, np. słowo KRONOS było jednym z kryptonimów ołowiu. Łatwo tu dostrzec odniesienie do roli ołowiu w procesach kupelacji. Ten dawny bóg starożytnych Greków zjadał swoje dzieci, tak jak ołów zanieczyszczenia metali szlachetnych. Co tu może zadziwić, to dzisiejszy nawrót do tej starej nazewniczej opcji. Jej ponowne pojawienie.

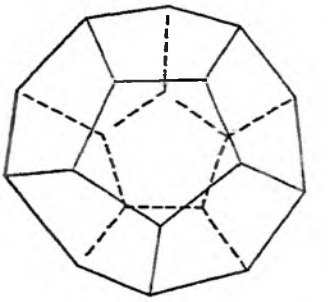
Takie żartobliwe skróty występują i w innych, niż chemia, gałęziach współczesnej nauki. Pulsary odkryto nie tak dawno, śledząc nadchodzące z kosmosu regularne impulsy radiowe. Ich regularność mogła sugerować działanie jakichś kosmicznych inteligencji. Obiekty, wysyłające te sygnały określono więc skrótem LGM (ang. *little green man*), a dopiero później nazwano pulsarami (ang. *pulsing radio sources*). Niekiedy terminy wymyślone dla ośmieszenia jakiejś teorii przyjmują się jako te właściwe. Tak było z powszechnie przyjętą nazwą „teoria wielkiego wybuchu". Termin ten wymyślił brytyjski kosmolog, F. Hoyle. Był zwolennikiem teorii stanu stacjonarnego Wszechświata i terminem tym chciał właśnie ośmieszyć prace o Kosmosie wyłaniającym się z wielkiego prawybuchu. Ale cóż, termin przyjął się, jako dobrze opisujący przewidywany stan rzeczy [10].



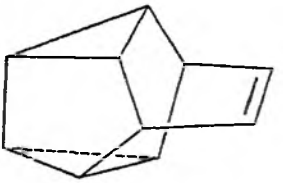
tetraedran



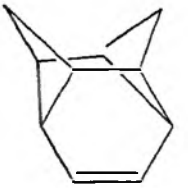
kuban



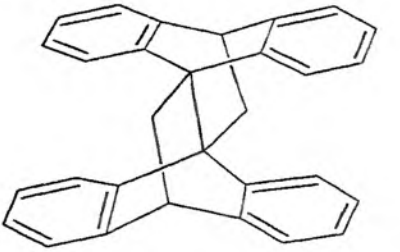
dodekaedran



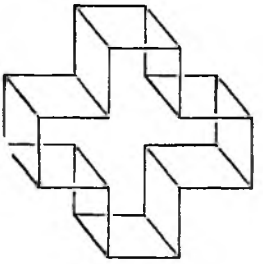
snouten



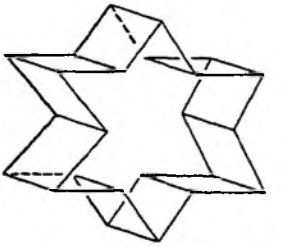
felicen



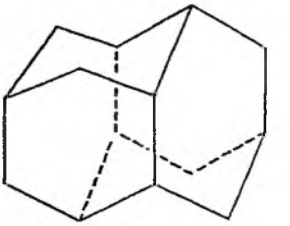
lepidopteren



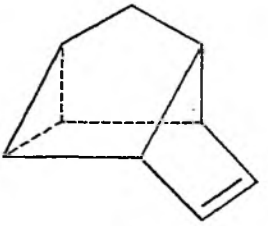
helwetan



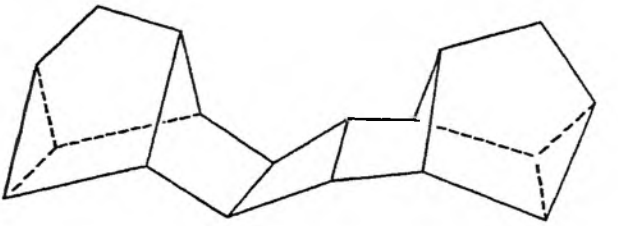
izraelan



kongresan



george



bigeorge

Resztki poczucia humoru chemików kryją się też w pełnych nazwach związków chemicznych [11]. W jednej z wcześniejszych notatek pisałem o kongresanie (patrz Rys.), węglowodorze zawdzięczającym swe istnienie inwencji grafika, projektującego okładkę do tomu materiałów 19 Kongresu IUPAC w Londynie (1963). Można tu przytoczyć wiele podobnie wytworzonych nazw. Pochodzących np. od kształtu cząsteczek: tetrahedran, kuban, dodekahedran, fuleren, ale i takie jak lepidopteren (Lepidoptera to motyle), felicen (od ang. *feline* – kotowate), i snouten (od ang. *snout* – ryj). Albo wytworzonych od symboli państw: helwetan i izralean. I wreszcie nawet takie jak george (deltacyklen) i bigeorge. Któż zgadnie, jaki to przyjaciel badacza został uwieczniony w tych nazwach? Kto wie, być może nazewnictwo chemiczne to ostatnie schronienie dla poczucia humoru chemików.

W tym wypędzaniu poczucia humoru, i w ogóle, luzu z badań naukowych, wielki udział mają sponsorzy nauki. Przydzielający środki na badania decydenci nie znoszą, by z nauki „robiono sobie żarty" i zwykli bezwzględnie eliminować zartownisiów. Albo ludzi przedstawiających „zwariowane" tematy. Bo pieniądz musi być wydatkowany z należytą powagą. Sami zaś często dokonują wyborów jak najgorszych. Jakież to sumy, i przez ile wieków wydawano np. na uparte próby przekształcenia nieszlachetnych metali w złoto. Nikt inny, jak dwory panujących, finansowały tę obłędną robotę. Albo w naszych już czasach. Czy ktoś policzył sumy wydane, nie tylko przecież przez mocarstwa światowe, na wytworzenie broni jądrowych? No tak, ale to były z punktu widzenia władców poważne cele.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

[1] R. Rudgley, *Zaginione cywilizacje epoki kamienia*, Amber, Warszawa 1999, s. 151.

[2] M. Eliade, *Kowale i alchemicy*, Aletheia, Warszawa 1993, s. 20.

[3] J. Diamond, *Strzelby, zarazki, maszyny. Losy ludzkich społeczeństw*, Warszawa 2000, s. 287.

[4] M. Klimowicz, I.Z. Siemion, *Echa krakowskie w Cudzie mniemanym Bogusławskiego. Bardos i machina elektryczna*, Rocznik Tow. Lit. im. A. Mickiewicza, 1997, **32**, 73–88.

[5] J. Zawidzki, *Badania pani Fulhame nad procesami odtleniania*, [w:] *Szkice biograficzne*, PWN, Warszawa 1959, s. 230–243.

[6] V. Koppe, F.F. *Runge und die Entdeckung der Chromatographie*, Kontakte, Merck, 1985 I, 49–51.

[7] F. Lasser-Cohn, *Chemia życia codziennego*, T. 1, Warszawa 1900, s. 99–100.

[8] Aureliusz Augustyn, *Wyznania*, PAX, Warszawa 1987, s. 18.

[9] R.P. Feynman, *„Pan raczy żartować, panie Feynman?" Przypadki ciekawego człowieka*, Wyd. Znak, Kraków 1996, s. 176–177.

[10] Dane te zaczerpnąłem z książki: M. White, J. Gribbin, Stephen Hawking, *Życie i nauka*, WNT, Warszawa 1994.

[11] W.V. Metanomski, *Unusual names assigned to chemical substances*, Chem. Intern., 1987, 9, 211–216.

WIADOMOŚCI chemiczne 2005, 59, 11-12
PL ISSN 0043-5104

KRONIKA

ROBERT NOWAKOWSKI LAUREATEM NAGRODY IM. JANA POPIELAWSKIEGO I PIOTRA MODRAKA

Z inicjatywy grona przyjaciół przedwcześnie zmarłych wybitnych fizykochemików **Jana Marii Popielawskiego i Piotra Modraka,** utworzona została nagroda ich imienia. Nagrodę ufundowała Fundacja BRE-Banku w Warszawie. Celem tej Nagrody jest upamiętnienie osiągnięć naukowych, organizacyjnych i dydaktycznych Zmarłych uczonych oraz promocja w Instytucie Chemii Fizycznej PAN badań teoretycznych przez nich uprawianych. Szczegółowe informacje o dorobku naukowym, dydaktycznym i organizacyjnym Zmarłych J. Popielawskiego i P. Modraka można znaleźć w literaturze [1–6]. Na posiedzeniu w dniu 14–12 2005, w roku Jubileuszu 50-lecia Instytutu, Kapituła Nagrody przyznała nagrodę za rok 2005 Robertowi Nowakowskiemu, w uznaniu wybitnych osiągnięć naukowych w badaniach dyfuzji, samoorganizacji warstw adsorbatu, reorganizacji powierzchni indukowanej adsorbatem, i reakcji powierzchniowych.

Dr inż. Robert Nowakowski

Poprzednio, Nagrodę otrzymali: Jerzy Górecki za 2000 r., Andrzej Lech Kawczyński za 2002 r., Bogdan Nowakowski za 2004 r.

Dr inż. Robert Nowakowski rozpoczął pracę w IChF PAN w 1986 r., po ukończeniu studiów na Wydziale Fizyki Technicznej i Matematyki Stosowanej Politechniki Warszawskiej. W 1992 r. otrzymał tytuł doktora nauk chemicznych na postawie rozprawy doktorskiej – wykonanej pod kierunkiem prof. J. Lipkowskiego – na temat optymalizacji rozdzieleń w wysokosprawnej chromatografii cieczowej metodą symulacji komputerowej. Rozprawa ta została wyróżniona przez Radę Naukową IChF. Od 1994 r. aktywność badawcza Roberta Nowakowskiego skupia się wokół nowoczesnych metod mikroskopii tunelowej (STM) i sił atomowych (AFM). Od 2000 r. jest pracownikiem zorganizowanego przez prof. J. Popielawskiego Zakładu Dynamiki Chemicznej, aktualnie kierowanego przez prof. R. Dusia. Dr Nowakowski uruchomił w IChF pierwszy w Kraju komercyjny mikroskop STM/AFM. Aktywnie uczestniczy w organizacji i badaniach Pracowni Mikroskopii. W roku 2005 zakończył z sukcesem przewód habilitacyjny przed Radą Wydziału Fizyki i Astronomii Uniwersytetu Wrocławskiego.

Zainteresowania Roberta Nowakowskiego skierowane są na obserwację *in situ* przebiegu różnorodnych procesów powierzchniowych i reakcji przebiegających na powierzchniach metali, w tym procesów prowadzących do samoorganizacji cienkich warstw cząsteczek organicznych na metalach [7], procesów tworzenia i rozkładu stopów metali [8], oraz, aktualnie, procesu tworzenia i rozkładu wodorków metali [9]. W większości przypadków procesy te obserwowane są z rozdzielczością cząsteczkową lub mezoskopową. Dostarczają cennych informacji o przebiegu procesów i zjawisk im towarzyszących. Przykładowo, badania *in situ* dyfuzji cząsteczek półprzewodnika organicznego na metalach unaoczniają towarzyszącą tej dyfuzji reorganizację atomów podłoża metalicznego. Ten eksperymentalny rezultat ma ścisły związek z pracami teoretycznymi prof. J. Popielawskiego nad szybkością reakcji i procesów transportowych w nierównowagowych układach chemicznych. Zainteresowania dr Nowakowskiego obejmują również układy biologiczne [10]. Dr Nowakowski był stypendystą Fundacji A. Humboldta w Niemczech i The Royal Society w Wielkiej Brytanii. Fundacja Humboldta obdarowała go mikroskopem tunelowym, który jest wykorzystywany w Pracowni Mikroskopii. Dr Nowakowski jest autorem 47 publikacji w czasopismach o zasięgu międzynarodowym.

Prof. dr hab. A. Jabłoński

Przewodniczący Kapituły Nagrody,
Dyrektor IChF PAN, Warszawa

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

[1] P. Modrak, M. Janik-Czachor, Wiad. Chem., 1992, **46**, 601.
[2] S. Olszewski, ibid., 1999, **53**, 7.
[3] Acta Phys. Pol. B, 1992, **23**, 175.
[4] G. Nicolis, S.A. Rice, Physics Today, 1992, **45**, 108.
[5] S. Olszewski, Orbital, 1999, **3/99**, 188.
[6] A.S. Cukrowski, J. Górecki, A.L. Kawczyński, B. Nowakowski, [w:] *Far-From-Equilibrium Dynamics of Chemical Systems*, Eds: J. Górecki *et al.*, World Scientific, Singapore, 1994, s. 1.
[7] R. Nowakowski, C. Seidel, H. Fuchs, Phys. Rev. B, 2001, **63**, 195418, Surf. Sci., 2004, **562**, 53.
[8] R. Nowakowski, J. Pielaszek, R. Duś, Applied Surf. Sci., 2002, 199, 40.
[9] R. Nowakowski, R. Duś, Langmuir, 2003, **19**, 6750.
[10] R. Nowakowski, P. Luckham, P. Winlove, Biochem. Biophys. Acta, 2001, **1514**, 170.

WIADOMOŚCI 2005, 59, 11-12
chemiczne PL ISSN 0043-5104

NOWE WYDAWNICTWA

Andrzej Cygański, ***Chemiczne metody analizy ilościowej***, wydanie szóste uzupełnione, Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa 2005.

Do kolejnej edycji tego bardzo popularnego wśród studentów podręcznika dodano nowy, obszerny rozdział pt. „Kierunki rozwojowe współczesnej chemii analitycznej" i jest to rozszerzenie potrzebne i uzasadnione.

Książkę wydano jak zawsze starannie, ale – co było też wadą poprzednich wydań – oszczędzono na twardej oprawie. Tymczasem znaczna objętość (ponad 600 stron) w połączeniu z klejonym grzbietem i miękką okładką nie wróży podręcznikowi długiego życia w rękach studenta, zwłaszcza w laboratorium chemicznym.

Wielka szkoda, że uwagi niżej podpisanego umieszczone w recenzji poprzedniego wydania nie zostały wzięte pod uwagę przez Autora. W efekcie liczne, drobne ale irytujące nieścisłości czy niedociągnięcia z poprzedniego wydania znajdziemy także w obecnym. Dwa tylko przykłady: 1) nie wiedzieć jednak czemu nadal obszernie omawia się wagi periodyczne, co jest oczywistym anachronizmem, skoro w praktyce laboratoryjnej takich wag się już nigdzie chyba nie używa, 2) kolejnym, zabawnym anachronizmem jest choćby pierwsze cytowanie (dokument pt. „Stan i prognozy rozwojowe chemii analitycznej w Polsce" z roku 1973 i jego odpowiednik z 1986). Radziłbym więc przejrzeć i zaktualizować podaną literaturę przedmiotu.

Po każdej części teoretycznej, ilustrowanej przykładami rachunkowymi, następuje część praktyczna (w tym szczegółowe przepisy wybranych analiz), zaś rozdziały kończą przykładowe zadania i zagadnienia. Zakres materiału i liczba zadań są całkowicie wystarczające dla studentów wydziałów chemicznych uniwersytetów i politechnik, choć w popularnym podręczniku Galusa[1] zadań znajdziemy więcej. Podoba mi się też, choć może jestem w tym poglądzie odosobniony, że nie podano rozwiązań zadań, oczywiście z wyjątkiem zadań przykładowych.

Warto poświęcić kilka słów rozdziałowi szóstemu, stanowiącemu istotną nowość i ważne rozszerzenie. Poświęcono go zagadnieniom analizy śladowej, specjacji oraz zagadnieniom związanym z analizami środowiskowymi. Ograniczenie objętości tego nowego rozdziału spowodowało, że jest on właściwie spisem definicji i zbiorem skrótowych, niemal encyklopedycznych wiadomości, ale w podręczniku tego rodzaju – adresowanym głównie do studentów 2. czy 3. roku studiów chemicznych – jest to zaleta, a nie wada. Nie można też nie zauważyć rozszerzenia rozdziału piątego o nowoczesne techniki ekstrakcji.

[1] *Ćwiczenia rachunkowe z chemii analitycznej*, praca zbiorowa pod red. Z. Galusa, wydanie piąte, PWN, Warszawa 1994.

Wszystko to, a także połączenie w jednym tomie zagadnień praktycznych i teoretycznych sprawia, że podręcznik Cygańskiego stanowi interesującą pozycję na polskim rynku książek z zakresu chemii analitycznej i jest ze wszech miar godny polecenia.

Ponawiam jednak sugestię by starannie zrewidować tekst przed następnym wydaniem. Chodzi tu nie tylko o niedociągnięcia i błędy powtarzane w kolejnych edycjach, ale też o czytelność niektórych wywodów teoretycznych. Niezależnie od tego uważam, że *Chemiczne metody analizy ilościowej* stanowią cenną pomoc dydaktyczną i warto je zalecać studentom, uczęszczającym na wykłady i wykonującym ćwiczenia z ilościowej analizy chemicznej.

Jacek Gliński

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

Nomenklatura steroidów (Zalecenia 1989), tłum. J.W. Morzycki i W.J. Szczepek, cena 3 zł

Nomenklatura chemii nieorganicznej. Zalecenia 1990, red. Z. Stasicka, cena 25 zł

Z. Kluz, M. Późniczek, *Nomenklatura związków chemicznych. Poradnik dla nauczycieli*, cena 10 zł

Podstawowa terminologia stereochemii oraz Słownik podstawowych terminów w nauce o polimerach. Zalecenia 1996, red. O. Achmatowicz, B. Szechner i P. Kubisa, cena 12 zł

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

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

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

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

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

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

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

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

Bibliografia „Wiadomości Chemicznych" za lata 1988–1997, cena 3 zł.

Książki wysyłamy na koszt zamawiającego. Zamówienia prosimy kierować pod adresem: Redakcja „Wiadomości Chemicznych", ul. F. Joliot-Curie 14, 50-383 Wrocław. Opłaty należy wnosić na konto: BPH SA I O/Wrocław, Redakcja „Wiadomości Chemicznych", NRB 83 1060 0076 0000 3200 0040 0597.

REGULAMIN DLA AUTORÓW

„Wiadomości Chemiczne" publikują artykuły referatowe, nie oryginalne prace doświadczalne, dotyczące wszystkich dziedzin chemii i nie drukowane przedtem w innych czasopismach. Artykuły publikowane w „Wiadomościach Chemicznych" nie mogą być bez zgody Redakcji drukowane w innych czasopismach. Treść artykułów powinna odpowiadać stanowi wiedzy w chwili pisania artykułu. Piśmiennictwo cytowane powinno uwzględniać najnowsze prace krajowe i zagraniczne z dziedziny, której dotyczy artykuł.

Maszynopisy (wydruki komputerowe) należy nadsyłać Redakcji w **dwóch egzemplarzach**: oryginał i kopia lub kserokopia pisana jednostronnie, z zachowaniem podwójnej interlinii i marginesu szerokości 5 cm z **prawej** strony; pierwszy wiersz akapitu należy zaznaczyć wcięciem na 5 uderzeń w klawisz.

Na pierwszej stronie pod tytułem polskim należy umieścić tytuł w języku angielskim, adres autora oraz spis rozdziałów. Praca powinna zawierać obszerne streszczenie w języku angielskim (do 1,5 strony maszynopisu z cytowaniem piśmiennictwa i odsyłaczami do tabel i rysunków w tekście). Na osobnej kartce prosimy o krótką (do 150 wyrazów) notkę z informacją o uprawianej przez Autora tematyce naukowej i przebiegu pracy. Prosimy o podanie tytułu naukowego i miejsca pracy oraz o dołączenie aktualnego zdjęcia. Przysłanie tych informacji będziemy traktować jako zgodę na ich publikację.

Artykuły należy opracowywać zwięźle i nie zamieszczać szczegółów, odsyłając czytelnika do piśmiennictwa oryginalnego. Maszynopis nie powinien przekraczać 25 stron wraz z tabelami i wykazem piśmiennictwa lub 100 stron, jeśli jest monografią przeznaczoną do druku w „Bibliotece Wiadomości Chemicznych". Artykuły powinny być napisane za pomocą komputera. Redakcja prosi o dołączenie dyskietki z tekstem pracy i ilustracjami wraz z wyczerpującą informacją o używanym edytorze. Pożądany edytor Word (co najmniej wersja 6).

Rysunki (mogą być kolorowe, ale za dopłatą do druku) należy nadsyłać w dwóch egzemplarzach (oryginały i kopie lub kserokopie). Oryginały rysunków muszą mieć taką formę graficzną, by nadawały się do reprodukcji. Na odwrotnej stronie należy podać ołówkiem nazwisko autora i numer rysunku i ten sam numer zaznaczyć w odpowiednim miejscu maszynopisu. Na osobnym arkuszu dołączyć podpisy pod rysunki. **Wzory chemiczne i schematy reakcji chemicznych**, których nie można w prosty sposób napisać na maszynie lub komputerze, powinny być wpisane ręcznie, w odpowiednich miejscach tekstu. Niezależnie od tego **do pracy należy dołączyć jeden komplet wzorów i schematów narysowanych oddzielnie w formie nadającej się do reprodukcji.**

Tabele należy ponumerować cyframi arabskimi oraz podać ich tytuły.

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

O przyjęciu pracy do druku decyduje Komitet Redakcyjny. **Maszynopisy nie odpowiadające podanym warunkom nie będą przez Komitet rozpatrywane.** Artykuły nie zakwalifikowane do druku Redakcja zwraca, zachowując kopię maszynopisu. Autorzy przeprowadzają jedną korektę tekstu. Po zakwalifikowaniu pracy do druku nie będą uwzględniane żadne poprawki rysunków.

Honoraria za wydrukowane prace są wypłacane wyłącznie tym Autorom, których artykuły zostały zamówione przez Redakcję. Autorzy wydrukowanych prac otrzymują bezpłatnie 20 nadbitek.

DO CZYTELNIKÓW „WIADOMOŚCI CHEMICZNYCH"

Redakcja miesięcznika PTCh „Wiadomości Chemiczne" zawiadamia, ze wysokość prenumeraty rocznej „Wiadomości Chemicznych" za 2006 r. wynosi 120 zł dla instytucji i nie zrzeszonych prenumeratorów indywidualnych oraz 60 zł dla bibliotek szkół średnich i podstawowych. Należność za prenumeratę prosimy przekazywać na konto:

Bank Przemysłowo-Handlowy S.A.
Oddział we Wrocławiu
pl. Powstańców Śl. 9, 53-316 Wrocław
Redakcja „Wiadomości Chemicznych"
NRB 83 1060 0076 0000 3200 0040 0597

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

– prenumerata „Wiadomości Chemicznych" na rok 2006 wraz ze składką członkowską, w ramach której dostarczany jest „Orbital", wynosi 60 zł (składka – 50 zł, prenumerata – 10 zł);

– emeryci, doktoranci oraz studenci płacą 25 zł (składka – 15 zł, prenumerata – 10 zł); a nauczyciele szkół średnich i podstawowych płacą 30 zł (składka – 20 zł, prenumerata – 10 zł).

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

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

Redakcja „Wiadomości Chemicznych"

WIADOMOŚCI 2005, 59, 11-12
chemiczne PL ISSN 0043-5104

SPIS TREŚCI

Ryszard ŁAŹNY, Małgorzata ŁAPIŃSKA, Michał SIENKIEWICZ: Narzędzia chemii kombinatorycznej. Cz. 3. Reakcje w syntezie organicznej na fazie stałej 881
Jakub FERENC, Katarzyna KIEĆ-KONONOWICZ: Pegylacja – metoda zmiany właściwości leków polipeptydowych, substancji biologicznie aktywnych 953
Agata BAHYRYCZ, Danuta KONOPIŃSKA, Katarzyna SZYMANOWSKA: Peptydy sygnałowe roślin 981
Krystyna SROGI: Przegląd stosowanych bioindykatorów do monitorowania skazenia środowiska przyrodniczego 1001

Felieton naukowy
Ignacy Z. SIEMION: Notatki chaotyczne. LX. O potrzebie luzu 1023

Kronika 1033

Nowe wydawnictwa 1037

W NASTĘPNYM ZESZYCIE UKAŻĄ SIĘ:

Profesor Bogdan Marciniec – 65-lecie urodzin
Katarzyna ŚLEPOKURA, Tadeusz LIS: Fosforan dihydroksyacetonu w chemii i biochemii
Rafał ŁUZNY, Jerzy WALENDZIEWSKI: Glinokrzemofosforany i ich wybrane zastosowania
Jan SOLECKI: Metody analizy ^{90}Sr w próbkach środowiskowych
Irena JACUKOWICZ, Elżbieta KOCIOŁEK-BAJAWEJDER: Formaldehyd w powietrzu – źródła, toksyczność, metody usuwania z powietrza pomieszczeń
Krystyna SROGI: Mineralizacja materiału roślinnego jako etap poprzedzający oznaczanie składników śladowych
Jacek GULIŃSKI: Komercjalizacja wyników prac badawczych chemików na polskich uczelniach wyższych – mozliwości, ograniczenia, perspektywy

Informacje