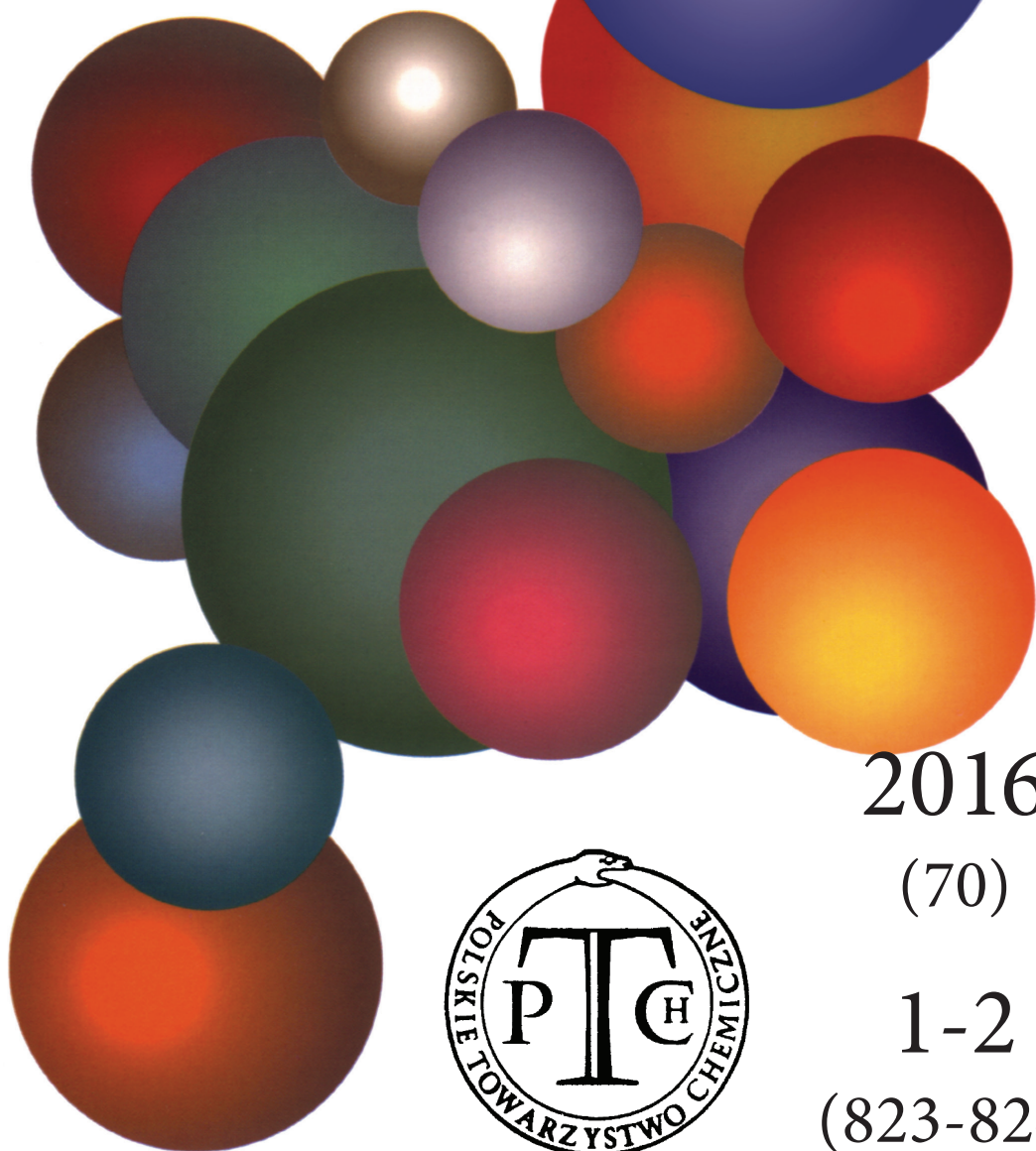


WIADOMOŚCI *chemiczne*

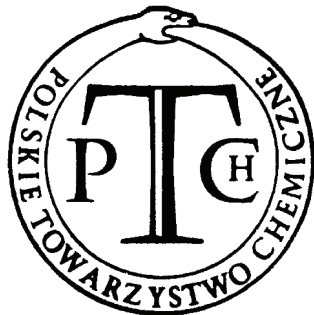


2016

(70)

1-2

(823-824)



CZASOPISMO POLSKIEGO TOWARZYSTWA CHEMICZNEGO

Publikacja dotowana przez MNiSW

RADA REDAKCYJNA

RYSZARD ADAMIAK, IRENA BARANOWSKA, ANDRZEJ BARAŃSKI,
BOGUSŁAW BUSZEWSKI, ANATOL KOJŁO, TADEUSZ M. KRYGOWSKI, ANDRZEJ KUTNER,
PIOTR PANETH (PRZEWODNICZĄCY), K. MICHAŁ PIETRUSIEWICZ, DARIUSZ POGOCKI,
MAREK POTRZEBOWSKI, GRZEGORZ SCHROEDER, ANDRZEJ SOKALSKI, ARTUR P. TERZYK

KOMITET REDAKCYJNY

JERZY P. HAWRANEK, ADAM JEZERSKI, LUDWIK KOMOROWSKI, MIROŚLAW SOROKA,
MARIA SUSZYŃSKA, SŁAWOMIR SZAFERT, ANDRZEJ TROCHIMCZUK

REDAKTOR NACZELNY

ZDZISŁAW LATAJKA

SEKRETARZ REDAKCJI

BEATA ŚWIĄTEK-TRAN

BARBARA LATKO (FINANSE)

KAZIMIERA LUKJAN (KOLPORTAŻ)

Korespondencję należy kierować pod adresem:

Redakcja „Wiadomości Chemicznych”
ul. F. Joliot-Curie 14, 50-383 Wrocław
tel.: 71 375 73 89, tel./fax: 71 322 14 06
e-mail: wchem@wchuwr.pl

INTERNET

<http://www.wchuwr.pl/wiadchem.htm> (English abstracts)
<http://www.dbc.wroc.pl> (pełne teksty publikacji od roku 2006)

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

© Copyright by Redakcja „Wiadomości Chemicznych”, Wrocław 2016

pISSN 0043-5104

eISSN 2300-0295

Maszynopis niniejszego numeru przekazano Wydawcy w lutym 2016

Przygotowanie do druku i druk:

Firma Wydawnicza K2, al. Stanów Zjednoczonych 51, 04-026 Warszawa
tel. 22 517 78 12, fax 22 517 78 11, e-mail: k2@druk-k2.pl

PODZIĘKOWANIA OD REDAKCJI

W imieniu Komitetu Redakcyjnego chciałbym wyrazić słowa podziękowania prof. dr hab. Bogusławowi Buszewskiemu, byłemu Prezesowi Polskiego Towarzystwa Chemicznego, za wsparcie i głębokie zaangażowanie w sprawy naszego czasopisma. Jednocześnie z olbrzymią przyjemnością witamy Pana Profesora w składzie Rady Redakcyjnej „Wiadomości Chemicznych”.

Ponadto w imieniu Komitetu Redakcyjnego bardzo dziękuję za niezwykle owocną współpracę, a także za bardzo wydatną pomoc prof. dr hab. inż. Jerzemu Błażejewskiemu, który do 31 grudnia 2015 roku był członkiem Rady Redakcyjnej, a z dniem 1 stycznia 2016 roku objął zaszczytną funkcję Prezesa Polskiego Towarzystwa Chemicznego.

Życzymy Panu Profesorowi sukcesów na polu działalności Polskiego Towarzystwa Chemicznego a także liczymy na dalsze wsparcie czasopisma.

W imieniu Komitetu Redakcyjnego,

prof. dr hab. Zdzisław Latajka
Redaktor Naczelny

ANION ALKOKSYALLENOWY W SYNTEZIE ZWIĄZKÓW NATURALNYCH I ICH ANALOGÓW

ALKOXYALLENE ANION IN THE SYNTHESIS OF NATURAL PRODUCTS AND THEIR ANALOGUES

Beata Busiak, Greta Utecht, Marcin Jasiński*

Wydział Chemii Uniwersytetu Łódzkiego

ul. Tamka 12, 91-403 Łódź

**e-mail: mjasinski@uni.lodz.pl*

Abstract

Wprowadzenie

1. Alkoksyaleny

2. Reakcje litowanych alkoksyalenów z elektrofilami

2.1. Aldehydy i ketony

2.2. Iminy i nitryle

2.3. Nitrony

2.4. Inne elektrofile

Podsumowanie

Podziękowanie

Piśmiennictwo cytowane

mgr Beata Busiak, absolwentka Wydziału Chemii Uniwersytetu Łódzkiego. W 2015 r. uzyskała tytuł magistra chemii za pracę obejmującą wykorzystanie litowanych alkoksyalenów w syntezie pochodnych indolizydyny.

mgr Greta Utecht, doktorantka na Wydziale Chemii UŁ od 2014 r. W pracy naukowej zajmuje się syntezą polifunkcjonalizowanych heterocykli azotowych i tlenowych o znaczeniu biologicznym.

dr Marcin Jasiński, stopień doktora nauk chemicznych uzyskał w 2008 r. za pracę nad syntezą i reakcjami *N*-tlenków imidazolu, wykonaną w Zakładzie Związków Heteroorganicznych UŁ pod kierunkiem prof. dr hab. G. Mlostonia, nagrodzoną na ogólnopolskim konkursie 'Sigma-Aldrich-PTChem'. Jako stypendysta Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej odbył staż podoktorski w Freie Universität Berlin (2010–2012), w grupie profesora H.-U. Reissiga; ponadto, przebywał na krótszych stażach badawczych w University of Giessen (Niemcy) oraz Vanderbilt University (USA). Laureat prestiżowego stypendium naukowego Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego dla wybitnych młodych naukowców (2015). Od 2008 roku jest adiunktem w Katedrze Chemii Organicznej i Stosowanej na Wydziale Chemii UŁ, gdzie prowadzi prace, między innymi, nad wykorzystaniem alkoksyalenów w syntezie organicznej, nowymi reakcjami tioketonów alifatycznych oraz syntezą i badaniem właściwości stabilnych rodników ciekłokrystalicznych.

ABSTRACT

Among diverse systems containing multiple bonds, cumulenes are recognized as the most reactive derivatives towards both nucleophilic and electrophilic agents, and for this reason, they are considered as important class of substrates for organic synthesis. Over the last three decades alkoxyallenes have been demonstrated as highly useful C₃-building blocks for the construction of numerous *N*-, *O*-, and *S*-containing heterocycles, including enantiomerically pure compounds. Special attention has been paid to lithiated alkoxyallenes as suitable nucleophiles for the reactions with alkyl halides, strained heterocycles, carbonyl compounds and their derivatives. The presence of the allene unit in the initially formed adducts opens up several possibilities in the preparation of more complex systems. In this review, selected applications of lithiated alkoxyallenes in the synthesis of natural products and their analogues are discussed.

Keywords: alkoxyallenes, nucleophilic addition, organic synthesis, natural products, heterocycles

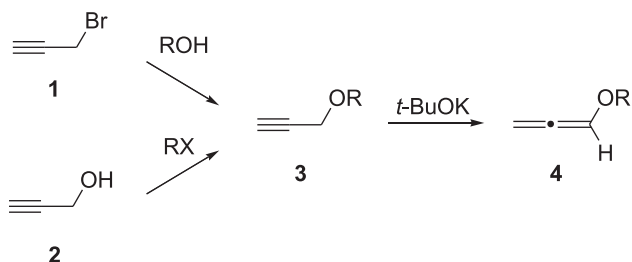
Słowa kluczowe: alkoxyalleny, addycja nukleofilowa, synteza organiczna, związki naturalne, związki heterocykliczne

WPROWADZENIE

Wśród różnorodnych połączeń zawierających wiązania wielokrotne, kumuleny wykazują wysoką reaktywność w typowych transformacjach z użyciem odczynników nukleo- oraz elektrofilowych i z tego powodu, stanowią istotną grupę substratów do wykorzystania w syntezie organicznej. W ostatnich dekadach obserwuje się m.in. wyraźny wzrost zainteresowania chemią alkoksyalenów jako łatwo dostępnych, trójwęglowych bloków budulcowych do syntezy *N*-, *O*-, i *S*-heterocykli, w tym pochodnych enancjomerycznie czystych. Szczególnie zainteresowanie wzbudza anion alkoksyalenowy, wysoce reaktywny wobec takich elektrofilów jak halogenki alkilowe, naprężone heterocykle oraz związki karbonylowe i ich pochodne. Unikalne możliwości wykorzystania pierwotnie powstających adduktów związane z obecnością wiązania skumulowanego zademonstrowano w licznych publikacjach dotyczących syntezy bardziej złożonych połączeń. Niniejsze opracowanie, obejmujące przegląd literatury nt. zastosowania litowanych alkoksyalenów w syntezie produktów naturalnych i pokrewnych, ma na celu przybliżenie polskiemu czytelnikowi zagadnień związanych z chemią tytułowych związków.

1. ALKOKSYALLENY

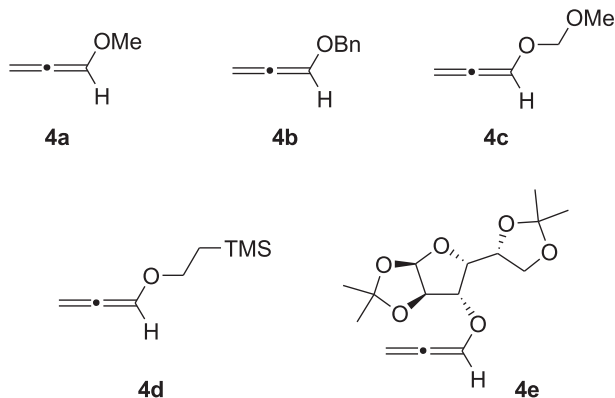
Alkoksyaleny typu **4** najczęściej otrzymuje się jako produkty termodynamiczne izomeryzacji odpowiednich eterów propargilowych **3**, katalizowanej silnymi zasadami, prowadzonej w takich rozpuszczalnikach aprotycznych jak tetrahydrofuran lub toluen. Jak pokazano na Schemacie 1, łatwo dostępne związki wyjściowe **3** przygotowuje się metodą Williamsona, w której wykorzystywany jest handlowo dostępny bromek propargilu (**1**) lub odpowiedni alkohol **2**. Przykładowo, alkilowanie alkoholu pochodnego **2** z użyciem siarczanu dimetylu (Me_2SO_4) oraz następcza izomeryzacja w obecności *tert*-butanolanu potasu (*t*-BuOK) prowadzi do pożądanego metoksyallenu (**4a**, Rys. 1) z całkowitą wydajnością 81% [1, 2].



Schemat 1. Synteza alkoksyalenów **4**
Scheme 1. Synthesis of alkoxyallenes **4**

Oprócz wspomnianego wcześniej metoksyallenu, zwykle stosowanego jako związek modelowy w reakcjach testowych, wśród innych, często wykorzystywanych

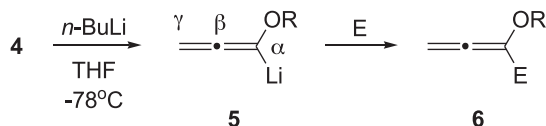
pochodnych, należy wskazać alkoksyaleny **4b-e** przedstawione na Rys. 1, których wybór podyktowany jest możliwością odblokowania grupy hydroksylowej na końcowych etapach syntezy. I tak, obecność ugrupowania benzyłowego w pochodnej **4b** umożliwi deprotekcję w stosunkowo łagodnych warunkach katalitycznego uwodornienia, podczas gdy podstawniki MOM oraz TMSE (związki **4c** i **4d**) są labilne w warunkach kwaśnych [3]. W reakcjach z użyciem prochiralnych substratów stosowane są enancjomerycznie czyste alkoksyaleny, zwykle pochodne terpenów lub węglowodanów, jak np. DAG-allen **4e**, pochodny diacetonoglukozy [4].



Rysunek 1. Wybrane przykłady syntetycznie użytecznych alkoksyalenów
Figure 1. Selected examples of synthetically useful alkoxyallenes

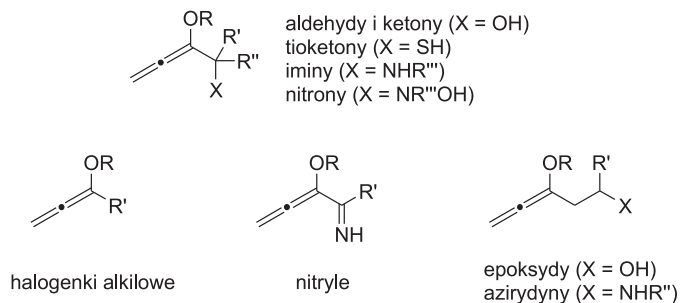
2. REAKCJE LITOWANYCH ALKOKSYALLENÓW Z ELEKTROFILAMI

Obecność grupy alkoksylowej w pochodnych typu **4** w istotny sposób wpływa na reaktywność ugrupowania allenowego. Zgodnie z oczekiwaniem atom węgla w pozycji γ wykazuje właściwości elektrofilowe, podczas gdy atom węgla β cechuje reaktywność typowa dla eterów enoli. Podwyższona CH-kwasowość atomu wodoru w pozycji α umożliwia w reakcjach z mocnymi zasadami, takimi jak związki organolitowe, łatwe odszczepienie protonu prowadząc do reaktywnego anionu alkoksyalenowego (**5**) [5]. Na ogół, wygenerowany *in situ* karboanion **5** reaguje selektywnie (na atomie węgla α) z odczynnikami elektrofilowymi w reakcjach podstawienia lub addycji prowadząc do wartościowych allenylowych związków pośrednich typu **6** o szerokich możliwościach wykorzystania w reakcjach następczych.



Schemat 2. α -Deprotonowanie alkoksyalenów oraz ogólny przebieg reakcji anionu **5** z elektrofilami
Scheme 2. α -Deprotonation of alkoxyallenes and the reaction of the anion **5** with electrophiles

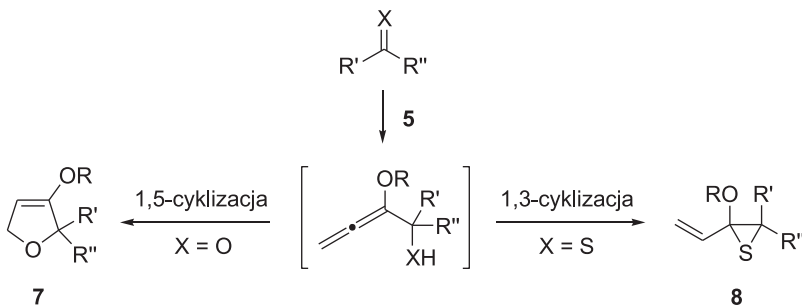
Ogólną strukturę pierwotnych adduktów otrzymywanych w reakcjach anionu alkoksyalenowego z elektrofilami przedstawiono na Rysunku 2. W przypadku addycji **5** do związków karbonylowych i ich pochodnych otrzymuje się odpowiednie produkty allenylowe tj. alkohole [6, 7], tiole [8], aminy [9], iminy [10] oraz hydroksyloaminy [11]. Zgodnie z oczekiwaniem, reakcje anionu **5** z halogenkami alkilowymi prowadzą do 1,1-dipodstawionych allenów [12], podczas gdy w przypadku monopodstawionych heterocykli trójczłonowych takich jak epoksydy i azirydyny zwykle obserwuje się regioselektywne otwarcie pierścienia wskutek ataku litowanego alkoksyalenu na mniej zatłoczony atom węgla [6, 13].



Rysunek 2. Produkty powstające w reakcji litowanych alkoksyalenów z elektrofilami
 Figure 2. Products formed by addition of lithiated alkoxyallenes onto electrophiles

2.1. ALDEHYDY I KETONY

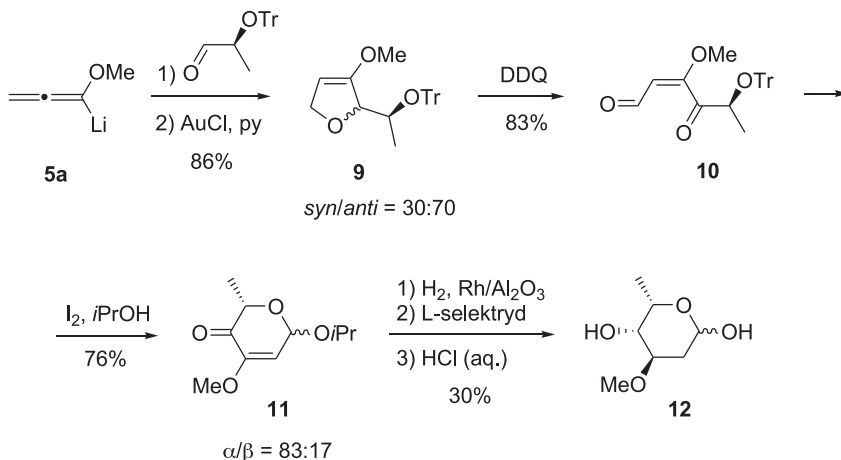
Jak wspomniano, w reakcjach anionu alkoksyalenowego **5** z aldehydami i ketonami powstają odpowiednie alkohole allenylowe, które w szczególnych przypadkach daje się wydzielić i scharakteryzować. Związki tego typu wykazują skłonność do cyklizacji-1,5, zwykle katalizowanej zasadami (np. *t*-BuOK) [6, 14] lub słabymi kwasami Lewisa (np. kompleksem AuCl/pirydyna) [15, 16] prowadząc do pochodnych 3-alkoksy-2,5-dihydrofuranu **7** (Schemat 3). W przypadku niektórych, sterycznie bardziej zatłoczonych ketonów, obserwuje się konkurencyjny scenariusz cyklizacji-1,3 z utworzeniem odpowiednich pochodnych winylooksiiranu [8, 17]. Warto wspomnieć, że analogiczne transformacje z użyciem cykloalifatycznych tioketonów prowadzą na ogół bezpośrednio do pochodnych winyloliiranu typu **8**, powstających w wyniku autokatalitycznej (kwasowej) 1,3-cyklizacji pierwotnie utworzonych allenylotoli [8].



Schemat 3. Główne kierunki cyklizacji (1,5- vs 1,3-) adduktów pochodnych związków karbonylowych i ich siarkowych analogów

Scheme 3. Main cyclisation routes (1,5- vs 1,3-) of adducts derived from carbonyl compounds and their S-analogues

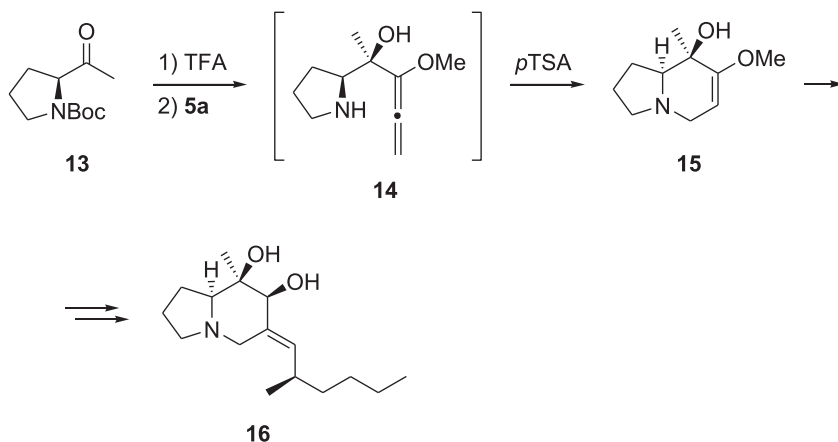
W reakcji litowanego metoksyallenu (**5a**) z enancjomerycznie czystą pochodną aldehydu mlekowego otrzymano addukt, który w wyniku cyklizacji-1,5 indukowanej kompleksem Au(I)/pirydyna prowadził do oczekiwanej pochodnej 2,5-dihydrofuranu **9** (Schemat 4). Skłonność związków typu **9** do utleniającego otwarcia pierścienia prowadzącego do γ -ketoaldehydów wykorzystano w syntezie L-cymarozy (**12**) [18], ważnego fragmentu strukturalnego antybiotyku *heliquinomycin*, związku naturalnego wykazującego właściwości inhibujące wobec helikazy DNA [19]. W wyniku deprotekcji grupy hydroksylowej eteru trytylowego **10** oraz następczych, wysoce stereoselektywnych redukcji ugrupowania eteru enolu (H_2 , Rh/ Al_2O_3) oraz grupy karbonylowej (L-selektryd) pochodnej **11** otrzymano w wyniku końcowej hydrolizy kwasowej pożądany produkt **12**. W analogicznym postępowaniu przygotowano trzy kolejne pochodne 2,6-dideoksycukrów szeregu L [18].



Schemat 4. Synteza L-cymarozy (**12**)

Scheme 4. Synthesis of L-cymarose (**12**)

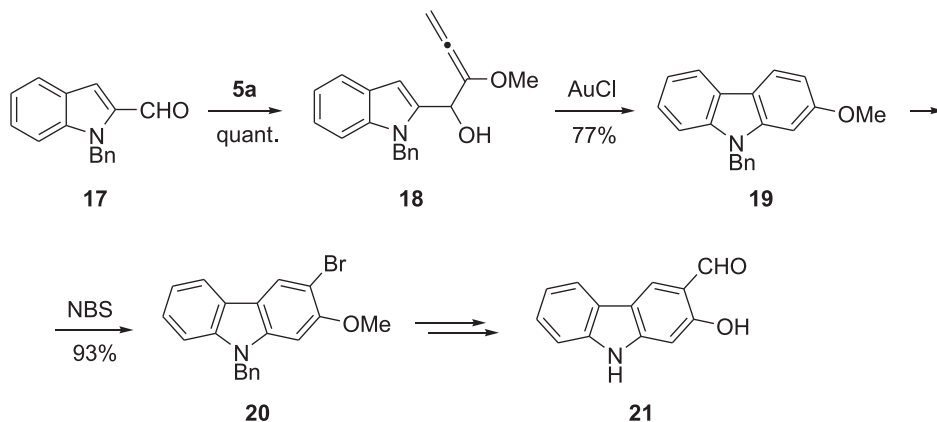
W obecności innych, bardziej nukleofilowych centrów w pierwotnie utworzonym addukcie możliwy jest konkurencyjny scenariusz cyklizacji. Przykładowo, w przypadku addycji litowanego metoksyallenu (**5a**) do świeżo wygenerowanej soli piperolidyniowej uzyskanej z ketonu **13** pochodnego L-proliny, otrzymano addukt **14**, który w obecności katalitycznych ilości kwasu *p*-toluenosulfonowego (*p*-TSA) ulegał regioselektywnej cyklizacji-1,6 do indolizydyny **15** (Schemat 5) [20]. Ten produkt wykorzystano w syntezie totalnej pumiliotoksyny 267A (**16**) oraz innych, strukturalnie podobnych alkaloidów allopumiliotoksynowych pierwotnie wyizolowanych z wydzielin tropikalnych żab z rodziny *Dendrobatidae* [21].



Schemat 5. Synteza alkaloidu indolizydynowego pumiliotoksyny 267A (**16**)

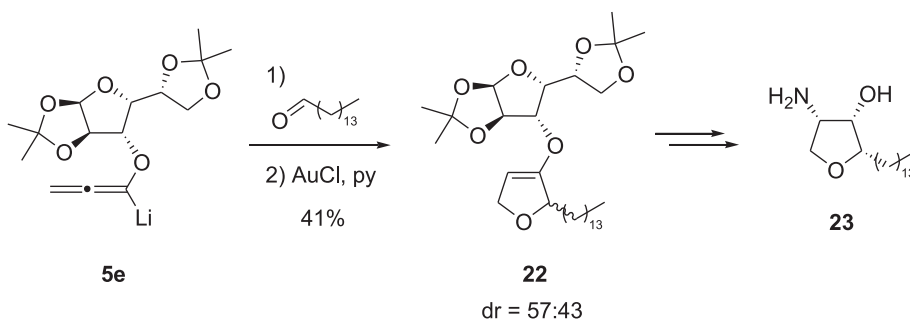
Scheme 5. Synthesis of indolizidine alkaloid pumiliotoxin 267A (**16**)

W innym przykładzie obejmującym syntezę naturalnie występujących alkaloidów karbazolowych, jako substrat wybrano 1-benzyl-1*H*-indolo-2-karbaldehyd (**17**), który w wyniku addycji anionu **5a** prowadził do względnie trwałego alkoholu **18** (Schemat 6) [22]. Warto zwrócić uwagę, że aktywacja podstawnika allenowego katalityczną ilością kwasu Lewisa (AuCl) prowadziła wyłącznie do produktu 1,6-cyklizacji, w wyniku substytucji elektrofilowej na wysoce reaktywnym atomie C-3 pierścienia indolowego. W wyniku spontanicznej eliminacji cząsteczki wody, otrzymano pochodną **19**, której następnie, regioselektywne bromowanie prowadzone w standardowych warunkach z użyciem NBS doprowadziło do bromopochodnej **20**. Ten związek wykorzystano jako kluczowy substrat w syntezie alkaloidów karbazolowych, w tym izomukonidyny, klauzyny L, glikozyniny oraz mukonalu (**21**), związku o właściwościach przeciwmalarycznych [23].

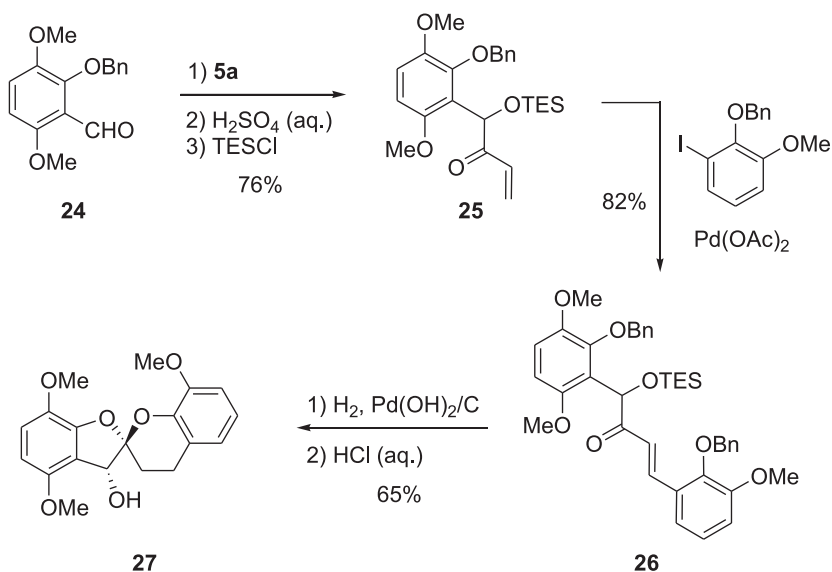


Schemat 6. Synteza związku **20**, kluczowego substratu do syntezy naturalnych alkaloidów karbazolowych
 Scheme 6. Synthesis of compound **20**, a key precursor for the synthesis of natural carbazole alkaloids

Jak wykazano, reakcje addycji litowanych alkoxyallenów do chiralnych związków karbonylowych prowadzą do diastereomerycznie wzbogaconych (lub niekiedy czystych) produktów. Z drugiej strony, addycje enancjomerycznie czystych alkoxyallenów do prochiralnych substratów z reguły przebiegają z niską stereoselektywnością, co pozwala na przygotowanie stosunkowo łatwych do rozdzielania mieszanin produktów distereomerycznych. Takie postępowanie zaprezentowano w syntezie jaspiny B, związku naturalnego o właściwościach cytotoksycznych [24, 25]. W kluczowym etapie, w wyniku addycji litowanego DAG-allenu (**5e**) do pentadekanalu oraz cyklizacji pierwotnych adduktów otrzymano mieszaninę odpowiednich pochodnych dihydrofuranu **22**, które następnie rozdzielono chromatograficznie. Kolejne transformacje z użyciem obu diastereoizomerów umożliwiły syntezę produktu naturalnego **23** oraz jego trzech stereoisomerów [26].



Schemat 7. Synteza jaspiny B (**23**) z użyciem chiralnej soli litowej **5e**
 Scheme 7. Synthesis of jaspine B (**23**) using chiral lithium salt **5e**

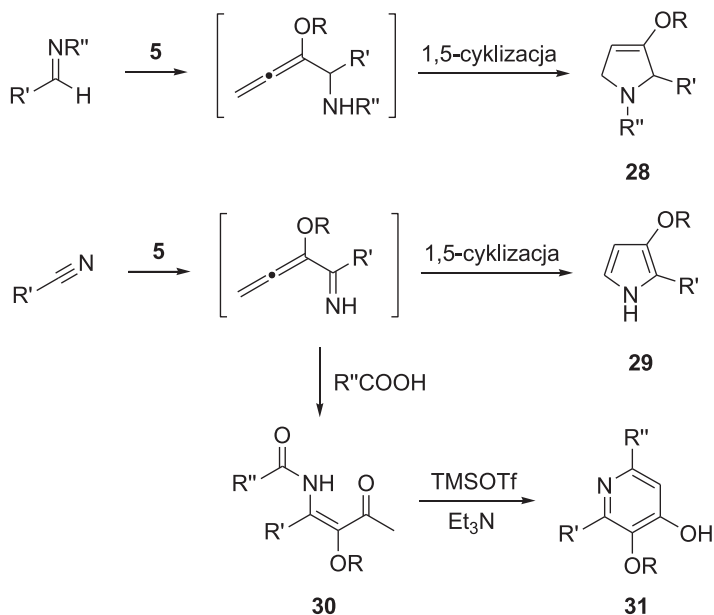
Schemat 8. Synteza spiroketalu **27**Scheme 8. Synthesis of spiroketal **27**

Anion alkoksyalenowy stanowi odpowiednik wielu ważnych syntonów organicznych, co wykazano w syntezie spiroketalu **27** (Schemat 8) [27], w której ugrupowanie alkoksyalenowe zastosowano jako ekwiwalent anionu acylowego [28, 29]. W wyniku hydrolizy kwasowej pierwotnego adduktu utworzonego w reakcji addycji litowanego metoksyalenu (**5a**) do pochodnej benzaldehydu **24** otrzymano enon **25** z dobrą wydajnością 76%. Kolejne transformacje obejmujące reakcję Hecka z użyciem odpowiedniej trójpodstawionej pochodnej jodobenzenu, debenzylowanie w warunkach katalitycznego uwodornienia oraz cyklizację w obecności kwasu Brønsteda umożliwiły syntezę docelowego spiroketalu. Pochodną **27** wskazano jako modelowy substrat do badań nad syntezą analogów rubromycyny [30], wykazujących właściwości antybiotyczne oraz inhibicyjne wobec ludzkiej telomerazy oraz wirusa HIV-1-RT.

2.2. IMINY I NITRYLE

Podobny przebieg reakcji jak w przypadku aldehydów i ketonów obserwuje się z użyciem aldimin i nityryli, które w wyniku addycji anionu alkoksyalenowego prowadzą do odpowiednich związków pośrednich łatwo ulegających cyklizacji (spontanicznej lub indukowanej), odpowiednio do pochodnych 2,5-dihdropirolu **28** i pirolu **29** (Schemat 9). Jako szczególnie interesującą i syntetycznie ważną modyfikację reakcji z użyciem nityryli należy wskazać wielokomponentową syntezę polipodstawionych pochodnych pirydyny typu **31** [10]. W prezentowanym podejściu,

wygenerowana *in situ* allenylowa imina wyłapywana jest kwasem karboksylowym prowadząc do *N*-acylowanego enaminyonu **30**, który w wyniku aktywacji triflanem trimetylosililowym ulega cyklizacji do tetrapodstawionej pirydyny **31**.

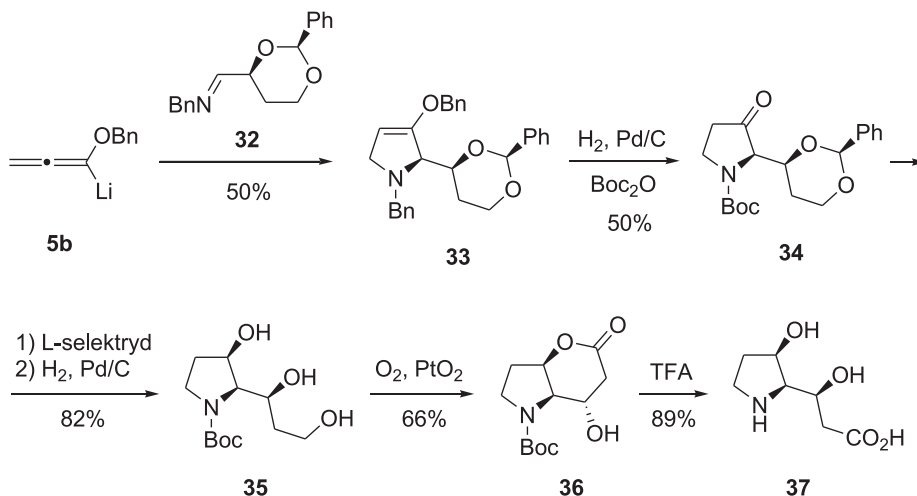


Schemat 9. Anion alkoxyallenowy w syntezie pochodnych (dihydro)pirolu oraz pirydyny

Scheme 9. Lithiated alkoxyallene approach to (dihydro)pyrrole and pyridine derivatives

Na Schemacie 10 przedstawiono wybrany przykład wykorzystania anionu typu **5** oraz chiralnej iminy w syntezie totalnej (–)-detoksyniny (**37**) [31], polihydroksylowanego γ -aminokwasu będącego jednym z głównych metabolitów fermentacji depsipeptydów bakterii rodzaju *Streptomyces* [32, 33]. W reakcji litowanego benzyloksyalenu (**5b**) ze świeżo przygotowaną *N*-benzyloiminą **32** pochodną kwasu (*S*)-jabłkowego, otrzymano dihydropirol **33**, podobnie jak w przypadku innych enancjomerycznie czystych imin, z doskonałym nadmiarem diastereomerycznym (*syn:anti* > 97:3) oraz dobrą wydajnością (50%). Związek **33** przekształcono następnie w pochodną pirolidynonu **34** w standardowych warunkach katalitycznego debenzylowania, w atmosferze gazowego wodoru (kat. Pd/C), prowadząc reakcję w obecności diwęglanu di-*tert*-butylu (Boc₂O) (Schemat 10). W wyniku stereoselektywnej redukcji grupy karbonylowej związku **34** z użyciem sterycznie wymagającego L-selektrydu oraz następczego reduktywnego odblokowania ugrupowania 1,3-dioksolanowego otrzymano triol **35** (82%). Najlepsze wyniki selektywnego utlenienia pierwszorzędowej grupy hydroksylowej w pochodnej **35** zanotowano z wykorzystaniem gazowego tlenu w obecności dwutlenku platyny otrzymując oczekiwany aldehyd, cyklizujący w warunkach reakcji do laktonu **36**, którego strukturę potwierdzono analizą rentgenograficzną [31]. Otwarcie pierścienia lak-

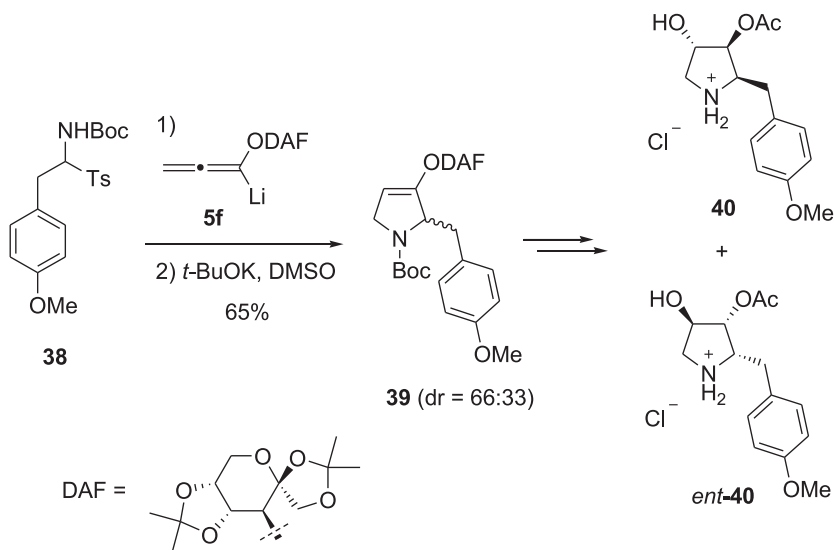
tonowego z równoczesnym usunięciem grupy zabezpieczającej Boc zrealizowano w typowych warunkach z użyciem kwasu trifluoroctowego (TFA) i wydzielono oczekiwany produkt **37** z bardzo dobrą wydajnością całkowitą 12%.



Schemat 10. Synteza (-)-detoksyny (**37**)

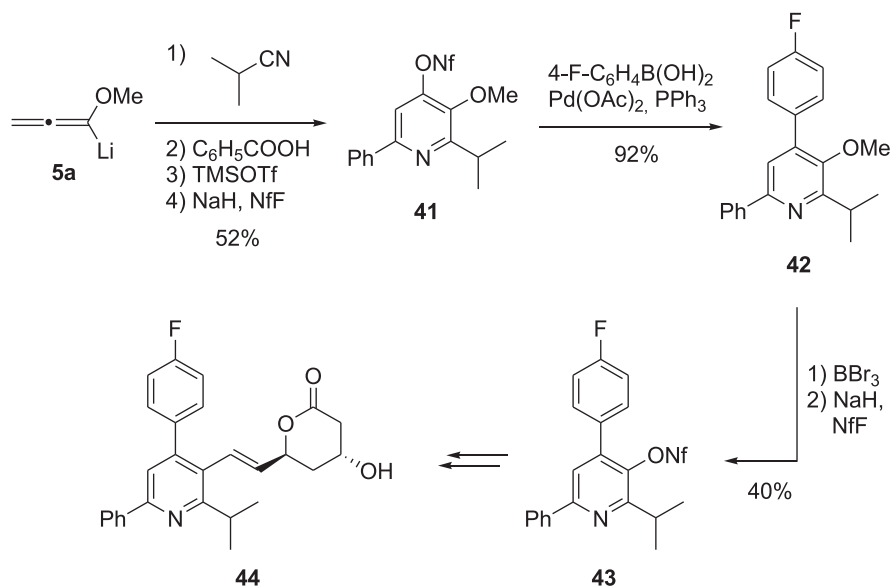
Scheme 10. Synthesis of (-)-detoxinine (**37**)

W innym przykładzie pokazanym na Schemacie 11, jako dogodny prekursor prochiralnej iminy generowanej *in situ* użyto sulfon **38**, który w obecności enancjomerycznie czystego allenu **5f** pochodnego diacetonofruktozy (DAF), prowadził do oczekiwanej pochodnej 2,5-dihidropirolu **39** w postaci mieszaniny diastereoizomerów ($dr = 2:1$) [34]. Produkty rozdzielono metodami chromatograficznymi i wykorzystano do przygotowania obu enancjomerów anizomycyny (**40**), znanego inhibitora syntezy białek wykazującego interesujące właściwości biologiczne [35, 36].



Schemat 11. Wykorzystanie pomocnika chiralnego DAF w syntezie obu enancjomerów anizomycyny (**40**)
 Scheme 11. Application of chiral auxiliary DAF in the synthesis of both enantiomers of anisomycin (**40**)

Ogólną metodę syntezy polipodstawionych pochodnych pirydyny z użyciem anionu alkoxyallenowego skutecznie zaadoptowano do przygotowania sulfonianu **43** [37], wskazanego jako dogodny blok budulcowy do wykorzystania w syntezie glenwastatyny (**44**), znanego inhibitora biosyntezy cholesterolu [38]. W kluczowym etapie, w trójkomponentowej cyklizacji anionu **5a** z izopropylonitrylem i kwasem benzoesowym oraz następczej aktywacji grupy hydroksylowej w pozycji C4 utworzonego pierścienia heterocyklicznego uzyskano oczekiwany nonaflan **41**. Kolejne etapy syntezy obejmujące sprzężenie **41** z kwasem *p*-fluorofenyloboronowym w standardowych warunkach reakcji Suzuki, demetylowanie eteru **42** w obecności BBr_3 oraz reakcją odpowiedniego fenolanu z fluorkiem nonafilylu (NfF) doprowadziły do pożądanego produktu **43** z całkowitą wydajnością 19%.

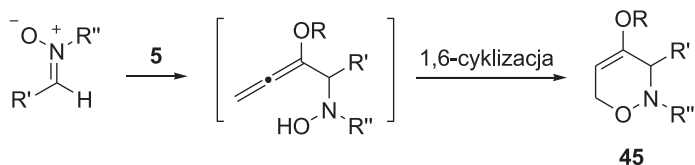


Schemat 12. Formalna synteza totalna glenwastatyny (44)

Scheme 12. Formal total synthesis of glenvastatin (44)

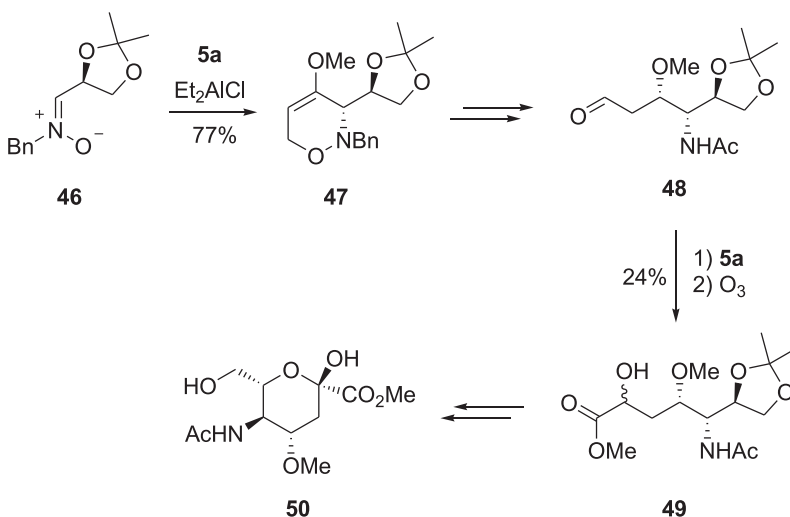
2.3. NITRONY

Wśród odczynników elektrofilowych wykorzystywanych w reakcjach z litowanymi alkoksyalenami największym zainteresowaniem cieszą się nitrony, które w wyniku addycji anionu 5 oraz spontanicznej cyklizacji-1,6 pośrednich allenylolohydroksyloamin prowadzą do pochodnych 3,6-dihydro-2*H*-1,2-oksazyny typu 45 [11]. W ramach tej klasy substratów gruntownie przebadano reakcje nitronów pochodnych węglowodanów i aminokwasów [3, 11, 39], w tym nitronów cyklicznych [40], rolę pomocnika chiralnego obecnego w substracie [41], a także użyteczność *N*-glikozylohydroksyloamin jako tzw. nitronów zamaskowanych [42] obserwując w większości przypadków wysokie nadmiary diastereomeryczne. Cechą charakterystyczną optycznie czystych pochodnych 45 jest ich unikalna użyteczność związana z obecnością ugrupowania eteru-enolu otwierającego możliwości dalszej, stereoselektywnej funkcjonalizacji w obrębie wiązania podwójnego. Z drugiej strony, relatywnie słabe wiązanie N–O łatwo poddające się chemoselektywnej redukcji otwiera dostęp do odpowiednich δ -aminoalkoholi, dogodnych substratów w takich reakcjach następczych jak cyklizacja, utlenianie, acylowanie etc.



Schemat 13. Dwuetapowa reakcja cyklizacji-[3+3] litowanych alkoxyallenów **5** z nitronami
 Scheme 13. Two-step [3+3]-cycloaddition of nitrones and lithiated alkoxyallenes **5**

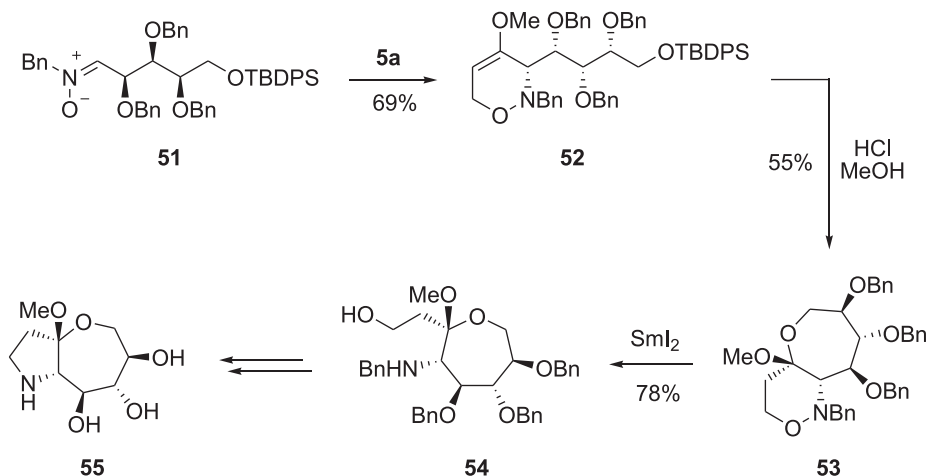
Jeden z najbardziej spektakularnych przykładów wykorzystania litowanych alkoxyallenów w syntezie związków wielofunkcyjnych przedstawiono na Schemacie 14. W prezentowanym podejściu do związku **50** [43], anion metoksyallenowy (**5a**) wykorzystano dwukrotnie, odpowiednio jako blok budulcowy C₃ i C₁. W pierwszym etapie omawianej syntezy, w wyniku addycji **5a** do nitronu **46** pochodnego L-gliceraldehydu otrzymano *anti*-1,2-oksazynę **47**, którą przekształcono w aldehyd **48** w sekwencji reakcji obejmujących m.in. stereoselektywną wodorolizę eteru-enolu. W kolejnym etapie anion **5a** wykorzystano jako ekwiwalent grupy metoksykarbonylowej, wprowadzonej na drodze addycji oraz następczej ozonolizy podstawnika allenylowego. Uzyskany α -hydroksyester **49** użyto następnie do syntezy związku **50**, pochodnej kwasu neuraminowego, którego takie analogi strukturalne jak oseltamiwir (Tamiflu) i zanamiwir stosowane są w terapii przeciw grypowej jako selektywne inhibitory neuraminidazy [44].



Schemat 14. Synteza analogu kwasu neuraminowego **50**
 Scheme 14. Synthesis of neuraminic acid analogue **50**

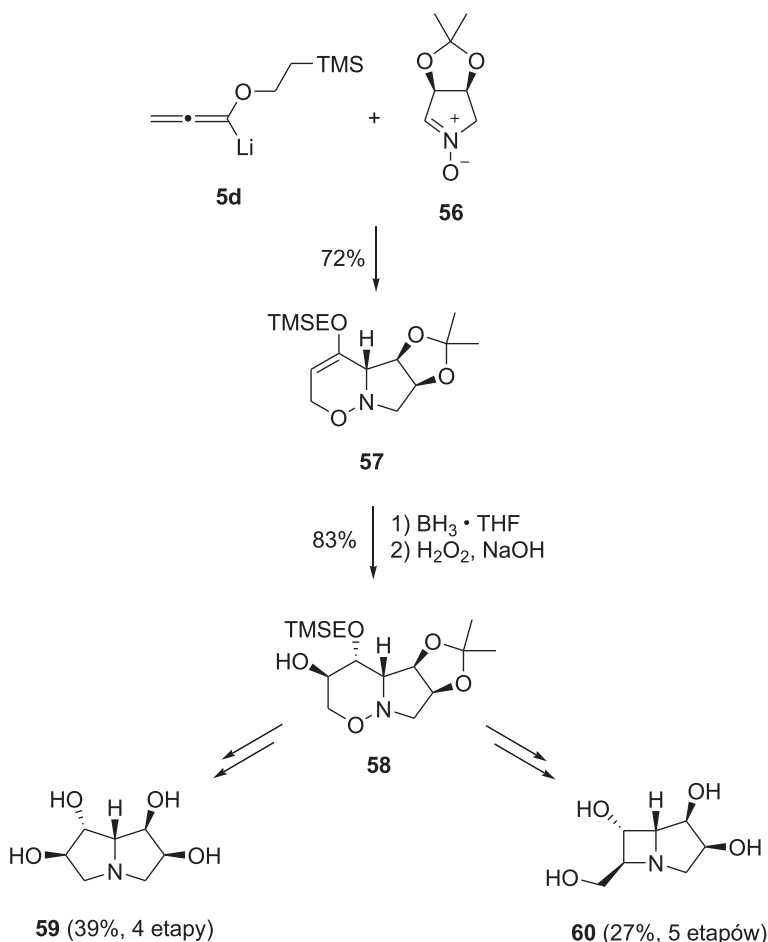
Obecność zamaskowanych grup hydroksylowych w 3,6-dihydro-2*H*-1,2-oksazynach pochodnych węglowodanów, w połączeniu z ugrupowaniem eteru enolu otwiera nowe możliwości w syntezie heterocykli tlenowych np. w reakcjach cykli-

zacji indukowanych kwasem Brønsteda [45]. W jednym z ostatnio opisanych przykładów *syn*-1,2-oksazynę **52** wykorzystano do przygotowania enancjomerycznie czystej pochodnej oksepanopirolidyny **55** (Schemat 15) [46], należącej do szerokiej klasy septanozydów, tj. nienaturalnych 7-członowych węglowodanów o interesujących właściwościach biologicznych [47]. W kluczowym etapie reakcji, 1,2-oksazyna **52** w obecności kwasu (HCl w metanolu) ulega protonowaniu dając odpowiedni karbokation, który wskutek desililowania oraz spontanicznej cyklizacji-1,7 prowadzi do oksepanoidu **53**. Otwarcie pierścienia pochodnej **53** poprzez chemoselektywną redukcję wiązania N–O zrealizowano przy użyciu jodku samaru(II) [48].



Schemat 15. Synteza pirolidinoseptanozydu **55**, pochodnego D-ksylozy
 Scheme 15. Synthesis of D-xylose-derived pyrrolidinoseptanoside **55**

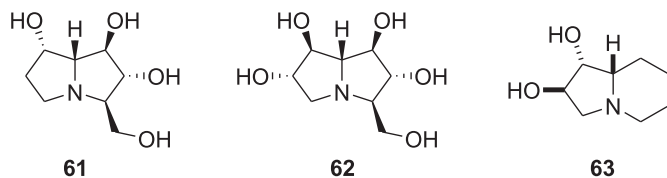
Zgodnie z oczekiwaniem, reakcje nitronów cyklicznych z anionem alkoksyalloenowym prowadzą do skondensowanych pochodnych 3,6-dihydro-1,2-oksazyny, które w ostatnim czasie wskazano jako dogodne bloki budulcowe do syntezy polihydroksylowanych układów azabicyklicznych m.in. pirolizydyn oraz nowej grupy pochodnych azetydyny, analogów strukturalnych znanych antybiotyków β -laktamowych (karbapenamów). Przykładowo, w reakcji anionu TMSE-allenu (**5d**) z nitronem **56** pochodnym L-erytrozy, otrzymano 1,2-oksazynę **57**, którą po uprzednim wysoce stereoselektywnym hydroksylowaniu (związek **58**) wykorzystano w syntezie docelowych heterocykli [49]. W zależności od rodzaju oraz kolejności dalszych transformacji (obejmujących blokowanie grup funkcyjnych, reduktywne otwarcie pierścienia 1,2-oksazyny, cyklizację i deprotekcję) otrzymano pochodną pirolizydyny **59** (znany inhibitor amyloglukozydazy grzybów z rodzaju *Rhizopus* [50]) oraz polihydroksylowaną pochodną azabicyclo[3.2.0]heptanu **60** (Schemat 16).



Schemat 16. Synteza polihydroksylowanych związków azabicyklicznych

Scheme 16. Synthesis of polyhydroxylated azabicyclic compounds

Podobną strategię przyjęto w syntezie australiny (**61**) i kazuaryny (**62**) (Rys. 3), biologicznie ważnych iminocukrów należących do grupy naturalnie występujących pochodnych pirrolizyny, które przygotowano z bardzo dobrymi wydajnościami (odpowiednio, 59% i 84%) wychodząc z łatwo dostępnego pięcioczłonowego nitronu pochodnego *D*-arabinozy oraz litowanego benzyloksyalenu (**5b**) [51]. W analogicznym postępowaniu z użyciem prochiralnego tlenku 2,3,4,5-tetrahydropirydyny otrzymano pochodną indolizyny, racemiczną 8a-*epi*-lentiginozynę (**63**) [52].

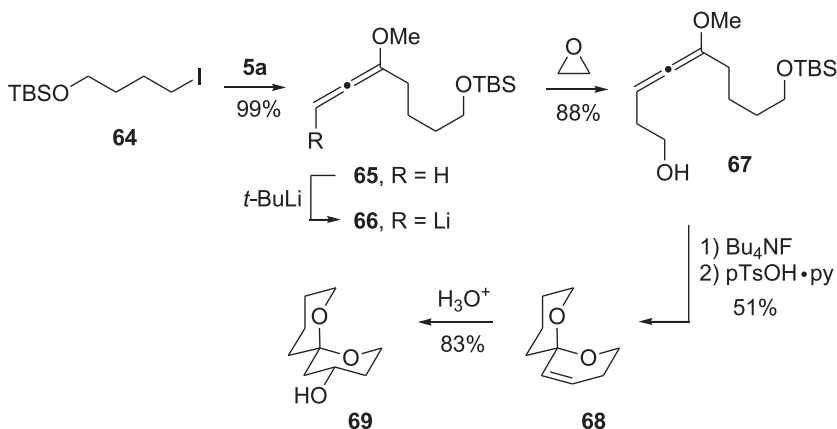


Rysunek 3. Przykładowe pochodne pirolizydyny (**61**, **62**) i indolizydyny (**63**) przygotowane z użyciem litowanych alkoksyalenów i nitronów cyklicznych

Figure 3. Exemplary pyrrolizidine (**61**, **62**) and indolizidine (**63**) derivatives synthesized by the use of cyclic nitrones and lithiated alkoxyallenes

2.4. INNE ELEKTROFILE

1,3-Dipodstawione alkoksyaleny ulegają selektywnemu protonowaniu prowadząc do odpowiednich *Z*-alkenów, co wykorzystano w syntezie serii racemicznych spiroacetalu typu **69**, pochodnych 1,7-dioksa-spiro[5.5]-undekanu, ważnych elementów strukturalnych wielu produktów naturalnych m.in. toksyn grzybów z rodzaju *Talaromyces* [53]. Jak pokazano na Schemacie 17, litowany metoksyallen (**5a**) alkilowano jodkiem **64** otrzymując pochodną **65**, którą najpierw poddano deprotonowaniu w pozycji C3 ugrupowania allenowego a następnie reakcji z oksiranem otrzymując 1,1,3-tripodstawiony alkoksyalen **67**. Kolejne etapy obejmujące desililowanie indukowane anionem fluorkowym, cyklizację otrzymanego diolu w warunkach kwaśnych oraz hydratację alkenu **68** umożliwiły syntezę racemicznego spiroketalu **69**, jednego ze składników feromonu muszki oliwnej (*Bactrocera oleae*) [54].

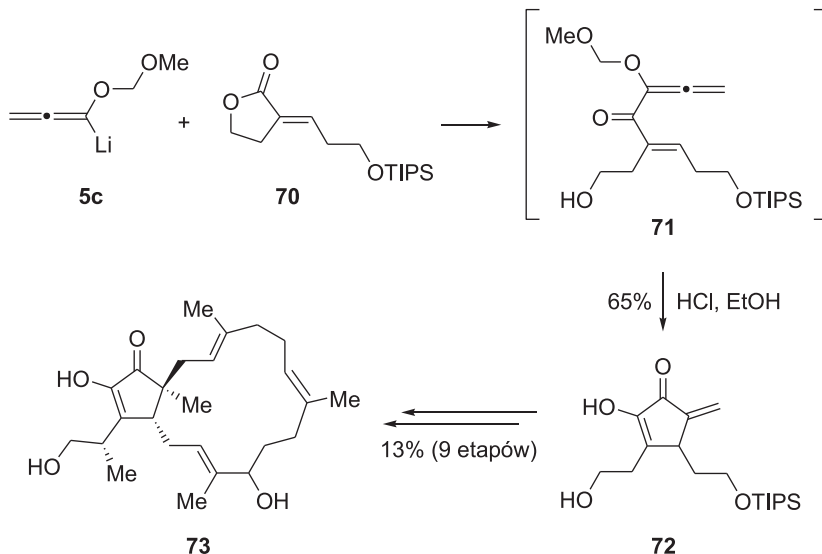


Schemat 17. Synteza feromonu muszki oliwnej **69**

Scheme 17. Synthesis of olive fly pheromone **69**

Terpestacyna (**73**) jest metabolitem wielu grzybów m.in. rodzaju *Arthrinium*, *Bipolaris* i *Fusarium*, wykazującym interesujące właściwości biologiczne, w tym

aktywność przeciwnowotworową [55]. Z tego powodu, sestraterpen **73** oraz jego pochodne stanowią atrakcyjny cel zarówno syntezy totalnej jak i badań biologicznych. W jednym z ostatnio opublikowanych podejść do syntezy terpestacyny wykorzystano litowany alkoxyallen **5c**, który poddano reakcji z laktonem **70** (Schemat 18) [56]. Otrzymany *in situ* addukt **71** w warunkach kwasowych ulegał spontanicznej cyklizacji typu Nazarova prowadząc do pochodnej α -hydroksycyklopentenonu **72**, kluczowego prekursora docelowego związku naturalnego. W wyniku kolejnych transformacji otrzymano docelowy produkt **73** z bardzo dobrą wydajnością całkowitą 8,5% (po 10-ciu etapach).



Schemat 18. Addycja litowanego MOM-allenu (**5c**) do laktonu **70** oraz następcza cyklizacja Nazarova pierwotnego adduktu w syntezie totalnej (\pm)-terpestacyny (**73**)

Scheme 18. Addition of lithiated MOM-allene (**5c**) onto lactone **70** followed by Nazarov-type cyclisation of the primary adduct in the total synthesis of (\pm)-terpestacin (**73**)

PODSUMOWANIE

Alkoxyalleny w reakcji z silnymi zasadami ulegają selektywnemu deprotonowaniu w pozycji α prowadząc do odpowiednich anionów typu **5**, wysoce reaktywnych wobec odczynników elektrofilowych. Po ponad czterech dekadach od pionierskich prac Arensa i współpracowników [5, 6], można zaobserwować wyraźny renesans zainteresowania tą klasą połączeń jako łatwo dostępnych substratów użytecznych m.in. w syntezie polifunkcjonalizowanych heterocykli azotowych i tlenowych. W niniejszym opracowaniu omówiono główne kierunki reakcji litowanych alkoxyallenów z użyciem halogenków alkilowych oraz związków karbonylowych i ich pochodnych, w tym aldehydów, ketonów, laktonów, nitronów, imin i nitryli,

także w reakcjach wielokomponentowych. Wybrane przykłady obejmujące syntezę związków naturalnych i ich analogów jednoznacznie potwierdzają unikalny potencjał syntetyczny anionów **5** jako trójwęglowych bloków budulcowych (C₃), wykorzystywanych również jako syntony innych istotnych grup funkcyjnych, takich jak anion acylowy oraz grupa metoksykarbonylowa.

PODZIĘKOWANIE

Praca naukowa finansowana w ramach programu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego pod nazwą „Juventus Plus” w latach 2015-2017, nr projektu IP2014 017173.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] W. Reppe, *Liebigs Ann. Chem.*, 1955, 596.
- [2] R. Zimmer, *Synthesis*, 1993, 165.
- [3] M. Helms, W. Schade, R. Pulz, T. Watanabe, A. Al-Harrasi, L. Fišera, I. Hlobilová, G. Zahn, H.-U. Reissig, *Eur. J. Org. Chem.*, 2005, 1003.
- [4] A. Hausherr, B. Orschel, S. Scherer, H.-U. Reissig, *Synthesis*, 2001, 1377.
- [5] S. Hoff, L. Brandsma, J.F. Arens, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas*, 1968, **87**, 916.
- [6] S. Hoff, L. Brandsma, J.F. Arens, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas*, 1969, **88**, 609.
- [7] D. Gange, P. Magnus, *J. Am. Chem. Soc.*, 1978, **100**, 7746.
- [8] M. Jasiński, G. Młostoń, M. Stolarski, W. Costa, M. Domínguez, H.-U. Reissig, *Chem. Asian J.*, 2014, **9**, 2641.
- [9] M. Okala Amombo, A. Hausherr, H.-U. Reissig, *Synlett*, 1999, 1871.
- [10] O. Flögel, J. Dash, I. Brüdgam, H. Hartl, H.-U. Reissig, *Chem.–Eur. J.*, 2004, **10**, 4283.
- [11] W. Schade, H.-U. Reissig, *Synlett*, 1999, 632.
- [12] Y. Fall, G. Gomez, C. Fernandez, *Tetrahedron Lett.*, 1999, **40**, 8307.
- [13] V. Prisyazhnyuk, M. Jachan, I. Brüdgam, R. Zimmer, H.-U. Reissig, *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 2009, **74**, 1069.
- [14] S. Hormuth, H.-U. Reissig, *J. Org. Chem.* 1994, **59**, 67.
- [15] M. Brasholz, H.-U. Reissig, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2007, **46**, 1634; *Angew. Chem.*, 2007, **119**, 1659.
- [16] M. Brasholz, B. Dugovič, H.-U. Reissig, *Synthesis*, 2010, 3855.
- [17] P. Magnus, P. Albaugh-Robertson, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1984, 804.
- [18] M. Brasholz, H.-U. Reissig, *Eur. J. Org. Chem.*, 2009, 3595.
- [19] M. Chino, K. Nishikawa, A. Yamada, M. Ohsono, T. Sawa, F. Hanaoka, M. Ishizuka, T. Takeuchi, *J. Antibiot.*, 1998, **51**, 480.
- [20] L.E. Overman, S.W. Goldstein, *J. Am. Chem. Soc.*, 1984, **106**, 5360.
- [21] M.W. Edwards, J.W. Daly, C.W. Myers, *J. Nat. Prod.*, 1988, **51**, 1188.
- [22] Y. Qiu, D. Ma, C. Fu, S. Ma, *Org. Biomol. Chem.*, 2013, **11**, 1666.
- [23] T. Thongthoom, U. Songsiang, C. Phaosiri, C. Yenjai, *Arch. Pharm. Res.*, 2010, **33**, 675.
- [24] H. Yoo, Y.S. Lee, S. Lee, S. Kim, T.-Y. Kim, *Phytother. Res.*, 2012, **26**, 1927.
- [25] Y. Yoshimitsu, S. Oishi, J. Miyagaki, S. Inuki, H. Ohno, N. Fujii, *Bioorg. Med. Chem.*, 2011, **19**, 5402.

- [26] V.M. Schmiedel, S. Stefani, H.-U. Reissig, *Beilstein J. Org. Chem.*, 2013, **9**, 2564.
- [27] S. Sörgel, C. Azap, H.-U. Reissig, *Org. Lett.*, 2006, **8**, 4875.
- [28] J.-P. Surivet, J. Goré, J.-M. Vatele, *Tetrahedron*, 1996, **52**, 14877.
- [29] I. Hanna, T. Prangé, R. Zeghdoudi, *Tetrahedron Lett.*, 1996, **37**, 7013.
- [30] M. Wilsdorf, H.-U. Reissig, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2014, **53**, 4332; *Angew. Chem.*, 2014, **126**, 4420.
- [31] O. Flögel, M. G. Okala Amombo, H.-U. Reissig, G. Zahn, I. Brüdgam, H. Hartl, *Chem.-Eur. J.*, 2003, **9**, 1405.
- [32] H. Yonehara, H. Seto, S. Aizawa, T. Hidaka, A. Shimazu, N. Otake, *J. Antibiot.*, 1968, **21**, 369.
- [33] T. Ogita, H. Seto, N. Otake, H. Yonehara, *Agric. Biol. Chem.*, 1981, **45**, 2605.
- [34] S. Kaden, M. Brockmann, H.-U. Reissig, *Helv. Chim. Acta*, 2005, **88**, 1826.
- [35] T. Kameyama, Y. Hosoya, H. Naganawa, Y. Okami, T. Takeuchi, *J. Antibiot.*, 1993, **46**, 1300.
- [36] A.E. Power, D.J. Berlau, J.L. McGaugh, O. Steward, *Learn. Mem.*, 2006, **13**, 27.
- [37] T. Lechel, J. Dash, C. Eidamshaus, I. Brüdgam, D. Lentz, H.-U. Reissig, *Org. Biomol. Chem.*, 2010, **8**, 3007.
- [38] G. Beck, K. Kessler, E. Baader, W. Bartmann, A. Bergmann, E. Granzer, H. Jendralla, B. von Kerekjarto, R. Krause, E. Paulus, W. Schubert, G. Wess, *J. Med. Chem.*, 1990, **33**, 52.
- [39] A. Al-Harrasi, H.-U. Reissig, *Synlett*, 2005, 1152.
- [40] R. Pulz, S. Cicchi, A. Brandi, H.-U. Reissig, *Eur. J. Org. Chem.*, 2003, 1153.
- [41] M. Jasiński, D. Lentz, H.-U. Reissig, *Beilstein J. Org. Chem.*, 2012, **6**, 662.
- [42] M. Jasiński, D. Lentz, E. Moreno-Clavijo, H.-U. Reissig, *Eur. J. Org. Chem.*, 2012, 3304.
- [43] B. Bressel, H.-U. Reissig, *Org. Lett.*, 2009, **11**, 527.
- [44] A. Moscona, *N. Engl. J. Med.*, 2005, **353**, 1363.
- [45] B. Bressel, B. Egart, A. Al-Harrasi, R. Pulz, H.-U. Reissig, I. Brüdgam, *Eur. J. Org. Chem.*, 2008, 467.
- [46] M. Jasiński, G. Utecht, A. Fruziński, H.-U. Reissig, *Synthesis*, 2016, **48**, 893.
- [47] Z. Pakulski, *Polish J. Chem.*, 2006, **80**, 1293.
- [48] M. Jasiński, T. Watanabe, H.-U. Reissig, *Eur. J. Org. Chem.*, 2013, 605.
- [49] M. Jasiński, E. Moreno-Clavijo, H.-U. Reissig, *Eur. J. Org. Chem.*, 2014, 442.
- [50] A.T. Carmona, J. Fuentes, P. Vogel, I. Robina, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2004, **15**, 323.
- [51] C. Parmeggiani, F. Cardona, L. Giusti, H.-U. Reissig, A. Goti, *Chem. Eur. J.*, 2013, **19**, 10595.
- [52] B. Busiak, *Praca magisterska, Uniwersytet Łódzki*, 2015.
- [53] R. Whitby, P. Kocieński, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1987, 906.
- [54] M.T. Fletcher, B.E. Mazomenos, J.H. Georgakopoulos, M.A. Konstantopoulou, B.J. Wood, J.J. De Voss, W. Kitching, *Chem. Commun.*, 2002, 1302.
- [55] H.J. Jung, J.S. Shim, J. Lee, Y. M. Song, K.C. Park, S.H. Choi, N.D. Kim, J.H. Yoon, P.T. Mungai, P. T. Schumacker, H.J. Kwon, *J. Biol. Chem.*, 2010, **285**, 11584.
- [56] G.O. Berger, M.A. Tius, *J. Org. Chem.*, 2007, **72**, 6473.

Praca wpłynęła do Redakcji 9 grudnia 2015

SIECIOWANIE SAMOPRZYLEPNYCH KLEJÓW SILIKONOWYCH

CROSSLINKING OF SILICONE PRESSURE-SENSITIVE ADHESIVES

Adrian Krzysztof Antosik, Zbigniew Czech

*Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie,
Wydział Technologii i Inżynierii Chemicznej,
ul. Pułaskiego 10, 70-322 Szczecin
e-mail: lunatyk88@interia.pl*

Abstract

Wstęp

1. Silikonowe kleje samoprzylepne
2. Sieciowanie samoprzylepnych klejów
 - 2.1. Sieciowanie termiczne
 - 2.2. Sieciowanie promieniowaniem ultrafioletowym (UV)
3. Sieciowanie samoprzylepnych klejów silikonowych

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane



Mgr. inż. Adrian Krzysztof Antosik w roku 2012 ukończył studia inżynierskie na Wydziale Technologii i Inżynierii Chemicznej, specjalność polimery, w Zachodniopomorskim Uniwersytecie Technologicznym w Szczecinie, w 2013 ukończył studia magisterskie na Wydziale Inżynierii Materiałowej i Mechatroniki, specjalność Przetwórstwo Tworzyw Sztucznych w Zachodniopomorskim Uniwersytecie Technologicznym w Szczecinie. Jest doktorantem w Instytucie Technologii Chemicznej Organicznej w Zachodniopomorskim Uniwersytecie Technologicznym w Szczecinie.



Prof. dr hab. inż. Zbigniew Czech jest kierownikiem Laboratorium Klejów i Materiałów Samoprzylepnych Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie. Jest absolwentem Politechniki Szczecińskiej, doktorat w 1981 r., habilitacja w 2004 r. Od 1981 do 2002 r. zatrudniony w Firmach: Lohmann (Niemcy), UCB (Belgia) oraz Chemitec (Niemcy). Jest autorem ponad 500 publikacji naukowych oraz 100 patentów.

ABSTRACT

Pressure-sensitive adhesives (PSAs) represent a system that actually dates back to the invention of the self-adhesive articles in 1935 when R. Stanton Avery produced the first coating unit using a wooden cigar box with two holes cut in the bottom. PSAs can be defined as a special category of adhesive which in dry form are permanently tacky at room temperature [1–4].

Since 1960s, silicone pressure-sensitive adhesives have found many uses. They are used in industrial plants, as tapes for joining materials with low surface energy, as well as in the sectors of electrical and electronic, medical care, health care and automotive industry. For about 10 years there has been great interest in new uses for the silicone PSA, particularly for medical and industrial belts. The above examples describe a growing range of potential commercial applications of silicone pressure-sensitive adhesives. Silicone pressure-sensitive adhesives typically consist of large segments of the silane-functional silicone polymers and silicone resins (MQ). It is well known that silicone pressure-sensitive adhesives because of their unique properties are special-purpose products. The combination of the properties of silicones such as high flexibility of connections Si-O-Si, low intermolecular interaction, low surface tension, excellent thermal stability and transparency for UV radiation, excellent electrical properties, high chemical resistance and weather resistance makes silicone adhesives have improved properties compared to other typical polymeric organic adhesives. Due to the low surface tension of silicone adhesives, adhesive is easily spread on the surface of various materials [4–9].

The properties of silicone pressure sensitive adhesives (Si-PSA) crosslinking thermally by organic peroxides (according to a radical mechanism) depend on the type and concentration of crosslinker used. Benzoyl peroxide (BPO) and 2,4-dichlorobenzoyl peroxide (DCIBPO) are the most commonly used peroxides the industry. Increasing the content of BPO or DCIBPO in a predominantly affects significantly increase the cohesion, while reducing the adhesion of tested adhesives [1, 5, 6]. With the market testing of pressure sensitive adhesives and literature studies clearly show that there were no studies to date on the process of UV-curing silicone pressure sensitive adhesives; and there is no sales sided adhesive tapes, silicone crosslinked by UV radiation.

Keywords: pressure-sensitive adhesives, polymer, silicone pressure-sensitive adhesives

Słowa kluczowe: kleje samoprzylepne, polimery, silikonowe kleje samoprzylepne

WSTĘP

Kleje samoprzylepne (PSA) to grupa klejów na bazie wielkocząsteczkowych polimerów cechujących się dobrą (spełniającą wymogi przemysłowe) adhezją oraz kohezją. Podstawową różnicą pomiędzy PSA a innymi rodzajami klejów są niezmienne właściwości klejące w szerokim zakresie temperaturowym w czasie użytkowania, doskonała odporność na starzenie oraz stały poziom wytrzymałości na odrywanie. Historia klejów samoprzylepnych sięga wynalazku R. Stanton Avery z 1935 roku, w którym otrzymano samoprzylepny produkt wykorzystując do jego produkcji pudełko po cygarach z dwoma wyciętymi otworami [1–4]. Spośród klejów samoprzylepnych na szczególną uwagę zasługują kleje samoprzylepne na bazie silikonów (Si-PSA). Powszechnie wiadomo, że kleje silikonowe są specjalistycznymi wyrobami o szczególnym zastosowaniu [5].

1. SILIKONOWE KLEJE SAMOPRZYLEPNE

Silikonowe kleje samoprzylepne składają się zazwyczaj z dużych segmentów silano-funkcyjnych polimerów silikonowych oraz żywic silikonowych (MQ). Kombinacja właściwości silikonów, takich jak wysoka elastyczność połączeń Si–O–Si, niewielkie oddziaływanie międzycząsteczkowe, niskie napięcie powierzchniowe, doskonała stabilność termiczna oraz transparentność dla promieniowania UV, doskonałe właściwości elektryczne, duża odporność chemiczna oraz odporność na warunki atmosferyczne sprawia, że kleje silikonowe posiadają lepsze właściwości w porównaniu do innych typowych polimerowych klejów organicznych. Ze względu na niskie napięcie powierzchniowe samoprzylepne kleje silikonowe łatwo rozprzodają się na powierzchni różnorodnych materiałów. Ze względu na brak negatywnego oddziaływania na skórę ludzką znalazły one zastosowanie do produkcji plastrów i innych wyrobów medycznych. Samoprzylepne kleje silikonowe wykazują doskonałe właściwości barierowe dla jonów, a polimery silikonowe – jako kapsułki doustne znajdują się na nieaktywnej liście FDA w kapsułkach doustnych i preparatach zobojętniających kwas. Przeprowadzane badania u ludzi nie wykazały negatywnego wpływu silikonowych klejów samoprzylepnych oraz polimerów silikonowych wykorzystywanych przy produkcji doustnych kapsułek na organizm ludzki [4–6].

Od chwili wprowadzenia na rynek w 1960, silikonowe kleje samoprzylepne znalazły wiele zastosowań. Stosuje się je w skali przemysłowej, jako taśmy do łączenia materiałów o niskiej energii powierzchniowej, a także w sektorach elektrycznym i elektronicznym, opieki medycznej i zdrowotnej oraz przemyśle samochodowym. Od około 10 lat obserwuje się duże zainteresowanie nowymi zastosowaniami dla silikonowych PSA, zwłaszcza do taśm medycznych i przemysłowych. Powyższe przykłady opisują rosnący zakres potencjalnych zastosowań komercyjnych silikonowych klejów samoprzylepnych [6–9].

2. SIECIOWANIE SAMOPRZYLEPNYCH KLEJÓW

Proces sieciowania klejów samoprzylepnych ma na celu zwiększenie kohezji kleju, która obok adhezji i kleistość decyduje o przeznaczeniu gotowego produktu samoprzylepnego i uważana jest za istotne kryterium decydujące o zastosowaniu klejów samoprzylepnych. W dużej mierze od rodzaju oraz ilości zastosowanego środka sieciującego, a także od użytej metody sieciowania zależą fizykochemiczne i mechaniczne właściwości klejów samoprzylepnych, takie jak adhezja, kohezja i kleistość. Kohezja klejów samoprzylepnych po usieciowaniu zwiększa się, a adhezja i kleistość ulegają zmniejszeniu. W technologii klejów samoprzylepnych powszechnie stosowane są następujące związki i metody sieciowania [10, 11, 12]:

- wielofunkcyjne izocyjany, np. diizocyjanian toluenu, diizocyjanian heksametylenu;
- wielofunkcyjne monomery, np. akrylan 1,4-butanodiolu, eter allilowoinyloowy;
- wielofunkcyjne etylenoiminy oraz propylenoiminy (pochodne 2-metyloazyrydyny);
- sole metali kwasów organicznych, np. tytaniany, cyrkoniany;
- chelaty metali, np.: acetyloacetonian żelaza, acetyloacetonian glinu;
- nadtlenki organiczne i tlenki metali;
- kompleksy platyny;
- żywice aminowe;
- promieniowanie UV;
- strumień elektronów.

2.1. SIECIOWANIE TERMICZNE

Sieciowanie termiczne klejów samoprzylepnych polega na tworzeniu się wewnątrzcząsteczkowych wiązań w łańcuchu polimerów oraz pomiędzy nimi, prowadzących do powstania wewnątrzcząsteczkowych sieci w kompozycji, na drodze reakcji grup końcowych (grup funkcyjnych) wybranego związku (lub związków) sieciującego z grupami funkcyjnymi lub wiązaniami nienasyconymi polimeru stosowanego jako klej samoprzylepny, pod wpływem wysokiej temperatury jaki poprzez sieciowanie według mechanizmu rodnikowego, który jest inicjowany w wysokiej temperaturze [5, 6, 10].

2.2. SIECIOWANIE PROMIENIOWANIEM ULTRAFIOLETOWYM (UV)

Podstawową zasadą sieciowania klejów za pomocą promieniowania ultrafioletowego jest konwersja promieniowania UV w energię chemiczną. Sieciowanie polimerów za pomocą promieniowania ultrafioletowego może zachodzić według mechanizmu kationowego lub rodnikowego. W przypadku gdy proces sieciowania zachodzi według mechanizmu rodnikowego, polimeryzację wiązań nienasyconych obecnych w łańcuchu polimeru wywołują cząsteczki zwane wolnymi rodnikami, które powstają na skutek rozpadu ich prekursorów, tj. najczęściej ketonów aromatycznych. Warunkiem koniecznym do zapoczątkowania reakcji sieciowania według mechanizmu rodnikowego jest obecności odpowiednich fotoinicjatorów. Sieciowanie polimerów według mechanizmu kationowego polega na otwarciu pierścieni epoksydowych lub reakcjach grup winyloeterowych obecnych w łańcuchu polimeru. Typowe kleje przeznaczone do sieciowania za pomocą UV zawierają fotoreaktywny polimer, fotoinicjatory lub fotoreaktywne prepolimery, fotoreaktywne oligomery lub rozcieńczalniki reaktywne, które mają zdolność nie tylko regulacji lepkości kompozycji, ale także ze względu na obecność w ich cząsteczkach wiązań nienasyconych przyczyniają się w procesie sieciowania do powstania dodatkowych sieci polimerowych (wiązań wewnątrzcząsteczkowych w polimerze) [10, 13, 14].

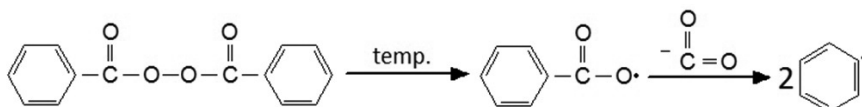
3. SIECIOWANIE SAMOPRZYLEPNYCH KLEJÓW SILIKONOWYCH

Właściwości silikonowych klejów samoprzylepnych (Si-PSA) sieciowanych termicznie organicznymi nadtlenkami (według mechanizmu rodnikowego) zależą od rodzaju oraz stężenia zastosowanych związków sieciujących. Zwiększenie zawartości nadtlenku benzoilu lub nadtlenku dichlorobenzoilu w układzie wpływa przeważnie na znaczne zwiększenie kohezji, przy jednoczesnym zmniejszeniu adhezji badanego kleju. Powszechnie wiadomo, że samoprzylepne kleje silikonowe są specjalistycznymi wyrobami o szczególnym zastosowaniu. Ogólnie przyjmuje się, iż samoprzylepne taśmy jednostronnie klejące muszą spełniać takie podstawowe właściwości, jak adhezja >10 N/25 mm; kleistość >8 N/25 mm oraz kohezja >72 h, aby mogły być rozpatrywane pod względem specjalnych zastosowań w wielu gałęziach przemysłowych. Właściwości te można otrzymać poprzez utrzymanie balansu pomiędzy adhezją oraz kleistością, a kohezją silikonowego filmu klejowego, który jest bezpośrednim wynikiem odpowiedniego stopnia usieciowania samoprzylepnych klejów [1, 5, 6].

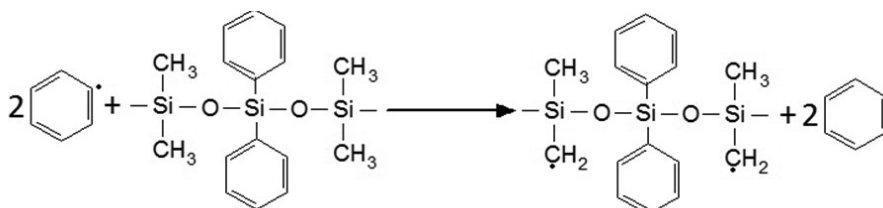
Jednym ze sposobów sieciowania silikonowych klejów samoprzylepnych zawierających grupy fenylowe i metylowe jest sieciowanie termiczne w zakresie temperaturowym 120–150°C za pomocą nadtlenków organicznych. Najczęściej stosowanymi nadtlenkami w przemyśle jest nadtlenek benzoilu (BPO) i nadtlenek 2,4-dichlorobenzoilu (DCIBPO). Pozwalają one na kontrolę reakcji sieciowania (a tym samym na równowagę pomiędzy adhezją i kohezją) poprzez odpowiednie

dozowanie nadtlenu, co determinuje stopień usieciowania otrzymanego filmu klejowego. W zależności od potrzeb i zastosowania otrzymywanych taśm samoprzylepnych na bazie samoprzylepnych klejów silikonowych używa się od 0 do 4% wag. nadtlenu w przeliczeniu na masę polimeru w kompozycji [5, 6, 9, 15–17].

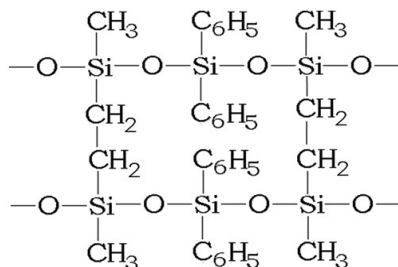
I – tworzenie wolnych rodników



II – oderwanie atomów wodoru



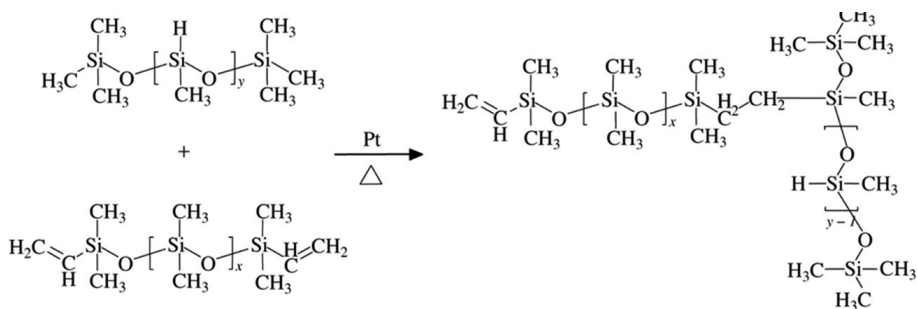
III – rekombinacja i sieciowanie



Rysunek 1. Sieciowanie Si-PSA według mechanizmu rodnikowego
Figure 1. Crosslinking of Si-PSAs according to a radical mechanism

W ostatniej dekadzie w wielu patentach opisywane jest dodawanie „dodatków utwardzalnych” do kompozycji samoprzylepnych klejów na bazie silikonów. Sieciowanie za pomocą tych związków jest możliwe, jeśli w skład kompozycji polimerowej wchodzi silikon z grupami funkcyjnymi silikonowo-winyłowymi (Si-Vi) i silikonowo-wodorowymi (Si-H). Zwykle te silikony wykazują niższą masę cząsteczkową i są używane w przypadku tradycyjnych rozpuszczalnikowych systemów SiPSA. Dodatek związku kompleksowego platyny do takich kompozycji klejowych umożliwia sieciowanie ich termicznie, w wyniku czego powstaje usieciowany film klejowy. Badania wykazały, iż proces sieciowania powlekanych kompozycji klejowych może zachodzić w kanale suszącym o relatywnie niskiej temperaturze (100–150°C).

Proces sieciowania związkami platyny nie generuje produktów ubocznych, jest on bezpieczny dla środowiska. Skuteczność sieciowania jest ściśle związana z ilością grup funkcyjnych w kompozycji polimerowej (Si-Vi i Si-H). Zwykle związki kompleksowe platyny są dodawane wraz z rozcieńczalnikami organicznym i dodatkami do specyficznych wymagań, np. obniżenie współczynnika rozszerzalności cieplnej lub poprawy odporności na wysoką temperaturę [9, 15–17].



Rysunek 2. Sieciowanie Si-PSA za pomocą związków platyny

Figure 2. Crosslinking of Si-PSA via platinum-catalyzed

Z przeprowadzonych badań rynku klejów samoprzylepnych oraz studiów literaturowych wynika jednoznacznie, że nie prowadzono dotychczas badań nad procesem sieciowania UV samoprzylepnych klejów silikonowych; brak także w sprzedaży jednostronnych taśm klejących silikonowych sieciowanych promieniowaniem UV.

PODSUMOWANIE

Spośród klejów samoprzylepnych na szczególną uwagę zasługują kleje samoprzylepne na bazie silikonów. Powszechnie wiadomo, że silikonowe kleje samoprzylepne ze względu na swoje unikalne właściwości są produktami specjalnego zastosowania. Składają się zazwyczaj z dużych segmentów silano-funkcyjnych polimerów silikonowych oraz żywic silikonowych. Kombinacja właściwości silikonów, takich jak wysoka elastyczność połączeń Si–O–Si, niewielkie oddziaływanie międzycząsteczkowe, niskie napięcie powierzchniowe, doskonała stabilność termiczna oraz transparentność dla promieniowania UV, doskonałe właściwości elektryczne, duża odporność chemiczna oraz odporność na warunki atmosferyczne sprawia, że kleje silikonowe posiadają lepsze właściwości (adhezja, kohezja oraz kleistość) w porównaniu do innych typowych polimerowych klejów organicznych [4–6].

Sieciowanie termiczne klejów samoprzylepnych na bazie silikonów polega na tworzeniu się wewnątrzcząsteczkowych wiązań w łańcuchu polimerów oraz pomiędzy nimi, prowadzących do powstania wewnątrzcząsteczkowych sieci w kompozycji, na drodze reakcji grup końcowych (grup funkcyjnych) wybranego związku (lub związków) sieciującego z grupami funkcyjnymi lub wiązaniami nienasyconymi poli-

meru przeznaczanego na klej samoprzylepny, pod wpływem wysokiej temperatury jaki poprzez sieciowanie według mechanizmu rodnikowego, który jest inicjowany w wysokiej temperaturze [5, 6, 10]. W literaturze i sprzedaży istnieją liczne odniesienia do używania w kompozycjach klejów silikonowych nadtlenków organicznych oraz związków platyny (tych ostatnich liczne odniesienia znajdują się w patentach). Najczęściej stosowanymi nadtlenkami w przemyśle jest nadtlenek benzoilu (BPO) oraz nadtlenek 2,4-dichlorobenzoilu (DCIBPO). Z przeprowadzonych badań rynku klejów samoprzylepnych oraz studiów literaturowych wynika jednoznacznie, że nie prowadzono dotychczas badań nad procesem sieciowania UV samoprzylepnych klejów silikonowych; brak także w sprzedaży jednostronnych taśm klejących silikonowych sieciowanych promieniowaniem UV. Zespół Z. Czech i A. K. Antosik przeprowadził pierwsze pomyślnie rokujące próby w tej sferze, badania te są związane z pracą A. K. doktorską Antosika.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] A.K. Antosik, Z. Czech, *Wiad. Chem.*, 2015, **69**, 111.
- [2] Z. Czech, *Europ. Polym. Int.*, 2004, **40**, 2221.
- [3] A. Butwin, Z. Czech, *ABiD*, 2009, **14**, 8.
- [4] B. Pang, Ch.-M.Ryu, H.-II Kim, *J. Appl. Polym. Sci*, 2012, **129**, 276.
- [5] A.K. Antosik, P. Bednarczyk, Z. Czech, *Chemik*, 2015, **69**, 12.
- [6] A.K. Antosik, P. Ragańska, Z. Czech, *Polimery*, 2014, **59**, 792.
- [7] S. Mecham, A. Sentman, M. Sambasivam, *J. App. Polym. Sci.*, 2010, **116**, 3265.
- [8] G. Tolia, S.K. Li, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2012, **82**, 518.
- [9] F. Sun, Y. Hu, H.-G. Du, *J. App. Polym. Sci.*, 2012, **125**, 3532.
- [10] Z. Czech, A. Butwin, *Wiad. Chem.*, 2009, **63**, 269.
- [11] Z. Czech, M. Wojciechowicz, *Eur. Polym. J.*, 2006, **42**, 2153.
- [12] Z. Czech, *Int. J. Adhes. Adhes.*, 2007, **27**, 49.
- [13] Z. Czech, *Eur. Polym. J.*, 2004, **40**, 2221.
- [14] Z. Czech, *Int. J. Adhes. Adhes.*, 2007, **27**, 195.
- [15] S. Mecham, A. Sentman, M. Sambasivam, *J. Appl. Polym. Sci.*, 2010, **116**, 3265.
- [16] G. Tolia, S.K. Li, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2012, **82**, 518.
- [17] S.B. Lin, L.D. Durfee, R.A. Ekeland, J. McVie, G.K. Schalau, *J. Adhes. Sci. Tech.*, 2007, **21**, 605.

Praca wpłynęła do Redakcji 10 stycznia 2016

**NAJNOWSZE KIERUNKI POSZUKIWAŃ
CZĄSTECZEK O AKTYWNOŚCI
PRZECIWPRAŃKOWEJ**

**RECENT RESEARCH OF COMPOUNDS WITH
ANTITUBERCULAR ACTIVITY**

Paulina Płoszaj¹, Agnieszka Piwowar², Stanisław Ryng¹

¹ *Katedra i Zakład Chemii Organicznej, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich
ul. Borowska 211 A, 50-556 Wrocław*

² *Katedra i Zakład Toksykologii, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich
ul. Borowska 211, 50-556 Wrocław
e-mail: paulina.ploszaj@umed.wroc.pl*

Abstract

Wykaz stosowanych skrótów

Wprowadzenie

1. Cząsteczki w fazie badań klinicznych
 - 1.1. Cząsteczki w IV fazie badań klinicznych
 - 1.2. Cząsteczki w III fazie badań klinicznych
 - 1.3. Cząsteczki w II fazie badań klinicznych
2. Wybrane cząsteczki w fazie badań podstawowych
 - 2.1. Analogi izoniazydu
 - 2.2. Pochodne tienylo-pirymidyny
 - 2.3. Pochodne imidazo-tiadiazolo-benzimidazolu
 - 2.4. Pirymidynowe pochodne benzokumaryn

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane



Mgr inż. Paulina Płoszaj jest absolwentką Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej. Od 2009 roku jest asystentem w Katedrze i Zakładzie Chemii Organicznej Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu. W pracy badawczej zajmuje się syntezą i oznaczaniem aktywności biologicznej pochodnych hydrazynu kwasu 5-amino-3-metylo-izoksazolo-4-karboksylowego.



Dr hab. Agnieszka Piwowar, prof. nadzw. jest absolwentką Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Analityki Medycznej Akademii Medycznej we Wrocławiu. Pracę naukową i dydaktyczną rozwijała w Katedrze i Zakładzie Biochemii Farmaceutycznej, a obecnie jest zatrudniona na stanowisku prof. nadzw. w Katedrze i Zakładzie Toksykologii Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu. Kierunki zainteresowań naukowych dotyczą badania mechanizmów i poszukiwania nowych markerów w diagnozowaniu, monitorowaniu przebiegu i ocenie skuteczności terapii wybranych chorób cywilizacyjnych (cukrzyca, zespół metaboliczny, choroby sercowo-naczyniowe, niepłodność męska, choroby autoimmunologiczne, nowotwory) oraz oceny aktywności biologicznej nowych związków (jak pochodne hydrazynu kwasu 5-amino-3-metylo-izoksazolo-4-karboksylowego) i badania ich mechanizmów (w tym cytotoksycznego, wolnorodnikowego) i działania (m.in. antibakteryjnego i przeciwzapalnego) oraz możliwości wykorzystania tych związków w terapii chorób i zakażeń bakteryjnych.



Prof. dr hab. Stanisław Ryng jest absolwentem Wydziału Farmaceutycznego Akademii Medycznej we Wrocławiu. Pracę naukową w ostatnich 27 latach związał z Uniwersytetem Medycznym im. Piastów Śląskich we Wrocławiu. Publikuje, patentuje i recenzuje z afiliacją Tej Uczelni. Kierunki prac naukowych obejmują obszary: syntezy, aktywności biologicznych i zależności pomiędzy strukturą i aktywnością biologiczną w zakresach terapeutycznych immunosupresyjnych, immunostymulujących oraz immunomodulujących, a także przeciwnowotworowych i przeciwzapalnych.

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) caused by *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) remains a leading cause of morbidity and mortality in developing countries [1]. With the discovery of chemotherapeutic agents in the 1940s and implementation of directly-observed therapy short course (DOTS) in the 1980s, it was believed that TB would decline globally. Although a declining trend was observed in most developed countries, this was not evident in other parts of the world [2]. In addition, the rate of successful treatment has been compromised in recent years due to the increasing prevalence of multidrug-resistant (MDR-) and extensively drug-resistant TB (XDR-TB) strains [3].

Accordingly, significant efforts have been made to discover and develop new treatment modalities against TB. This article serves as a summary of the most recent developments in search for novel anti-tubercular compounds. Here we focus on reviewing the results of basic research and clinical trials obtained in 2015 including: a) the phase IV clinical trials conducted for newly developed: bedaquiline, delamanid, clofazimine (previously registered for treatment of leprosis) b) phase III for fixed-dose combination of existing drugs: pretomanid – moxifloxacin – pyrazinamide) and c) the phase II clinical trials for sutezolid, AZD5847 and SQ109 [4]. All newly developed compounds used in these studies have been briefly characterized and their synthesis pathways fully described. In addition we review the most recent and promising results on nicotinic acid hydrazides, thienyl-pyrimidines imidazole-thiadiazole-benzimidazole and benzocoumarine derivatives presenting their synthesis pathways, most active chemical structures and their potential applications. Throughout this paper the ultimate direction for new drug development strategies, in search for the anti-tubercular agents, have been reviewed.

Keywords: tuberculosis, anti-tubercular compounds

Słowa kluczowe: gruźlica, związki przeciwpłaatkowe

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

TB	– gruźlica (ang. <i>Tuberculosis</i>)
MTB	– <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MDR-TB	– gruźlica wielolekooporna na leki I-go rzutu (ang. <i>multidrug resistant tuberculosis</i>)
XDR-TB	– gruźlica wielolekooporna na leki I-go i II-go rzutu (ang. <i>extensively drug resistant tuberculosis</i>)
HIV	– ludzki wirus niedoboru odporności (ang. <i>Human Immunodeficiency Virus</i>)
INH	– izoniazyd
EMB	– etambutol
MIC	– minimalne stężenie hamujące (ang. <i>minimal inhibitory concentration</i>)
DMF	– dimetyloformamid
TEA	– trietanolamina
LDA	– diizopropyloamidek litu (ang. <i>lithium diisopropylamide</i>)
THF	– tetrahydrofuran (ang. <i>tetrahydrofuran</i>)
DBU	– 1,8-diazabicyklo(5.4.0)undek-7-en
MsCl	– chlorek kwasu metanosulfonowego (ang. <i>methanesulfonyl chloride</i>)
BINAP	– 2,2'-bis(difenylofosfino)-1,1'-binaftalen (ang. <i>2,2'-bis(diphenylphosphino)-1,1'-binaphthalene</i>)
DCM	– dichlorometan (ang. <i>dichloromethane</i>)
ACE-CI	– chloromrówczan chloroetylu (ang. <i>1-chloroethyl chloroformate</i>)
DIAD	– ester diizopropylowy kwasu azodikarboksylowego (ang. <i>diisopropyl azodicarboxylate</i>)
Me	– metyl (ang. <i>methyl</i>)
Et	– etyl (ang. <i>ethyl</i>)
Bu	– butyl (ang. <i>buthyl</i>)
Ph	– fenyl (ang. <i>phenyl</i>)
KatG	– katalaza-peroksydaza (ang. <i>catalase-peroxidase</i>)
NAT	– N-acetylotransferaza

WPROWADZENIE

Gruźlica jest chorobą zakaźną wywołowaną przez prątki *Mycobacterium tuberculosis* (MTB). Ta kwasoodporna bakteria należy do tlenowców. Głównym składnikiem ściany komórkowej prątków są związki lipidowe. Ponad 60% masy ściany komórkowej stanowią lipidy, które nie są spotykane u innych grup mikroorganizmów. Skład ten determinuje właściwości prątków gruźlicy (słabe barwienie metodą Gramma, długi czas wzrostu, oporność na czynniki środowiskowe i leczenie) [5].

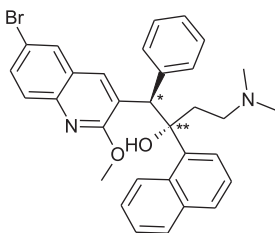
Gruźlica jest drugą przyczyną zgonów na świecie, spowodowaną przez jeden patogen. W 2013 roku około 1,5 miliona ludzi zmarło z powodu gruźlicy, a 9 milionów zostało zakażonych [1]. Statystycznie u 1 na 10 zarażonych *Mycobacterium tuberculosis* rozwinie się gruźlica. Dodatkowo osoby znacznie bardziej narażone na zachorowanie to: zarażeni wirusem HIV (ang. *Human Immunodeficiency Virus*), cukrzycy, palacze tytoniu oraz osoby niedożywione [6]. Gruźlica jest chorobą uleczalną, w której od lat stosuje się leki standardowe. Do leków I-rzutu należą: izoniazyd (INH), ryfampicyna, pirazynamid, etambutol (EMB) i streptomycyna. W przypadku rozwinięcia lekooporności, do leczenia włączane są leki II-rzutu: etionamid, cykloseryna, kapreomycyna, kwas paraaminosalicylowy, amikacyna, kanamycyna, fluorochinolony, klarytromycyna i inne [7]. To właśnie narastający problem lekooporności szczepów *Mycobacterium tuberculosis* jest głównym powodem poszukiwań nowych sposobów terapii. Znanym problemem jest gruźlica wielolekooporna (ang. *multidrug resistant tuberculosis*, MDR-TB) definiowana, jako oporność na co najmniej dwa leki stosowane w terapii podstawowej (np. izoniazyd i ryfampicynę) [8]. W ostatnich latach istotnym problemem terapeutycznym jest również gruźlica z opornością wielolekową o rozszerzonej oporności prątków (ang. *extensively drug resistant tuberculosis*, XDR-TB) na izoniazyd, ryfampicynę, chinoliny oraz aminoglikozydy lub kapreomycynę [9]. Fakt, że w ostatnich 40 latach nie wprowadzono do lecznictwa nowego, w pełni skutecznego i bezpiecznego leku przeciwko gruźlicy oraz narastająca oporność szczepów, potwierdza jak złożony jest to problem [10].

1. CZĄSTECZKI W FAZIE BADAŃ KLINICZNYCH

W chwili obecnej prowadzone są badania nad siedmioma cząsteczkami (stan na styczeń 2016). Trzy z nich znajdują się w IV fazie badań klinicznych (bedakwilina, delamanid, klofazymina). W fazie III bedakwilina i delamanid są badane w połączeniu z zoptymalizowaną terapią podstawową (ang. *Optimized Background Regimen*); testuje się również połączone dawkowanie pretomanidu z moksyflokscyną i pirazynamidem. W fazie II badane są obecnie trzy cząsteczki (sutezolid, AZD5847 oraz SQ109) [4].

1.1. CZĄSTECZKI W IV FAZIE BADAŃ KLINICZNYCH

Bedakwilina, diarylowa pochodna chinoliny, przedstawiona na Rysunku 1, aktywnie hamuje syntezę mykobakteryjnej syntetazy ATP i układ pompy protonowej. W badaniach *in vitro* potwierdzono jej ni zwykle wysoką skuteczność (minimalne stężenie hamujące (MIC) na poziomie 0,06 µg/ml) [11]. W badaniach klinicznych, potwierdzono skuteczność bedakwiliny wobec prątków wielolekoopornych [12]. Cząsteczka została wprowadzona do leczenia w Europie w 2013, a w Polsce rok później. Jednakże biorąc pod uwagę skutki uboczne, takie jak zwiększona śmiertelność, wzrost aktywności enzymów wątrobowych oraz wydłużenie odcinka QT w zapisie akcji serca [13], jej stosowanie nie jest rozpowszechnione.

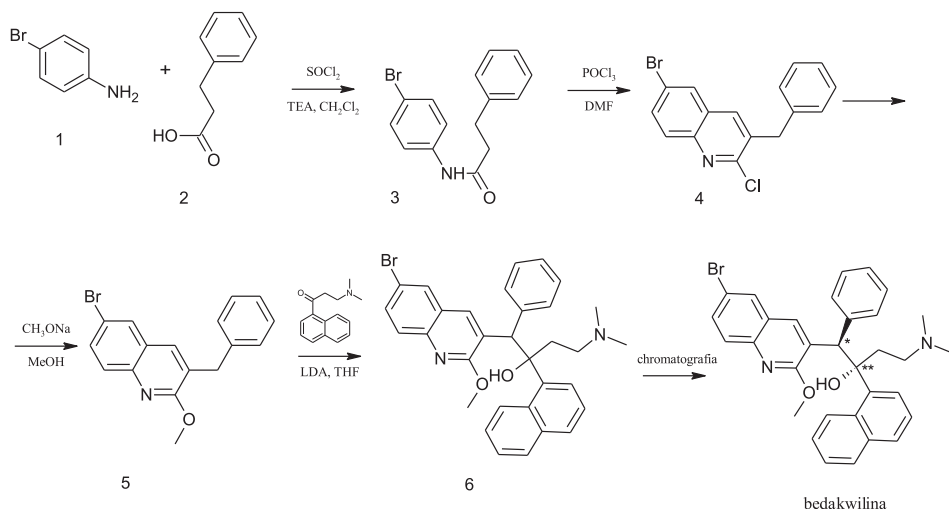


(*R,**S)-1-(6-Bromo-2-metoksy-3-chinolino)-4-dimetyloamino-2-(1-naftylo)-1-fenylo-butan-2-ol

Rysunek 1. Bedakwilina

Figure 1. Bedaquiline

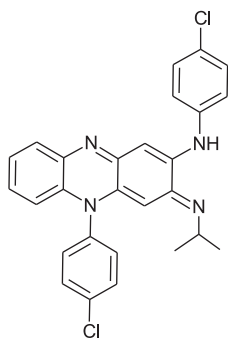
Synteza bedakwiliny z kwasu 3-fenylopropionowego (2) i *p*-bromoaniliny (1) przebiega w pięciu etapach (Schemat 1). Pierścienie chinolonowe otrzymuje się w reakcji Vilsmeier’a–Hacka, natomiast końcowa kondensacja prowadzi do otrzymania czterech stereozomerów rozdzielanych dzięki chromatografii kolumnowej i chiralnej chromatografii [14, 15].



Schemat 1. Synteza bedakwiliny

Scheme 1. Bedaquiline synthesis

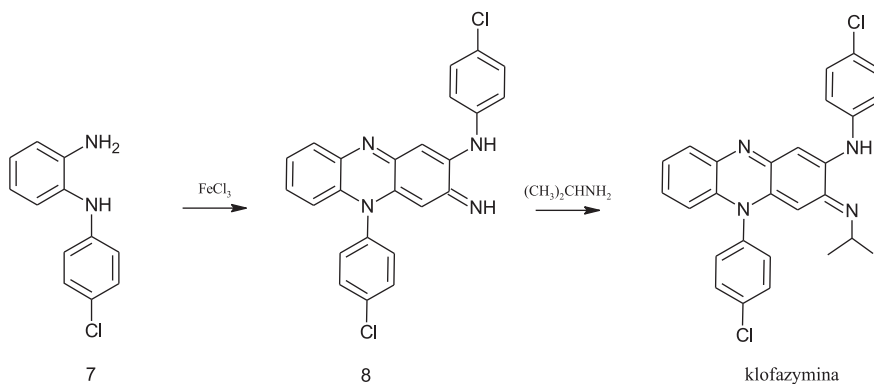
Klofazymina, pochodna iminofenazyny (przedstawiona na Rysunku 2), znana jako lek stosowany w terapii trądu, znalazła nowe zastosowanie w leczeniu gruźlicy [16]. Kluczowym elementem strukturalnym cząsteczki jest fenazyna z grupą alkiloiminową (izopropylloimina) w pozycji 2 oraz podstawniki fenylowe w pozycjach 3 i 10. Takie ułożenie grupy alkiloiminowej oraz odpowiedni halogen w cząsteczce, determinują efekt przeciwprątkowy [17, 18]. Mechanizm działania klofazyminy polega na blokowaniu syntezy bakteryjnego DNA poprzez wiązanie do zasady guaninowej [19]. Dodatkowo, klofazymina powoduje aktywację fosfolipazy A2 neutrofilii i uwolnienie lizofosfatydylocholiny oraz kwasu arachidonowego, co sprawia, że ma podobny mechanizm działania do interferonu gamma [20, 21]. W badaniach *in vitro* potwierdzono skuteczność przeciwprątkową klofazyminy (MIC na poziomie 0,03 µg/ml do 8 µg/ml w zależności od rodzaju szczepu) [22]. Jeszcze lepszy efekt uzyskano w połączeniach klofazyminy z etambutolem (MIC od 0,0625 µg/ml do 16 µg/ml [23]). Mimo pozytywnych wyników terapii klofazyminą u prawie 65% pacjentów, kliniczne zastosowanie cząsteczki jest ograniczone towarzyszącymi jej skutkami ubocznymi [24]. Nadmierna pigmentacja skóry notowana jest u ponad 80% pacjentów stosujących leczenie, a dolegliwości ze strony układu pokarmowego u 40–50% leczonych [25].

2-*p*-chloroanilino-5-*p*-chlorofenyllo-3,5-dihydro-3-izopropyllo-imino-fenazyzna

Rysunek 2. Klofazymina

Figure 2. Clofazimine

Synteza klofazyminy w pierwszym etapie przebiega poprzez utlenianie 2-(*p*-chloroanilino) aniliny (7) chlorkiem żelaza(III), a następnie podstawienie izopropylloaminą (Schemat 2) [26–28].

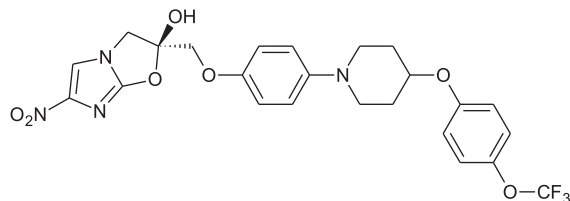


Schemat 2. Synteza klofazyminy

Scheme 2. Clofazimine synthesis

Delamanid, (OPC-67683) pochodna nitro-dihydro-imidazooksazolu (Rys. 3) jest inhibitorem syntezy kwasów mykotalowych [29]. Wiele nitro-heterocyklicznych pochodnych, jak 5- i 2- nitroimidazole oraz 5-nitrofurany posiada właściwości przeciwpierwotniakowe i przeciwbakteryjne lecz zwykle charakteryzują się one również działaniem mutagennym [30]. Również kilka pochodnych nitro-dihydroimidazolu, mimo obiecujących wyników badań przeciwprątkowych nie zostało wprowadzonych do badań klinicznych, ze względu na towarzyszący efekt mutagenny [31]. Delamanid w badaniach *in vitro* wykazał efekt hamujący wzrost prątków grzyźliczych (również tych wielolekoopornych) w zakresie stężeń 0,006–0,024 $\mu\text{g}/\text{ml}$ oraz brak efektów ubocznych, charakterystycznych dla tej grupy nitro-heterocyklicznych pochodnych [29]. Lek został warunkowo dopuszczony do lecznictwa w 2014

roku, potrzebne są jednak dane potwierdzające jego długoterminową skuteczność i bezpieczeństwo [32]. Pochodna różniąca się tylko brakiem podstawnika metylowego przy pierścieniu izoksazolowym to również dopuszczony w ostatnim czasie do leczenia cząsteczka PA-824, jako lek pretomanid.

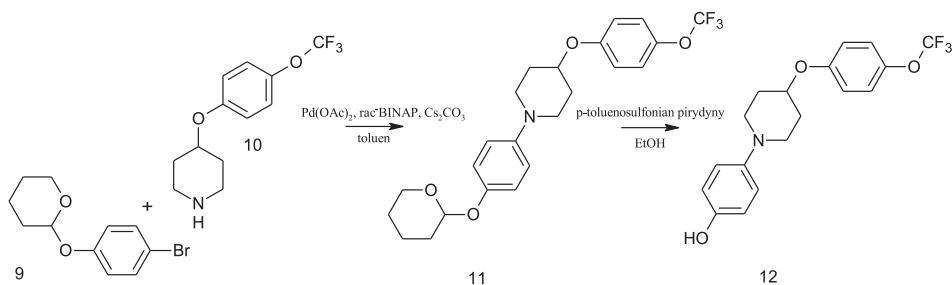


(2R)-2-metylo-6-nitro-2-[(4-{4-[4-(trifluorometoksy)fenoksy]-1-piperydynylo}-fenoksy)metylo]-2,3-dihydroimidazo[2,1-b][1,3]oksazol

Rysunek 3. Delamanid

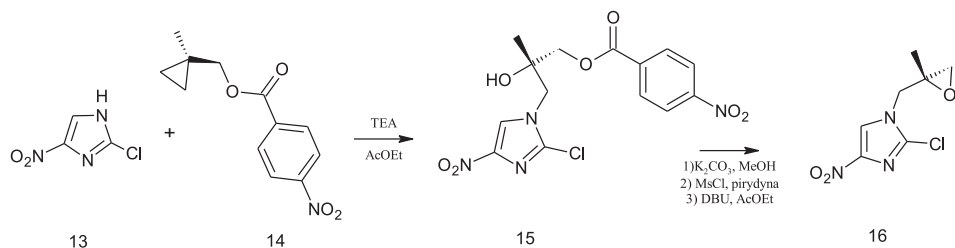
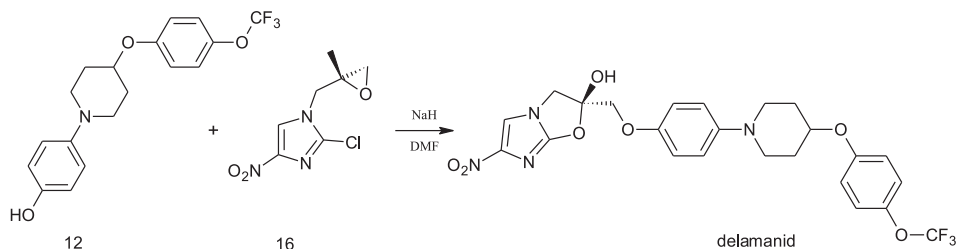
Figure 3. Delamanid

Synteza delamanidu jest złożona. W dwóch odrębnych ścieżkach otrzymuje się syntony (Schemat 3 i Schemat 4) ostatecznej syntezy delamanidu. Pierwszy z nich 4-[4-(4-trifluorometoksyfenoksy)piperydyn-1-ylo]fenol (**12**) otrzymuje się podczas arylicacji Buchwalda katalizowanej palladem, a następnie poprzez usunięcie zabezpieczającego tetrahydropiranu do uzyskania fenolu (**12**). Drugi z ostatecznych półproduktów (**16**) powstaje w reakcji podstawionego nitroimidazolu (**13**) z estrem epoksydowym kwasu *p*-nitrobenzoesowego (**14**), który następnie poddaje się cyklizacji z chlorkiem kwasu metanosulfonowego w środowisku pirydyny [33]. Na Schemacie 5 przedstawiono reakcję związków **12** i **16** oraz powstający w niej delamanid.



Schemat 3. Synteza półproduktu **12** do otrzymania Delamanidu

Scheme 3. Semi-substrate **12** synthesis required for Delamanide production

Schemat 4. Synteza półproduktu **16** do otrzymania DelamaniduScheme 4. Intermediate product **16** synthesis required for Delamanide production

Schemat 5. Synteza delamanidu

Scheme 5. Delamanid synthesis

1.2. CZĄSTECZKI W III FAZIE BADAŃ KLINICZNYCH

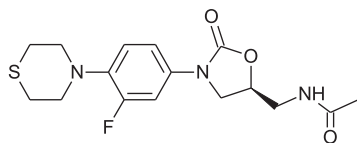
W fazie III badań klinicznych, opisane powyżej bedakwilina i delamanid są badane w połączeniu z zoptymalizowaną terapią podstawową (ang. *Optimized Background Regimen*).

Na tym samym etapie badań jest również połączone dawkowanie pretomanidu z moksyflokscyną i pirazynamidem.

1.3. CZĄSTECZKI W II FAZIE BADAŃ KLINICZNYCH

Sutezolid (PNU-100480) to syntetyczny związek z grupy oksazolidynonów (Rys. 4), w którym tiomorfolinowa pochodna zbudowana została na oksazolidynowym farmakoforze. Jedynie enancjomer *S* wykazuje działanie przeciwbakteryjne [34]. Sutezolid hamuje syntezę bakteryjnych białek poprzez wiązanie 23S rRNA w podjednostce 50S rybosomu [35]. Pierwszy związek tej grupy wprowadzony do leczenia – linezolid, znalazł zastosowanie w ciężkich zakażeniach bakteryjnych, takich jak szpitalne i pozaszpitalne zapalenie płuc [36, 37]. Sutezolid wykazywał podobne do linezolidu właściwości przeciwbakteryjne i przeciwpłatkowe *in vitro* (MIC \approx 1 $\mu\text{g/ml}$), jednak w badaniu *ex vivo* w hodowli z pełnej krwi obwodowej był znacznie bardziej skuteczny od linezolidu w modelu gruźlicy [38]. W badaniach

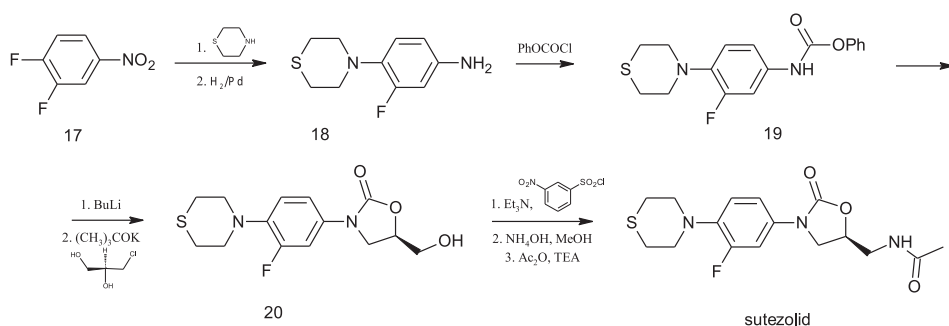
klinicznych I fazy potwierdzono skuteczność sutezolidu, nie wykazując jednocześnie skutków ubocznych obserwowanych dla linezolidu (neuropatia obwodowa i neuropatia nerwu wzrokowego, zmiany w obrazie hematologicznym krwi) [39, 40]. Obecnie prowadzone są rozszerzone badania nad sutezolidem – schematem dawkowania i oceną skuteczności [41].



N-(((5S)-3-[3-fluoro-4-(tiomorfolino-4-yl)fenylo]-2-okso-1,3-oksazolidyno-5 metylo)-acetamid

Rysunek 4. Sutezolid
Figure 4. Sutezolid

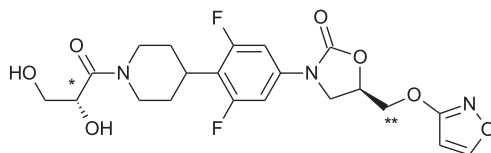
Synteza sutezolidu rozpoczyna się od 3,4-difluoro-nitrobenzenu (**17**), do którego przyłącza się tiomorfolinę, a następnie redukuje grupę nitrową do aminowej i przeprowadza w amid (**19**). W następnym etapie deprotonację azotu uzyskuje się tert-butanolanem litu, a cyklizację (*S*)-3-chloro-1,2-propanediolem. Pierwszorzędowy alkohol przeprowadza się przez aminę do finalnego produktu – sutezolidu (Schemat 6) [42, 43].



Schemat 6. Synteza sutezolidu
Scheme 6. Sutezolid synthesis

Podobnie jak Sutezolid, **AZD5847** należy do grupy oksazolidynonów. Jest fenyloowo-piperazynową pochodną 2-oksazolidionu, która analogicznie jak inne antybiotyki tej klasy blokują syntezę białek (Rys. 5). W cząsteczce obecne są dwa centra chiralne (*S, **R), jednak nie ma dowodów na jej izomeryzację *in vivo* [44]. Aktywność przeciwko szczepom *M. tuberculosis* H37Rv określono na 1 µg/ml [45]. Związek wykazuje również aktywność bakteriostatyczną na inne szczepy bakterii gram-dodatnich (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus spp.*, *Streptococcus pneumoniae*, *Corynebacterium spp*) [46]. W testach toksykologicznych wykazano nieznaczne zmiany obrazu hematologicznego krwi przy stosowaniu

AZD 5847, bez żadnego wpływu na szpik kostny. Nie stwierdzono również hepatotoksyczności, natomiast obserwowano wydłużenie odcinka QT w zapisie akcji serca [47].

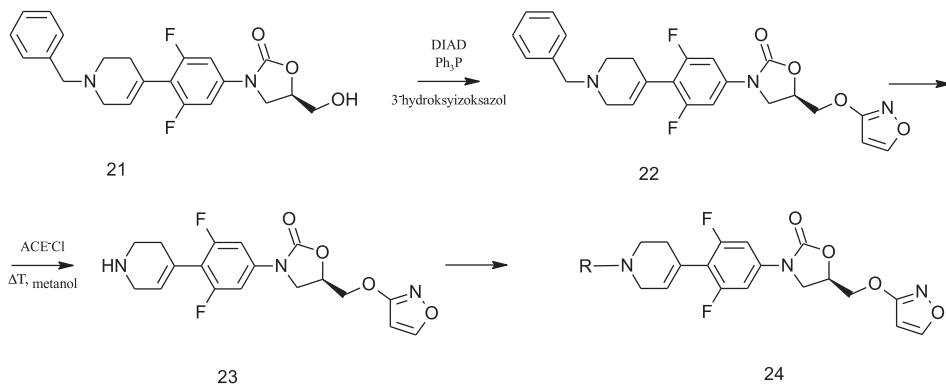


[(5R)-3-(4-{1-[(2S)-2,3-dihydroksypropano]-1,2,3,6-tetrahydropyridyn-4-yl})-3,5-difluorofenilo-5-[(isoksazoloksy-3-)metylo]-1,3-oksazolan-2-on

Rysunek 5. AZD5847

Figure 5. AZD5847

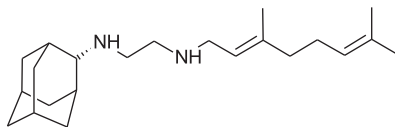
Synteza AZD5847 w literaturze przedmiotu nie jest w pełni opisana. Ogólnie przedstawiono ją na Schemacie 7 poniżej [48].



Schemat 7. Ogólny schemat syntezy AZD5847

Scheme 7. General procedure of AZD5847 synthesis

SQ109 jest 1,2-etylenodiaminową pochodną etambutolu (Rys. 6). Mechanizm działania cząsteczki opiera się na hamowaniu transportu MmpL3 – transportera odpowiedzialnego za dostarczanie kwasów mykolewowych do zewnętrznej warstwy ściany komórkowej *Mycobacterium tuberculosis* [49]. W badaniach przesiewowych, związek SQ109 uzyskał dobre wyniki hamowania wzrostu prątków (MIC 0,7–1,56 μM dla szczepów H37Rv) przy relatywnie niskiej toksyczności *in vitro* oraz *in vivo* [50]. Wstępne badania II fazy potwierdziły aktywność wobec prątków wielolekoopornych jak i tych o rozszerzonej oporności. Dodatkowo SQ109 działa na prątki sfagocytowane przez makrofagi na poziomie równym izoniazydowi i znacznie lepiej niż etambutol [51]. Wstępne badania potwierdziły jeszcze lepszą skuteczność SQ109 w terapii łączonej z innymi nowymi lekami (SQ109 + bedakwilina oraz SQ109 + sutezolid) [52, 53].

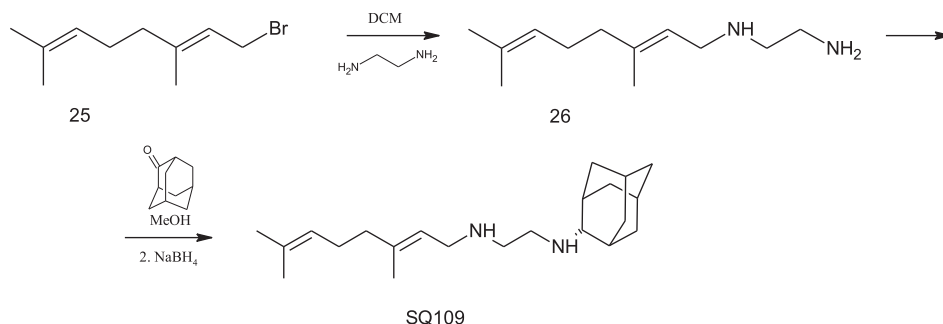


N-Adamantan-2-ylo-N'-((E)-3,7-dimetylo-octa-2,6-dienylo)-etano-1,2-diamina

Rysunek 6. SQ109

Figure 6. SQ109

Syntezę SQ109 przeprowadza się z oktadienu (25), który podstawia się etylenodiaminą. Następnie podstawia amantanonem i redukuje [54–56]. Zapis syntezy przedstawia Schemat 8 poniżej:



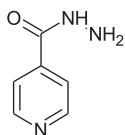
Schemat 8. Synteza SQ109

Scheme 8. SQ109 synthesis

2. WYBRANE CZĄSTECZKI W FAZIE BADAŃ PODSTAWOWYCH

2.1. ANALOGI IZONIAZYDU (HYDRAZYDY KWASU NIKOTYNOWEGO)

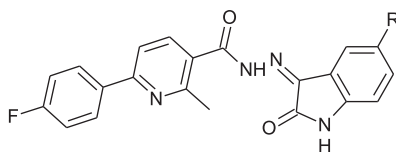
Izoniazyd (INH), czyli pirydyno-4-karbohydryd (Rys. 7) jest lekiem pierwszego rzutu stosowanym w gruźlicy, wprowadzonym do leczenia w latach 50tych ubiegłego stulecia. Jest pro-lekiem, który do aktywacji *in vivo* wymaga katalazy-peroksydazy bakteryjnej (KatG) [56]. Jego aktywność przeciwprątkowa opiera się na hamowaniu syntezy kwasów mykolowych wchodzących w skład ściany komórkowej *Mycobacterium tuberculosis*, choć jego dokładny mechanizm działania nie został ostatecznie potwierdzony [57, 58]. Od czasu wprowadzenia leku na rynek, notuje się wzrastającą oporność szczepów na izoniazyd oraz połączenia izoniazydu z innymi lekami pierwszego i drugiego rzutu, co stwarza duży problem terapeutyczny [59, 60].



Rysunek 7. Isoniazyd

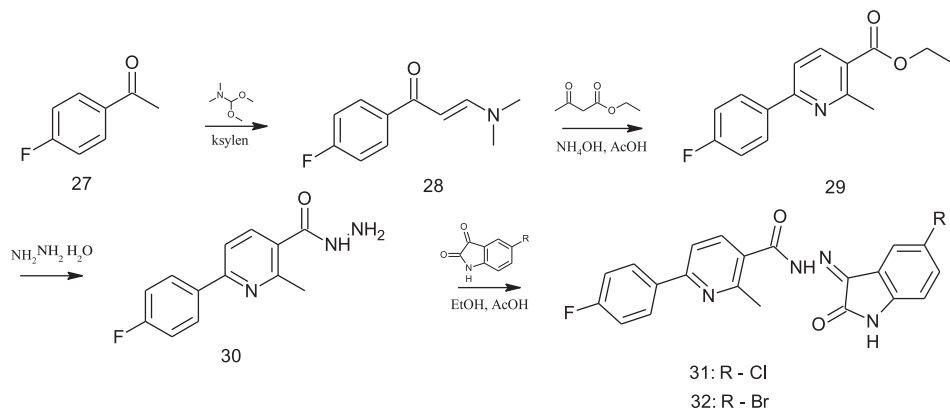
Figure 7. Isoniazide

Mając na uwadze powyższe, autorzy wielu prac dotyczących aktywności przeciwprątkowej pochodnych hydrazidu kwasu nikotynowego, modyfikują grupę hydrazydową innymi grupami funkcyjnymi, próbując zachować właściwości przeciwgruźlicze, jednocześnie redukując negatywne skutki uboczne i problem oporności szczepów na INH [61–64]. W opublikowanej w 2015 roku pracy, Eldehna i in. [65] zsyntetyzowali 18 pochodnych izoniazidu i przebadali ich aktywność przeciwko *Mycobacterium tuberculosis*. Najwyższą aktywność przeciwprątkową potwierdzono dla pochodnych hydrazidu kwasu 2-oksoindolino-(6-(4-fluorofenilo))-2-metylonikotynowego (Rys. 8). Dla związków **31** i **32** potwierdzono MIC na poziomie odpowiednio 12,5 oraz 6,25 µg/ml wobec referencyjnych wartości dla izoniazidu 0,75 µg/ml i pirazynamidu 3,21 µg/ml. Oba związki nie wykazały toksyczności w testach przeprowadzonych na liniach komórkowych HT-29 raka jelita grubego oraz and PC-3 raka prostaty. Syntezę związków **31** i **32** zaprezentowano poniżej na Schemacie 9.



(31: R – Cl, 32: R – Br)

Rysunek 8. Pochodne hydrazidu kwasu 2-oksoindolino-(6-(4-fluorofenilo))-2-metylonikotynowego **31**, **32**Figure 8. Derivatives of 2-oxoindolidine-(6-(4-fluorophenyl))-2-methylnicotinic acid hydrazide **31**, **32**

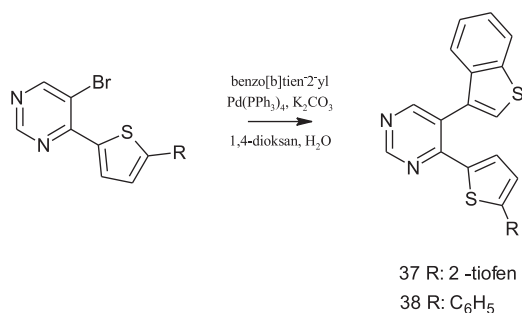


Schemat 9. Synteza pochodnych hydrazynu kwasu 2-oksoindolino-(6-(4-fluorofenyl))-2-metylnikotynowego **31, 32**

Scheme 9. Synthesis of 2-oxoindolidine-(6-(4-fluorophenyl))-2-methylnicotinic acid hydrazide derivatives **31, 32**

2.2. POCHODNE TIENYLO-PIRYMIDYNY

Pochodne pirymidyn przejawiają szeroki zakres aktywności biologicznej, takie jak: przeciw-nowotworowe, przeciwbólowe, przeciwzapalne [66–68] jak również przeciwpłatkowe [69–71]. W roku 2015 zespół E. Verbitskiego opublikował dane dotyczące aktywności pochodnych tienylo-pirymidyn przeciwko szczepom *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv [72]. Spośród 32 nowych mono-tienylo i di-tienylo podstawionych pochodnych pirymidyny, 4 wykazały aktywność przeciwpłatkową na poziomie podobnym do izoniazydu. Wartości MIC dla poszczególnych związków i substancji referencyjnej zestawiono poniżej w tabeli (Tab. 1).



Schemat 10b. Synteza pochodnych tienylopirymidyny **37**, **38**

Scheme 10b. Synthesis of thienylpyrimidine derivatives **37**, **38**

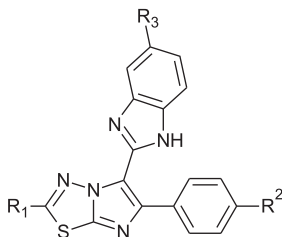
2.3. POCHODNE IMIDAZO-TIADIAZOLO-BENZIMIDAZOLU

Jak wykazano powyżej, układy heterocykliczne są intensywnie eksploatowanym kierunkiem poszukiwań nowych leków, w tym przeciwgruźliczych. Heterocykliczny układ 1,3,4-tiadiazolu jest obecny w kilku lekach przeciwbakteryjnych, wprowadzonych już do lecznictwa (pochodna sulfonamidowa: sulfametizol, antybiotyk beta-laktamowy z grupy cefalosporyn: cefazolina) [73]. Aktywność przeciwko szczepom mykobakteryjnym potwierdzono dla pochodnych 1,3,4-tiadiazolu w połączeniu z imidazolem [74, 75] oraz 1,3,4-tiadiazolowych pochodnych piperazyńlo fluorochinolonów [76] i sulfonamidów [77]. Natomiast, pochodne benzimidazolu głównie znane z aktywności przeciw pasożytniczej (albendazol, mebendazol), również wykazują zdolności hamowania wzrostu *Mycobacterium tuberculosis* [78–80]. Wykorzystując wszystkie powyższe ugrupowania heterocykliczne (imidazol, 1,3,4-tiadiazol oraz benzimidazol) Ramprasad i współautorzy, zsyntetyzowali pochodne imidazo[2,1-b][1,3,4]tiadiazolo-benzimidazolu (Rys. 9 oraz Tab. 2) o aktywności przeciwprątkowej [73]. Aż 7 pochodnych (**44a-g**) uzyskało zadowalające aktywność przeciwko *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (MIC 3,125 µg/ml, w odniesieniu do INH 0,1 oraz EMB 3,13), co przedstawiono w tabeli poniżej.

Tabela 2. Lista podstawników dla pochodnych imidazo-tiadiazolo-benzimidazolu

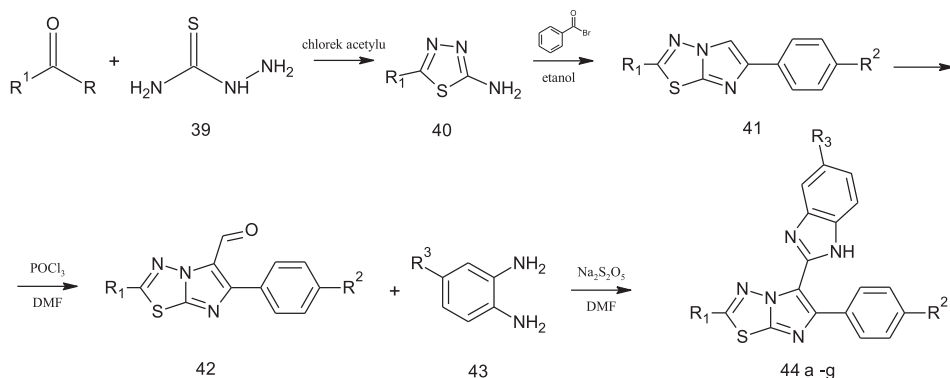
Table 2. List of substituents for imidazo-thiadiazolo-benzimidazole derivatives

	R ¹	R ²	R ³
44a	4-CH ₃ -C ₆ H ₄	OCH ₃	Cl
44b	4-Cl-C ₆ H ₄	CH ₃	H
44c	4-Cl-C ₆ H ₄	F	H
44d	4-CH ₃ -C ₆ H ₄	Cl	H
44e	4-CH ₃ -C ₆ H ₄	Cl	Cl
44f	CH ₃	Cl	Cl
44g	CH ₃	CH ₃	H



Rysunek 9. Wzór ogólny pochodnych imidazo[2,1-*b*] [1,3,4]tiadiazolo-benzimidazolu
Figure 9. General formula for imidazo[2,1-*b*] [1,3,4]thiazolo-benzimidazole derivatives

W pierwszym etapie syntezy pochodnych **44a-g** powstaje 1,3,4-tiadiazolo-2-amina z odpowiednim podstawnikiem w pozycji C5. Następnie w reakcji z α -halogeno-acetofenonem powstają, podstawione w pozycji 2, 6-aryloimidazo[2,1-*b*][1,3,4]tiadiazole (**41**). Ostatnim etapem syntezy jest reakcja Vilsmeier'a-Hacka pomiędzy otrzymanymi tiadiazolami a podstawioną *o*-fenyldiaminą. Ogólny schemat syntezy pochodnych **44a-g** przedstawiono poniżej na Schemacie 11.

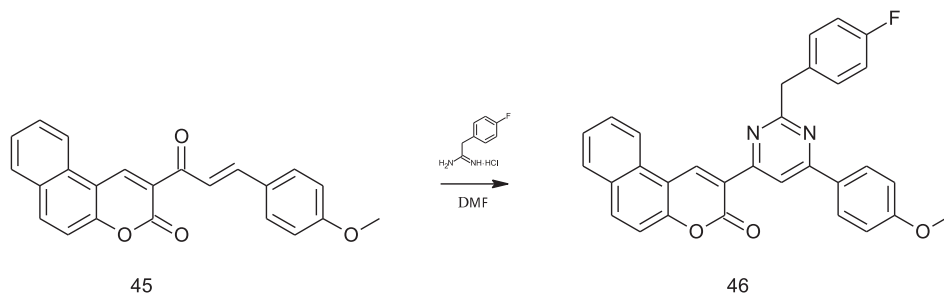


Schemat 11. Synteza pochodnych imidazo-tiadiazolo-benzimidazolu **44 a-g**
Scheme 11. Synthesis of imidazo-thiadiazolo-benzimidazole derivatives **44 a-g**

2.4. PIRYMIDYNOWE POCHODNE BENZOKUMARYN

Kumaryny, czyli pochodne benzo- α -piranu, są związkami występującymi w naturze, głównie w roślinach. Ich naturalne i syntetyczne pochodne znalazły wiele zastosowań w naukach farmaceutycznych jako leki przeciwnowotworowe, antybakteryjne, przeciwkrzepliwie, również jako inhibitory lipooksygenazy oraz cyklooksygenazy [81]. Pirymidynowe pochodne kumaryn wykazały działanie przeciwbólowe, przeciwbakteryjne, rozluźniające naczynia krwionośne, przeciwnowotworowe [82–86]. Biorąc pod uwagę fakt, że wiele leków przeciwgruźliczych to pochodne pirydynowe lub pirazynowe (izoniazyd, klofazymina, pirazynamid) Reddy i współautorzy podjęli się syntezy pirymidynowych pochodnych benzokuma-

ryn [87]. Otrzymano 15 nowych związków, z których jeden **46** wykazał znamiennej aktywność przeciwpłatkową wobec *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (MIC 0,05 µg/ml w porównaniu do MIC 0,02 µg/ml dla izoniazydu). Profil toksyczności dla związku badanego **46** i leku referencyjnego był podobny. Syntezę **46** przeprowadzono kondensując podstawione benzokumaryny z chlorkiem 2-(4-fluorofenyl)acetamidyny (Schemat 12).



Schemat 12. Schemat syntezy związku **46**

Scheme 12. Scheme of synthesis compound **46**

PODSUMOWANIE

Dane literaturowe potwierdzają narastającą liczbę przypadków zachorowań na gruźlicę, znaczny wzrost lekooporności płatków. Przy braku nowych skutecznych leków przeciwpłatkowych, prowadzone są intensywne badania nad opracowaniem nowej, efektywnej terapii przeciwko *Mycobacterium tuberculosis*. W niniejszym artykule opisano stan wiedzy na temat cząsteczek będących w III i II fazie badań klinicznych, jak również dokonano przeglądu wybranych, najnowszych doniesień na temat związków będących w fazie badań podstawowych. Przedstawiono syntezy, ogólne mechanizmy działania oraz aktywności poszczególnych związków. Przeanalizowane dane literaturowe ukazują aktualne kierunki poszukiwań nowych leków w terapii gruźlicy, wskazują na ważność tego problemu oraz możliwość szybkiego wprowadzenia leków będących w ostatniej fazie badań klinicznych do rutynowej terapii przeciwpłatkowej.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] Global Tuberculosis Report 2014, WHO.
- [2] V.K. Chadha, Indian J. Tuberc., 2009, **56**(1), 30.
- [3] I. Abubakar, M. Zignol, D. Falzon, M. Raviglione, L. Ditiu, S. Masham, I. Adetifa, N. Ford, H. Cox, S.D. Lawn, B.J. Marais, T.D. McHugh, P. Mwaba, M. Bates, M. Lipman, L. Zijenah, S. Logan, R. McNerney, A. Zumla, K. Sarda, P. Nahid, M. Hoelscher, M. Pletschette, Z.A. Memish, P. Kim, R. Hafner, S. Cole, G.B. Migliori, M. Maeurer, M. Schito, A. Zumla, Lancet Infect. Dis., 2013, **13**(6), 529.

- [4] <http://www.newtbdrugs.org/project.php?id=202745>.
- [5] K. Todar, *Mycobacterium tuberculosis and Tuberculosis*, Todar's Online Textbook of Bacteriology 2009.
- [6] Tuberculosis, Fact Sheet 104. WHO Report 2015.
- [7] D. Michałowska-Mitczuk, *Postępy Farmakoterapii. Farmakoterapia gruźlicy*, 2009, **65** (1), 51.
- [8] R. Loddenkemper, D. Sagabiel, A. Brendel. Eur. Respir. J., 2002, **36**, 66.
- [9] M. Zignol, M.S. Hosseini, A. Wright, C.L. Weezenbeek, P. Nunn, C.J. Watt, B.G. Williams, C. Dye, J. Infect. Dis., 2006, **194**(4), 479.
- [10] H. Tomioka, K. Namba, Kekkaku, 2006, **81**, 753.
- [11] K. Andries, P. Verhasselt, J. Guillemont, H.W. Göhlmann, J.M. Neefs, H. Winkler, J. Van Gestel, P. Timmerman, M. Zhu, E. Lee, P. Williams, D. de Chaffoy, E. Huitric, S. Hoffner, E. Cambau, C. Truffot-Pernot, N. Lounis, V. Jarlier, Science, 2005, **14**, 223.
- [12] A.K. Kakkar, N. Dahiya, Tuberculosis (Edinb), 2014, **94**(4), 357.
- [13] Provisional CDC Guidelines for the Use and Safety Monitoring of Bedaquiline Fumarate (Sirturo) for the Treatment of Multidrug-Resistant Tuberculosis, MMWR Recomm. Rep. 2013, **62**, 1.
- [14] J. Guillemont, *Quinoline derivatives and their use as mycobacterial inhibitors*, WO/2004/011436 (2004).
- [15] N. Lounis, J. Guillemont, N. Veziris, A. Koul, V. Jarlier, K. Andries, Med. Mal. Infect., 2010, **40**(7), 383.
- [16] Y.S. Kwon, B.H. Jeong, W.J. Koh, Curr. Opin. Pulm. Med., 2014, **20**(3), 280.
- [17] S.G. Franzblau, J.F. O'Sullivan, Antimicrob. Agents Chemother., 1988, **32**, 1583.
- [18] C. Jagannath, M.V. Reddy, S. Kailasam, Am. J. Respir. Crit. Care Med., 1995, **151**, 1083.
- [19] N.E. Morrison, G.M. Marley, Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis., 1976, **44**(1-2), 133.
- [20] J.L. Arbiser, S.L. Moschella, J. Am. Acad. Dermatol., 1995, **32**(2 Pt 1), 241.
- [21] T. Wu, S.J. Levine, M.G. Lawrence, C. Logun, C.W. Angus, J.H. Shelhamer, J. Clin. Invest., 1994, **93**(2), 571.
- [22] X.W. Gui, H.P. Xiao, Z.Y. Hu, Z.L. Cui, J. Wang, J.M. Lu, Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi, 2011, **34**(8), 579.
- [23] Z. Zhang, T. Li, G. Qu, Y. Pang, Y. Zhao, Int. J. Antimicrob. Agents, 2015, **45**(1), 71.
- [24] M. Gopal, N. Padayatchi, J.Z. Metcalfe, M.R. O'Donnell, Int. J. Tuberc. Lung. Dis., 2013, **17**, 1001.
- [25] T. Dey, G. Bridgen, H. Cox, Z. Shubber, G. Cooke, N. Ford, J. Antimicrob. Chemother., 2013, **68**(2), 284.
- [26] V.C. Barry, J.G. Belton, M.L. Conalty, J.M. Denny, D.W. Edward, J.F. O'Sullivan, D. Twomey, F. Winder, Nature, 1957, **179**(4568), 1013.
- [27] V.C. Barry, M.L. Belton, M.L. Conalty, J.F. O'Sullivan, H. Ernst, US Pat. 2.948.726 (1960).
- [28] V. Barry, M.L. Belton, J.F. O'Sullivan, J. Chem Soc., 1958, 859.
- [29] M. Matsumoto, H. Hashizume, T. Tomishige, M. Kawasaki, H. Tsubouchi, H. Sasaki, Y. Shimokawa, M. Komatsu. PLoS Med., 2006, **3**(11), 466.
- [30] W. Raether, H. Hänel, Parasitol Res., 2003, **90** (1), 19.
- [31] D.R. Ashtekar, R. Costa-Perira, K. Nagarajan, N. Vishvanathan, A.D. Bhatt, W. Rittel, Antimicrob. Agents Chemother., 1993, **37**(2), 183.
- [32] Drug Discovery & Development, EMA Recommends Two New Tuberculosis Treatments, 2013
- [33] H. Sasaki, Y. Haraguchi, M. Itotani, H. Kuroda, H. Hashizume, T. Tomishige, M. Kawasaki, M. Matsumoto, M. Komatsu, H. Tsubouchi, J. Med. Chem., 2006, **49**(26), 7854.
- [34] S.J. Brickner, Current Pharmaceutical. Design, 1996, **2**, 175.
- [35] U. Patel, Y.P. Yan, F.W. Jr Hobbs, J. Kaczmarczyk, A.M. Slee, D.L. Pompliano, M.G. Kurilla, E.V. Bobkova, J. Biol. Chem., 2001, **276**(40), 37199.
- [36] K.J. Shaw, M.R. Barbachyn, Ann N Y Acad. Sci., 2011, **1241**, 48.

- [37] *Charakterystyka produktu leczniczego – linezolid*, 2012.
- [38] K.N. Williams, C.K. Stover, T. Zhu, R. Tasneen, S. Tyagi, J.H. Grosset, E. Nuermberger, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2009, **53**(4), 1314.
- [39] R.S. Wallis, W. Jakubiec, V. Kumar, G. Bedarida, A. Silvia, D. Paige, T. Zhu, M. Mitton-Fry, L. Ladutko, S. Campbell, P.F. Miller, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2011, **55**(2), 567.
- [40] G.B. Migliori, B. Eker, M.D. Richardson, G. Sotgiu, J.P. Zellweger, A. Skrahina, J. Ortmann, E. Girardi, H. Hoffmann, G. Besozzi, N. Bevilacqua, D. Kirsten, R. Centis, C. Lange, *Eur. Respir. J.*, 2009, **34**(2), 387.
- [41] R.S. Wallis, R. Dawson, S.O. Friedrich, A. Venter, D. Paige, T. Zhu, A. Silvia, J. Gobey, C. Ellery, Y. Zhang, K. Eisenach, P. Miller, A.H. Diacon, *PLoS One*, 2014, **9**(4), 94462.
- [42] M.R. Barbachyn, D.K. Hutchinson, S.J. Brickner, M.H. Cynamon, J.O. Kilburn, S.P. Klemens, S.E. Glickman, K.C. Grega, S.K. Hendges, D.S. Toops, C.W. Ford, G.E. Zurenko, *J. Med. Chem.*, 1996, **39**(3), 680.
- [43] B. Villemagne, C. Crauste, M. Flipo, A.R. Baulard, B. Déprez, N. Willand, *Eur. J. Med. Chem.*, 2012, **51**, 1.
- [44] V. Balasubramanian, S. Solapure, H. Iyer, A. Ghosh, S. Sharma, P. Kaur, R. Deepthi, V. Subbulakshmi, V. Ramya, V. Ramachandran, M. Balganes, L. Wright, D. Melnick, S.L. Butler, V.K. Sambandamurthy, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2014, **58**(1), 495.
- [45] V. Balasubramanian, S. Solapure, R. Shandil, S. Gaonkar, K.N. Mahesh, J. Reddy, A. Deshpande, S. Bharath, N. Kumar, L. Wright, D. Melnick, S.L. Butler, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2014, **58**(7), 4185.
- [46] A. Wookey, P.J. Turner, J.M. Greenhalgh, M. Eastwood, J. Clarke, C. Sefton, *Clin. Microbiol. Infect.*, 2004, **10**(3), 247.
- [47] Balasubramanian, D. Melnick, A 14-day multiple ascending dose study: AZD5847 is well tolerated at predicted exposure for treatment of tuberculosis (TB) (Abstract A1-1735). Poster session presented at: 51st Annual Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy; 2011.
- [48] M.B. Gravestock, D.G. Acton, M.J. Betts, M. Dennis, G. Hatter, A. McGregor, M.L. Swain, R.G. Wilson, L. Woods, A. Wookey, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2003, **13**(23), 4179.
- [49] W. Li, A. Upadhyay, F.L. Fontes, E.J. North, Y. Wang, D.C. Crans, A.E. Grzegorzewicz, V. Jones, S.G. Franzblau, R.E. Lee, D.C. Crick, M. Jackson, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2014, **58**(11), 6413.
- [50] M. Protopopova, C. Hanrahan, B. Nikonenko, R. Samala, P. Chen, J. Gearhart, L. Einck, C.A. Nacy, *J. Antimicrob. Chemother.*, 2005, **56**(5), 968.
- [51] L. Jia, J.E. Tomaszewski, C. Hanrahan, L. Coward, P. Noker, G. Gorman, B. Nikonenko, M. Protopopova, *Br. J. Pharmacol.*, 2005, **144**(1), 80.
- [52] V.M. Reddy, T. Dubuisson, L. Einck, R.S. Wallis, W. Jakubiec, L. Ladutko, S. Campbell, C.A. Nacy, *J. Antimicrob. Chemother.*, 2012, **67**(5), 1163.
- [53] V.M. Reddy, L. Einck, K. Andries, C.A. Nacy, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2010, **54**(7), 2840.
- [54] R.E. Lee, M. Protopopova, E. Crooks, R.A. Slayden, M. Terrot, C.E. 3rd Barry, *J. Comb. Chem.*, 2003, **5**(2), 172.
- [55] O.K. Onajole, P. Govender, P.D. van Helden, H.G. Kruger, G.E. Maguire, I. Wiid, T. Govender, *Eur. J. Med. Chem.*, 2010, **45**(5), 2075.
- [56] B. Lei, C.J. Wei, S.C. Tu, *J. Biol. Chem.*, 2000, **275**(4), 2520.
- [57] E.K. Schroeder, N. de Souza, D.S. Santos, J.S. Blanchard, L.A. Basso, *Curr. Pharm. Biotechnol.*, 2002, **3**(3), 197.
- [58] J. Sandy, A. Mushtaq, A. Kawamura, J. Sinclair, E. Sim, E. Noble, M.J. Mol. Biol., 2002, **318**, 1071.
- [59] M. Zignol, M. Dara, A.S. Dean, D. Falzon, A. Dadu, K. Kremer, H. Hoffmann, S. Hoffner, K. Floyd, *Drug Resist. Updat.*, 2013, **16**(6), 108.

- [60] M. Moore, I.M. Onorato, E. McCray, K.G. Castro, *JAMA* 1993–1996, **215** (1997), 833.
- [61] M.S.C. Lourenço, M.L. Ferreirab, M.V.N. Souza, M.A. Peralta, T.R.A. Vasconcelos, M. das Graças, M.O. Henriques, *Eur. J. Med. Chem.*, 2008, **43**, 1344.
- [62] S.H. Cardoso, J.V. de Assis, M.V. de Almeida, M.C.S. Lourenço, F.R.C. Vicente, M.V.N. de Souza, *Quim. Nova.*, 2009, **32**, 1557.
- [63] B. Bottari, R. Maccari, F. Monforte, R. Ottana, E. Rotondo, M.G. Vigorita, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2000, **10**, 657.
- [64] V. Judge, B. Narasimhan, M. Ahuja, D. Sriram, P. Yogeewari, E.D. Clercq, C. Pannecouque, J. Balzarini, *Med. Chem. Res.*, 2012, **21**, 1935.
- [65] W.M. Eldehna, M. Fares, M.M. Abdel-Aziz, H.A. Abdel-Aziz, *Molecules*, 2015, **20**(5), 8800.
- [66] G.E. Wright, J.J. Gambino, *J. Med. Chem.*, 1984, **27**(2), 181.
- [67] L.F. Jalander, J.E. Lönnqvist, *Heterocycles*, 1998, **48**, 743.
- [68] N.M. Khalifa, M.A. Al-Omar, G. Amr Ael, A.R. Baiuomy, R.F. Abdel-Rahman, *Bioorg. Khim.*, 2015, **41**(2), 218.
- [69] E. Matyugina, A. Khandazhinskaya, L. Chernousova, S. Andreevskaya, T. Smirnova, A. Chizhov, I. Karpenko, S. Kochetkov, L. Alexandrova, *Bioorg. Med. Chem.*, 2012, **20**(22), 6680.
- [70] M.H. El-Hamamsy, A.W. Smith, A.S. Thompson, M.D. Threadgill, *Bioorg. Med. Chem.*, 2007, **15**(13), 4552.
- [71] J. Morgan, R. Haritakul, P.A. Keller, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2003, **13**(10), 1755.
- [72] E.V. Verbitskiy, E.M. Cheprakova, P.A. Slepukhin, M.A. Kravchenko, S.N. Skorniyakov, G.L. Rusinov, O.N. Chupakhin, V.N. Charushin, *Eur. J. Med. Chem.*, 2015, **97**, 225.
- [73] J. Ramprasad, N. Nayak, U. Dalimba, P. Yogeewari, D. Sriram, S.K. Peethambar, R. Achur, H.S. Kumar, *Eur. J. Med. Chem.*, 2015, **95**, 49.
- [74] F. Hadizadeh1, R. Vosooghi, *J. Heterocyc. Chem.*, 2008, **45**, 1.
- [75] S.G. Alegaon, K.R. Alagawadi, P.V. Sonkusare, S.M. Chaudhary, D.H. Dadwe, A.S. Shah, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2012, **22**(5), 1917.
- [76] S. Talath, A.K. Gadad, *Eur. J. Med. Chem.*, 2006, **41**(8), 918.
- [77] A. Foroumadi, A. Sakhteman, Z. Sharifzadeh, N. Mohammadhosseini, B. Hemmateenejad, M.H. Moshafi, M. Vosooghi, M. Amini, A. Shafiee, *J. Pharm. Sci.*, 2007, **15**(4), 218.
- [78] S.A. Stanley, S.S. Grant, T. Kawate, N. Iwase, M. Shimizu, C. Wivagg, M. Silvis, E. Kazyanskaya, J. Aquadro, A. Golas, M. Fitzgerald, H. Dai, L. Zhang, D.T. Hung, *ACS Chem. Biol.*, 2012, **7**(8), 1377.
- [79] M. Pieroni, S.K. Tipparaju, S. Lun, Y. Song, A.W. Sturm, W.R. Bishai, A.P. Kozikowski, *Chem. Med. Chem.*, 2011, **6**(2), 334.
- [80] K. Kumar, D. Awasthi, S.Y. Lee, I. Zanardi, B. Ruzsicska, S. Knudson, P.J. Tonge, R.A. Slayden, I. Ojima, *J. Med. Chem.*, 2011, **54**(1), 374.
- [81] R.O. O'Kennedy, R.D. Thomes Coumarins, *Biol. Appl. Mode Action*, Willey, 1997.
- [82] R.S. Keri, K.M. Hosamani, R.V. Shingalapur, M.H. Hugar, *Eur. J. Med. Chem.*, 2010, **45**(6), 2597.
- [83] A.H. Abd El-Wahab, *Pharmaceuticals (Basel)*, 2012, **5**(7), 745.
- [84] K.M. Amin, F.M. Awadalla, A.A. Eissa, S.M. Abou-Seri, G.S. Hassan, *Bioorg. Med. Chem.*, 2011, **19**(20), 6087.
- [85] K.B. Puttaraju, K. Shivashankar, M. Chandra, V.P. Mahendra, P.N. Rasal, V. Vivek, K. Rai, M.B. Chanu, *Eur. J. Med. Chem.*, 2013, **69**, 316.
- [86] K.M. Hosamani, D.S. Reddy, H.C. Devarajegowda, *RSC Adv.*, 2015, **5**, 11261.
- [87] D.S. Reddy, K.M. Hosamani, H.C. Devarajegowda, *Eur. J. Med. Chem.*, 2015, **101**, 705.

**AMINY BIOGENNE W ASPEKCIE ICH ROLI
W ORGANIZMACH ŻYWYCH**

**BIOGENIC AMINES IN THEIR ROLE
IN LIVING SYSTEMS**

Renata Jastrząb^{1*}, Bartosz Tylkowski^{1,2}

¹ *A. Mickiewicz University, Faculty of Chemistry
ul. Umultowska 89b, 61-614 Poznań*

**e-mail: renatad@amu.edu.pl*

² *Universitat Rovira i Virgili, Departament de Enginyeria Química
Av. Països Catalans, 26-43007 Tarragona, Spain*

Abstract

Wykaz stosowanych symboli i oznaczeń

Wprowadzenie

1. Poliaminy w organizmach żywych

2. Poliaminy jako markery nowotworowe

3. Zastosowanie kompleksów poliamin w medycynie

Uwagi końcowe

Podziękowanie

Piśmiennictwo cytowane



Dr hab. Renata Jastrzab jest profesorem nadzwyczajnym Wydziału Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Zajmuje się badaniami reakcji kompleksowania biocząsteczek występujących w układach biologicznych. Szczególny nacisk kładzie na określenie roli grupy fosforanowej w procesach tworzenia związków kompleksowych. Ponadto w kręgu zainteresowań znajdują się reakcje zachodzące na poziomie molekularnym z małymi biocząsteczkami takimi jak: poliaminy, alfa hydroksy kwasy czy też fragmenty kwasu hialuronowego. Głównymi metodami badawczymi pozwalającymi osią-

gnąć zakładany cel są potencjometria oraz metody spektralne. Równolegle w grupie badawczej prof. Jastrzab prowadzone są prace mające na celu syntezę materiałów powierzchniowych oraz nanomateriałów o właściwościach wzmacniających sygnał w spektroskopii Ramana oraz matryc polimerowych wykorzystywanych do immobilizacji materiałów o właściwościach luminescencyjnych. Prof. Renata Jastrzab jest autorką 46 prac w tym 35 z listy filadelfijskiej, 10 rozdziałów w monografiach, jest edytorem dwóch monografii anglojęzycznych oraz 3 skryptów studenckich. Wraz z grupa doktorantów organizuje Poznańskie Sympozjum Młodych Naukowców, które cieszą się dużym zainteresowaniem.



Dr Bartosz Tylkowski jest absolwentem Wydziału Chemii Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu (2004); studia doktoranckie ukończył na Wydziale Chemii i Chemii Przemysłowej Uniwersytetu w Genewie (Włochy, 2008); jest czterokrotnym laureatem stypendiów podoktoranckich finansowanych z Funduszy Europejskich w ramach programu Marie Curie (OPEN TOK w ramach 6. Programu Ramowego – Tarragona, Hiszpania (2008–2009), IAPP w ramach 7. Programu Ramowego – Sofia, Bułgaria (2009–2010), Individual Outgoing Marie Curie Fellowship w ramach 7. Programu

Ramowego – Tarragona, Hiszpania/Cincinnati, USA (2013–2016), Incoming Tennenlohe Marie Curie Fellowship (2016–2018) w ramach 7. Programu Ramowego – Tarragona, Hiszpania), jest dwukrotnym laureatem stypendiów podoktoranckich ukierunkowanych na rozwój transferu technologicznego we współpracy uczelni z firmami w latach 2010–2013, współwynalazca kilkunastu patentów, autor ponad 20. publikacji naukowych i 7 rozdziałów w książkach, edytor 3 książek, prelegent na ponad 30. konferencjach międzynarodowych, obecnie prowadzi badania w ramach IOF Marie Curie (Individual Outgoing Fellowship) na Uniwersytecie Rovira i Virgili w Tarragonie (Hiszpania).

ABSTRACT

Although polyamines (PA) belong to relatively simple aliphatic substances, their role in life processes of animals and plants is of key importance [1–5]. The group of the most important amines, called biogenic ones includes:

Spermine (Spm): $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$

Spermidine (Spd): $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$

Putrescine (Put): $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$.

Of secondary importance are homologues of biogenic amines, occurring in lower contents in living organisms [2, 6–8]:

1,3-diaminopropan: $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$

Cadaverine: $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_5\text{NH}_2$

Homospermidine: $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$

Norspermine (3,3,3-tet): $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$

Thermospermine: $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$

Caldopentamine: $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$.

The first polyamine discovered in a living organism was tetramine, a spermine crystallised out of sperm in 1678 by Van Leewenkeuk [9]. Putrescine was discovered in the end of the 19th century in microbes and then triamine: spermidine was discovered in the beginning of the 20th century [2]. Later studies have shown that in animal cells spermidine and spermine occur at elevated levels, while in prokaryotes spermidine and putrescine contents are dominant. Putrescine, spermidine, 1,3-diaminopropan, homospermidine, norspermidine, and norspermine have been found in many gramnegative bacteria and algae [7, 10, 11].

Total concentration of PA in living organisms is on the order of millimols, however, the concentration of free polyamines is much lower. A low level of free amines follows from the fact that they are involved in noncovalent interactions with biomolecules occurring in living organisms such as nucleic acids, proteins, or phospholipids. High concentrations of non-bonded polyamines have been detected first of all in young molecules in the process of growth, in particular in rapidly proliferating cancer cells [6, 12]. Elevated levels of free polyamines have been observed, e.g. in breast, colon, lung, prostate, and skin tumours, accompanied by changed levels of enzymes responsible for biosynthesis and catabolism of polyamines.

Because of the increased level of free polyamines and a tendency of their interaction with nucleic acids and other bioligands, these compounds have become objects of intense study [1, 13–19]. There is no doubt that the regulation of biosynthesis of polyamines and catabolism is one of the most important pathways in the search strategy for chemoprevention and chemotherapeutic drugs [14, 15, 20–36]. The present state of knowledge of these processes, their significance in biological systems, and their application in medicine are presented in subsequent sections of this chapter.

Keywords: poliaminy, aminy biogenne, związki kompleksowe, nowotwory

Słowa kluczowe: polyamines, biogenic amines, coordination compounds, tumors

WYKAZ STOSOWANYCH SYMBOLI I OZNACZEŃ

PA	- poliaminy
Spm	- spermina
Spd	- spermidyna
Put	- putrescyna
3,3,3-tet	- norspermina
SSAT	- N1-acetylotransferynę spermidyny/sperminy
FAD	- dinukleotyd flawinonikotynowy
APAO	- oksydaza N1-acetylopoliaminowa
SMO	- oksydaza sperminy
GPC1	- glipikan 1
ODC	- dekarboksylaza ornityny
NMSC	- nowotwór złośliwy skóry
DFMO	- α -difluorometylornityna
PSA	- swoisty antygen sterczowy
BBR3464	- azotan trójplatyny
ROS	- reaktywne czynniki oksydacyjne
ID50	- dawka infekcyjna
cis-DDP	- <i>cis</i> -diaminodichloroplatyna (II)
HSC-3	- komórki nowotworu jamy ustnej
BENSpm	- N1,N11-bis(etylo)norspermina
CPENSpm	- N1-cyko-propylometylo-N11-etylonorspermina
JIMT-1	- komórki raka piersi
L56BR-C1	- komórki raka piersi

WPROWADZENIE

Poliaminy (PA) pomimo faktu, że należą do relatywnie prostych organicznych alifatycznych substancji, odgrywają kluczową rolę w wielu procesach życiowych zarówno organizmów zwierzęcych, jak i roślinnych [1–5]. Do najbardziej rozpowszechnionych amin tzw. amin biogennych zaliczane są:

spermina (Spm): $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$

spermidyna (Spd): $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$

putrescyna (Put): $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$.

Drugorzędną rolę w organizmach odgrywają występujące w mniejszych ilościach homologi amin biogennych:

1,3-diaminopropan: $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$

kadaweryna: $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_5\text{NH}_2$

homospermidyna: $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$

norspermina (3,3,3-tet): $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$

termospermina: $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$

kaldopentamina: $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$ [2,6-8].

Pierwszą odkrytą w organizmie żywym poliaminą była tetramina – spermina wykrystalizowana ze spermy w 1678 roku przez Van Leewenkeuk'a [9]. Putrescynę odkryto pod koniec XIX wieku w mikrobach, a triaminę spermidynę dopiero na początku XX wieku [2]. Późniejsze badania wykazały, że w komórkach zwierzęcych występuje przede wszystkim spermidyna oraz spermina, natomiast w prokariota obserwuje się zwiększony poziom spermidyny oraz putrescyny. Putrescynę, spermidynę, 1,3-diaminopropan, homospermidynę, norspermidynę oraz norsperminę znaleziono także w wielu bakteriach gram-ujemnych oraz algach [7, 10, 11].

Całkowite stężenie PA w organizmach jest rzędu milimoli, jednakże stężenie wolnych poliamin jest znacząco niższe. Niski poziom wolnych amin wynika z faktu, że oddziałują one niekowalencyjnie z białkami występującymi w organizmach żywych, takimi jak: kwasy nukleinowe, białka czy fosfolipidy. Wysokie stężenie niezwiązanych poliamin stwierdzono przede wszystkim w komórkach młodych, rozwijających się, zwłaszcza w szybko rozmnażających się komórkach nowotworowych [6, 12]. Efekt ten zaobserwowano między innymi w nowotworach piersi, okrężnicy, płuc, prostaty oraz skóry, odnotowując jednocześnie zmieniony poziom enzymów odpowiadających za procesy biosyntezy i katabolizmu poliamin. To właśnie wzrost stężenia tych substancji w stanach chorobowych, a także tendencja do oddziaływań z kwasami nukleinowymi oraz innymi bioligandami jest główną przyczyną, że poliaminy stały się w ostatnich latach obiektem intensywnych badań [1, 13–19]. Nie ulega wątpliwości, że regulacja stężenia poliamin, jak również ich biosyntezy i katabolizmu jest jedną z ważniejszych dróg w strategii poszukiwań chemioterapeutyków [14, 15, 20–36].

1. POLIAMINY W ORGANIZMACH ŻYWYCH

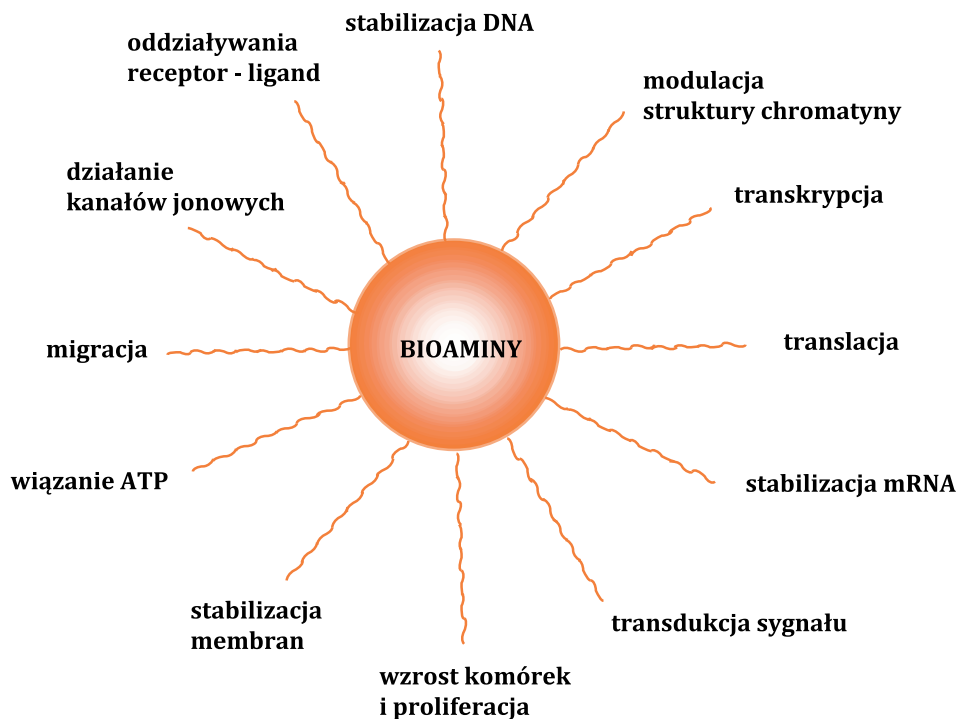
Poliaminy występują praktycznie we wszystkich organizmach żywych, jednakże ich poziom uzależniony jest od gatunku, rodzaju tkanki, a zwłaszcza wieku komórek [10, 14, 37–43]. Organem, w którym wykryto najwyższe stężenie poliamin (2 mM spermidyny i 4 mM sperminy) jest trzustka [10]. Duże ilości poliamin (sperminy i spermidyny) wykryto również w nerkach, śledzionie, wątrobie, płucach, a także w nasieniu [7, 20]. Spermidyna i jej analogi są także obecne w dużych ilościach w centralnym układzie nerwowym, stąd spermidyna nazywana była neurydyną. Na uwagę zasługuje fakt, że spermidyna nie jest rozmieszczona równomiernie w całym układzie nerwowym, a jej duża koncentracja znajduje się w substancji białej mózgu. Zaobserwowano także nietypowy wzrost stężenia spermidyny i sperminy w mózgu wraz z wiekiem organizmu [37, 38]. Podobna sytuacja jak w układzie nerwowym (różne stężenie aminy w tej samej tkance) występuje w przypadku skóry. Przeprowadzone badania metodą chromatografii cieczowej oraz badania fluorescencyjne wykazały dużo wyższe stężenie spermidyny i sperminy w naskórku niż w skórze właściwej. Regularne pomiary zmian poziomu PA w skórze są istotne w kontroli zdrowia pacjentów chorych na choroby dermatologiczne [44]. Ponadto, niewielką ilość amin biogennych znaleziono w krwi, a także w moczu (putrescyna i spermidyna), gdzie wzrost ich poziomu jest sygnałem informującym o stanach chorobowych [39].

Wzrost stężenia poliamin obserwuje się także u osób chorych na mukowiscydozę, gdzie najprawdopodobniej spermidyna i produkty jej metabolicznego rozkładu mają znaczenie w patogenezie dysfunkcji membran komórkowych [45].

Na uwagę zasługuje fakt, że poliaminy, substancje o charakterze silnie zasadowym, wykazują duże powinowactwo do protonu. Wzrasta ono wraz z wydłużeniem łańcucha metylenowego aminy. W warunkach fizjologicznych przy pH około 7, aminy biogenne są całkowicie sprotonowane. Aminy posiadające łańcuch metylenowy krótszy od trzech, w warunkach biologicznych mogą być częściowo zdeprotonowane, a co za tym idzie, wykazują mniejsze powinowactwo do polianionów niż aminy biogenne [46].

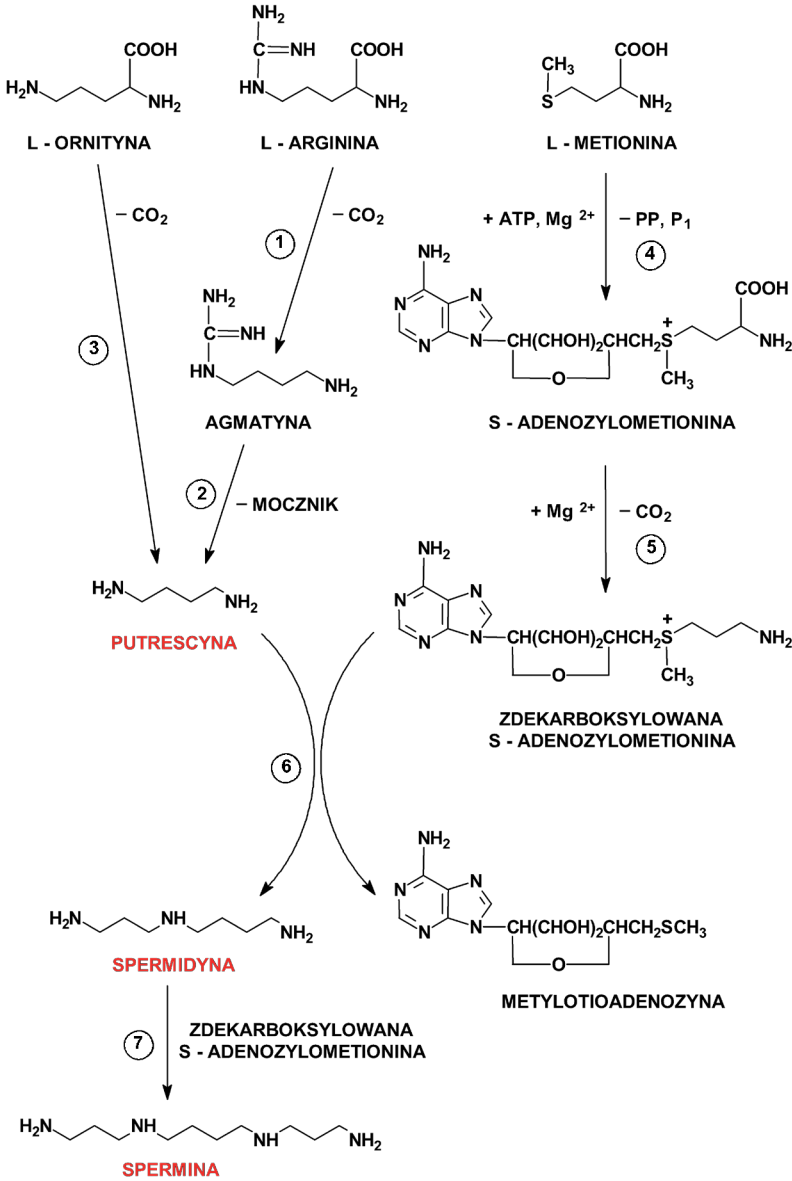
Z punktu widzenia farmakologicznego poliaminy są substancjami toksycznymi [15], jednakże przy odpowiednim stężeniu pełnią szereg pozytywnych funkcji, Rysunek 1. Związki te oddziałują z całymi komórkami, organellami komórkowymi, kwasami nukleinowymi, a także biorą udział w wielu reakcjach metabolicznych [5, 47]. Poliaminy katalizują i kontrolują biosyntezę kwasów nukleinowych oraz białek, a także są bezpośrednio odpowiedzialne za przebieg syntezy makrocząsteczkowej, która ma miejsce podczas wzrostu komórek (synteza DNA stymulowana jest przez spermidynę) [42]. Silnie zasadowe poliaminy mają wysokie powinowactwo do związków anionowych stąd ich zdolność do łączenia się z kwasami nukleinowymi. Poliaminy oddziałując z grupami fosforanowymi polinukleotydów zapobiegają denaturacji i ścinaniu oraz stabilizują strukturę kwasu nukleinowego [6, 10, 48, 49]. Ponadto wykazują tendencję do inicjowania metylacji t-RNA *in vitro* oraz

zapobiegają enzymatycznej degradacji i uszkodzeniom promieniotwórczym rybosomów [10, 39]. Ważną biologiczną rolą poliamin jest wpływ na stopień upakowania DNA w bakteriofagu [50, 51]. PA biogenne wywierają również istotną rolę na funkcjonowanie membran biologicznych (spermina stabilizuje działanie membran w bakteriach), gdzie efektywność działania PA uzależniona jest przede wszystkim od dodatniego ładunku łańcucha aminy (im wyższy ładunek tym lepsza stabilizacja). Bardzo ważną konsekwencją przyłączenia PA do podwójnej części membran jest efekt ochrony przed lipidową peroksydacją. Poliaminy biogenne modułują także syntezę triacylogliceroli niezbędnych do budowy membran [24–26, 41, 47]. Spermidyna występująca również w bakteriach działa antymutagenie [42].



Rysunek 1. Rola amin biogennych w organizmach żywych
Figure 1. Role of biogenic amines in living organisms

Niektóre poliaminy są prekursorami aminokwasów, które powstają przez deaminację oksydacyjną amin. Jednym z takich aminokwasów (pochodnych amin) jest putreanina – naturalny składnik mózgu kręgowców [40].



Rysunek 2. Droga biosyntezy poliamin w organizmach żywych. (Enzymy uczestniczące w biosyntezie: 1 – dekarboksylaza argininy; 2 – ureohydrolaza agmatyny; 3 – dekarboksylaza ornityny; 4 – syntetaza S-adenozylometioniny; 5 – dekarboksylaza, S-adenozylometioniny; 6 – syntetaza spermidyny; 7 – syntetaza sperminy)

Figure 2. The pathway of polyamine synthesis in living organisms. The enzymes involved are: 1 – arginine decarboxylase, 2 – agmatine ureohydrolase, 3 – ornithine decarboxylase, 4 – S-adenosylmethionine synthase, 5 – S-adenosylmethionine decarboxylase, 6 – spermidine synthase, 7 – spermine synthase

Droga biosyntezy poliamin po raz pierwszy określona została na podstawie badań mikroorganizmów. Opracowany w późniejszym czasie schemat biosyntezy poliamin dla ssaków okazał się niemal identyczny (Rys. 2). W bakteriach (np.: *Escherichia Coli*) oraz w roślinach putrescyna syntetyzowana jest na dwóch równoległych drogach:

- 1) z ornityny w wyniku jej dekarboksylacji w obecności dekarboksylazy ornityny,
- 2) z argininy w procesie dekarboksylacji do agmatyny, która następnie ulega hydrolizowaniu przy udziale ureohydrolazy agmatyny bezpośrednio do putrescyny i mocznika lub poprzez produkt pośredni *N*-karbamylo-1,4-diaminobutan.

Katabolizm poliamin w organizmach zwierzęcych jest procesem dwuetapowym kontrolowanym przez enzymy *N*1-acetylotransferynę spermidyny/sperminy (SSAT) [52–57]. Enzymy te powodują, że acetylowane poliaminy stają się substratami do dalszej konwersji spermidyny do putrescyny. SSAT katalizuje powstawanie *N*1-acetylosperminy lub *N*1-acetylospermidyny poprzez transfer grupy acetylowej z acetylo co-enzymu A do pozycji *N*1 spermidyny lub sperminy. W drugim etapie szlaku syntezy powstaje peroksymalny dinukleotyd flawinonikotynowy (FAD), którego stężenie jest bezpośrednio uzależnione od oksydazy *N*1-acetylopoliaminowej (APAO) [58–63]. APAO jest to enzym, który odpowiada za utworzenie spermidyny lub sperminy, 3-aceto-aminopropanalu i H_2O_2 [60, 61, 64–66]. Alternatywnie spermina może być utleniana bezpośrednio z powrotem do spermidyny przy udziale oksydazy sperminy (SMO), która jest enzymem zależnym od FAD [65–67]. Co istotne, indukcja SMO została zarejestrowana w stanach zapalnych powiązanych z nowotworami okrężnicy oraz płuc i sugeruje się, że redukcja poziomu SMO może stanowić cel w strategii zapobiegania chorobom nowotworowym [68–72]. Efektem ubocznym reakcji utleniania jest generowanie toksycznego nadtlenu wodoru (H_2O_2). Cząsteczki H_2O_2 odgrywają istotną rolę w procesie uszkodzenia DNA, co między innymi skutkuje wzrostem katabolizmu poliamin. Ponadto, znaczne obniżenie poziomu wewnątrzkomórkowych poliamin, które towarzyszy katabolizmowi zostaje zahamowane poprzez wzrost poziomu inhibitorów tego procesu [40].

W przypadku transportu poliamin w organizmach zwierzęcych sugeruje, że w pierwszym etapie PA wnikają do wnętrza komórki poprzez membranę transportującą, gdzie następuje ich gwałtowna akumulacja. Proces ten zasilany jest przez potencjał błony. Taki system transportu pozwala wyjaśnić pozornie wysokie, całkowite stężenie wewnątrzkomórkowych poliamin, pomimo faktu, że rzeczywista ilość wolnych PA uważana jest za relatywnie niską [73–75]. Inny model transportu poliamin zakłada związanie sperminy z siarczanem heparanu i glikipkanem 1 (GPC1), które pełnią rolę czynnika transportującego aminę do wnętrza komórki [70, 73, 74].

Zarówno enzymy jak również syntetyzowane aminy (zwłaszcza putrescyna) stanowią bezpośredni target w celu zahamowania syntezy poliamin w chorobach, w których ich wzrost jest obserwowany (zwłaszcza w chorobach nowotworowych).

2. POLIAMINY JAKO MARKERY NOWOTWOROWE

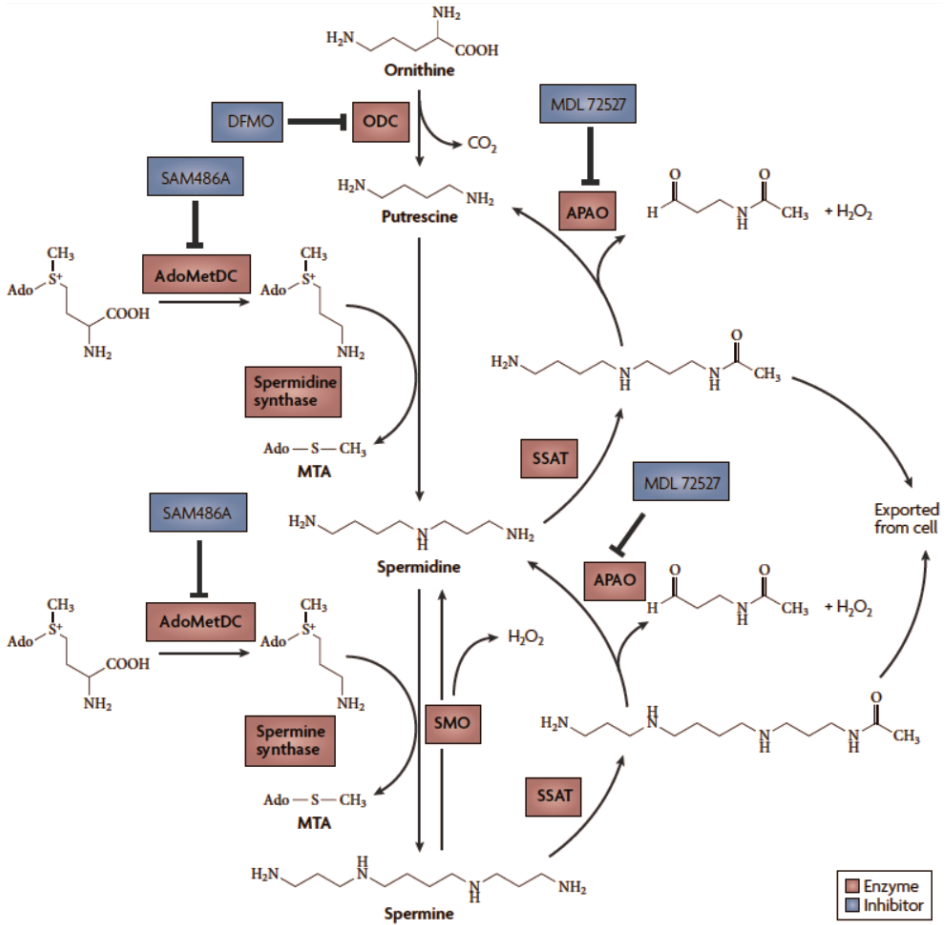
choroby nowotworowe po chorobach układu krążenia stanowią główną przyczynę zgonów w krajach rozwiniętych [76]. Od dawna wiadomo, że wzrost stanów zapalnych oraz syntezy poliamin związany jest z rozwojem wewnątrz nabłonkowego nowotworu (*intraepithelial neoplasia*), który jest jednym z czynników ryzyka rozwoju raka u ludzi. Istnieje bardzo bogata literatura opisująca zależność pomiędzy wzrostem poziomu stężenia PA a chorobami nowotworowymi, która sugeruje związek pomiędzy indukowaniem biosyntezy PA i rozwojem komórek nowotworowych [1, 70, 77]. Jak zauważono, metabolizm poliamin jest integralnym składnikiem mechanizmu karcinogenezy w tkankach nabłonkowych. Rozwój choroby nowotworowej to proces wieloetapowy, podczas którego następują przemiany powodujące progresywne zmiany od normalnych, zdrowych komórek do złośliwych komórek nowotworowych. W przypadku gdy zakres stanów zapalnych jest nieregularny, to odpowiedź komórkowa powoduje zmiany prowadzące do chronicznych stanów zapalnych, w których ogniska zapalne są zdominowane przez makrofagi, które wydzielają mediatory reakcji zapalnej. Tego typu procesy powodują generowanie czynników wzrostu oraz cytokinezy, jak również reaktywnych związków tlenu i azotu, które są odpowiedzialne za zniszczenie DNA [78, 79].

U osób z chorobą nowotworową zaobserwowano znaczny wzrost stężenia poliamin we krwi i moczu, jednakże dokładne określenie ilości definiującej stan chorobowy nie jest możliwe, gdyż ich zawartość uzależniona jest od aktywności oraz stopnia zaawansowania nowotworu [10, 15, 39, 80, 81]. W wielu odmianach raka, np. przy raku żołądka, trzustki, a także w raku piersi, stężenie poliamin praktycznie nie ulega zmianie (zaobserwowano wzrost stężenia spermidyny w moczu tylko u 20% pacjentów oraz sperminy tylko u 25% badanych), podczas gdy w nowotworach złośliwych płuc wzrost stężenia amin wykryto już u około 50% chorych, a w przypadku raka dróg rodnych, prostaty czy też pęcherza moczowego zmiany poziomu poliamin obserwowane są prawie u 90% przebadanych pacjentów [20, 43, 72]. Pomiar zawartości sperminy i spermidyny w moczu i we krwi w wielu przypadkach ułatwiają diagnozę i ocenę stanów chorobowych oraz umożliwiają monitorowanie procesu leczenia. Zaobserwowano znaczny spadek poziomu PA w pierwszym tygodniu od rozpoczęcia chemioterapii w przypadku, kiedy leczenie jest skuteczne [15, 43, 82]. Stwierdzono również, że analogi amin biogennych (spermidyny i sperminy) inhibują wzrost guzków rakowych w układach modelowych, a także mają działanie antymalaryczne. Pochodne tego typu otrzymuje się głównie na drodze reakcji Mitsunobu (reakcja pomiędzy alkoholem, a aktywowaną aminą dającą w rezultacie chiralną pochodną poliaminy) [83]. Komórki posiadają bardzo rozwinięte mechanizmy regulujące prawidłowy wewnątrzkomórkowy poziom PA, a rozregulowanie tego metabolizmu (biosyntezy i katabolizmu), a także transportu ma kluczowe znaczenie dla wzrostu komórek. Wzrost poziomu poliamin (wynikający ze zwiększenia ich syntezy) odnotowywany jest także jako efekt stanów zapalnych oraz wzmożonej proliferacji wynikającej z gwałtownego wzrostu komórek nowotworowych [84].

W latach 60-tych Russell and Snyder po raz pierwszy zaobserwowali wysokie stężenie enzymu dekarboksylazy ornityny (ODC) w chorobach nowotworowych [85]. Aktywność ODC oraz wysoki poziom PA był również obserwowany w przypadku genetycznych predyspozycji do występowania raka okrężnicy [86]. Pionierskie prace mające na celu skorelowanie wysokiego poziomu amin biogennych i występowania czynników rakotwórczych skóry wykazały, że ODC jest konieczny i wystarczający dla wywołania nowotworów u myszy [71]. Stwierdzono również, że poziom ODC podnosi się w przypadku występowania nowotworu złośliwego skóry (NMSC) [87]. Ponadto indukcja ODC i wzrost poziomu PA jest ściśle związana z rakiem piersi [16, 88] i rakiem żołądka [17]. Na uwagę zasługuje fakt, że również inne enzymy, takie jak syntetaza sperminy i syntetaza spermidyny są ściśle związane z powstawaniem nowotworów u ludzi. Także enzymy biorące udział w procesie katabolizmu są połączone tymi procesami. Wzrost działania SMO jest obserwowany w stanach zapalnych związanych z chorobami nowotworowymi, np. infekcji i w konsekwencji powstawaniu raka przewodu pokarmowego (*Helicobacter pylori*) [89]. Infekcja ta również powoduje rozregulowanie ekspresji SMO w wyniku czego wzrasta poziom zniszczenia DNA i apoptozy. Zaobserwowano, że usunięcie z organizmu czynnika zapalnego skorelowane jest z redukcją ekspresji SMO [90]. Badania wykazały, że obniżenie poziomu SMO może skutkować obniżeniem stanów zapalnych wywołanych przez *H. pylori* i w konsekwencji zahamowaniem rozwoju raka żołądka. Stwierdzono także podwyższony poziom ekspresji SMO w tkankach pobranych od pacjentów z rakiem prostaty w porównaniu do próbek zdrowych tkanek prostaty [91], a także we wrzodziejącym zapaleniu okrężnicy, które jest czynnikiem zwiększającym ryzyko wystąpienia raka okrężnicy [92].

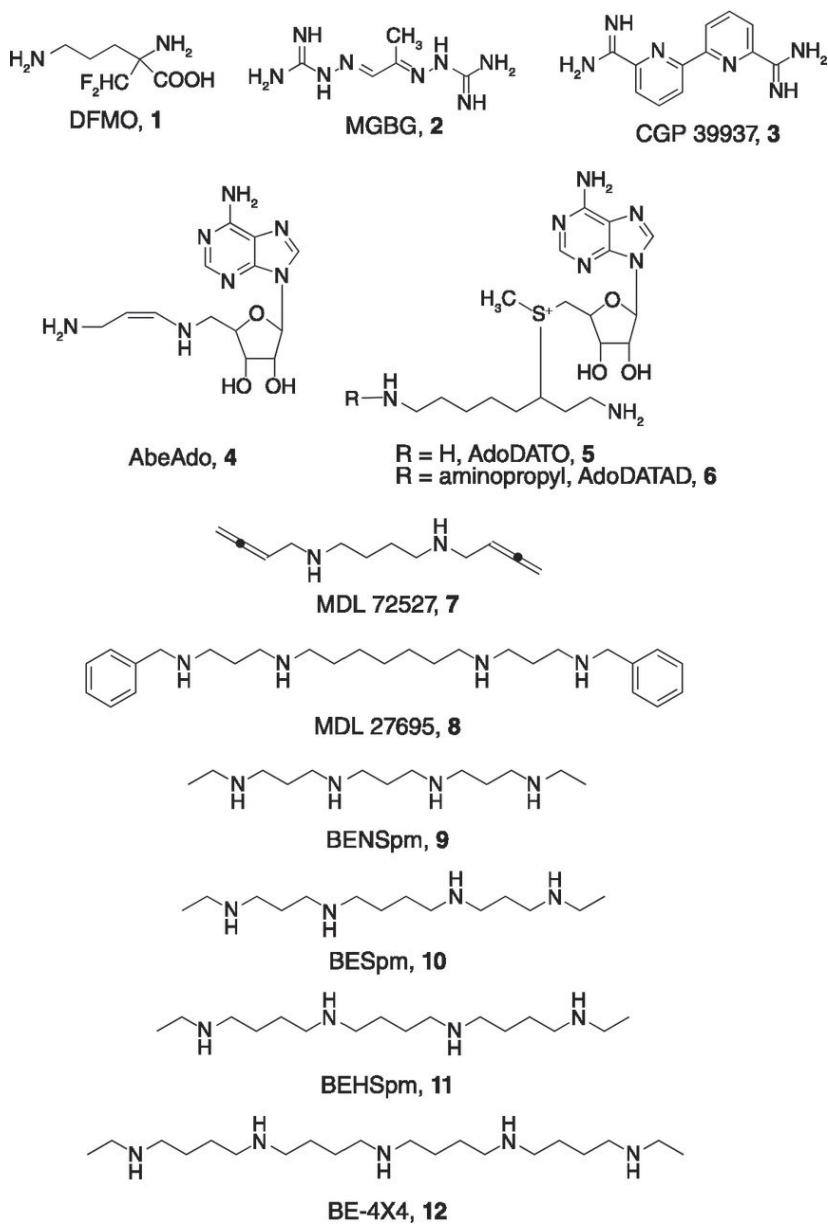
Wprowadzenie do układu odpowiednich inhibitorów, np. biosyntezy dekarboksylazy ornityny, obniża poziom amin biogennych w organizmie. Szczegółnie znalazła otrzymana w 1978 roku α -difluorometylornityna (DFMO). Wyrażne wstrzymanie replikacji komórek po zastosowaniu DFMO (lub podobnych inhibitorów) stwarza potencjalne możliwości terapeutyczne w chorobach nowotworowych.

Ingerowanie w metabolizm poliamin (poprzez stosowanie inhibitorów syntezy czy aktywatorów katabolizmu) wydaje się zasadne w przypadku zapobiegania stanom zapalnym odpowiedzialnym za powstawanie nowotworów (Rys. 3). Próby kliniczne stosowania difluorometylornithine (DFMO) (Rys. 4) selektywnego inhibitora syntezy poliamin, pokazują, że po roku podawania rozmiar powiększonego gruczołu krokowego oraz swoistego antygenu sterczowego (PSA) zmniejszyły się o połowę u osób obciążonych genetycznie tym typem nowotworu. Podobne zastosowanie kombinacji DFMO i sulindaku (niesterydowego leku przeciwzapalnego) u osób w pierwszym stadium nowotworu jelita grubego spowodowało po 3 latach stosowania redukcję komórek nowotworowych o 70% [1, 93, 94].



Rysunek 3. Cele działania inhibitorów w szlaku metabolicznym poliamin [70]

Figure 3. Targets in the polyamine metabolic pathway [70]



Rysunek 4. Wzory standardowych inhibitorów biosyntezy poliamin [95]

Figure 4. Structures of the classical inhibitors of polyamine biosynthesis [95]

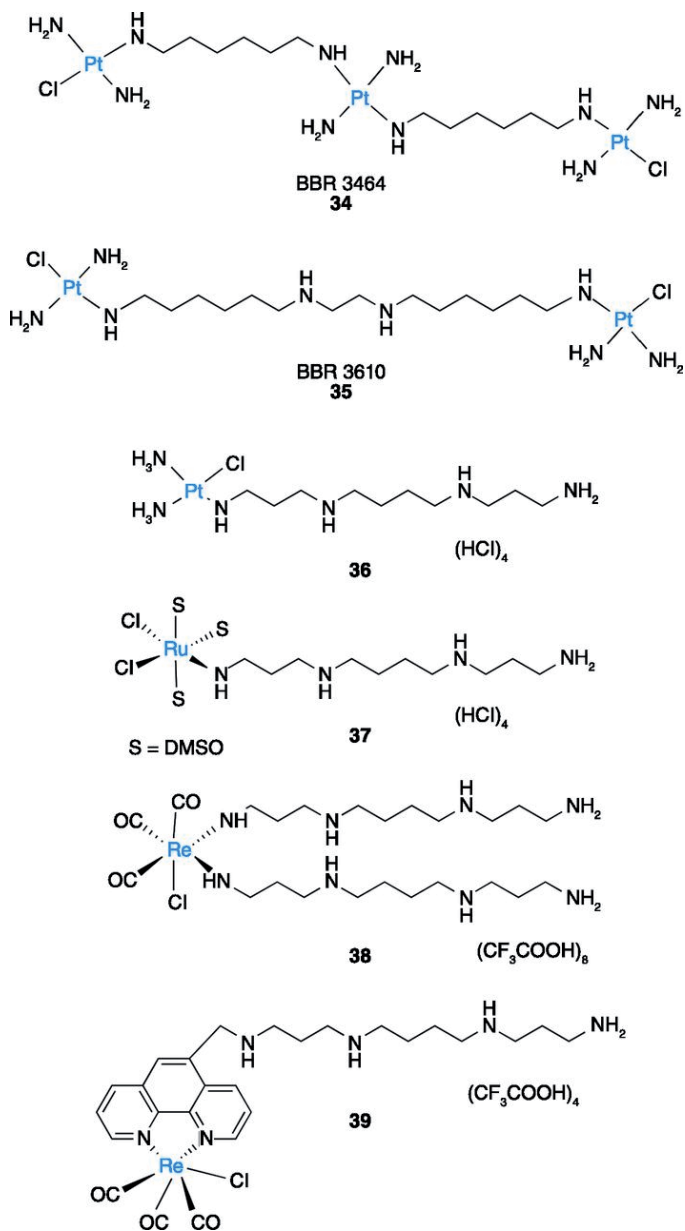
3. ZASTOSOWANIE KOMPLEKSÓW POLIAMIN W MEDYCYNIE

Większość stosowanych terapeutycznie leków to z natury związki organiczne, podczas gdy metale w związkach koordynacyjnych czy metaloorganicznych oferują znacznie szerszą różnorodność chemiczną i co za tym idzie potencjalnie większe zastosowanie terapeutyczne [4]. Zwłaszcza w leczeniu złośliwych form nowotworów stosowanie leków nieorganicznych ma olbrzymie znaczenie. Ich aktywność polega głównie na specyficznym oddziaływaniu z DNA, co prowadzi do zniszczenia i ostatecznie śmierci komórki [96–102].

Związki koordynacyjne platyny odgrywają kluczową rolę w procesach chemioterapii od roku 1978, kiedy to cisplatyna (*cis*-diaminadichloroplatyna (II)) została wprowadzona w Stanach Zjednoczonych do leczenia jako czynnik chemioterapeutyczny [103]. Pomimo faktu, że zsyntetyzowano tysiące monojądrowych analogów cisplatyny jako potencjalnych leków antynowotworowych to tylko dwa karboplatyna i oksaliplatyna znalazły szersze zastosowanie kliniczne w leczeniu nowotworów, podczas gdy pozostałe nie potwierdziły zakładanych właściwości leczniczych [96, 103–115].

Właściwości przeciwnowotworowe kompleksów platyny są związane z selektywną reakcją z DNA poprzez tworzenie się systemów mostkowych z udziałem donorowych atomów N(7) i N(1) [105, 116], co wpływa na procesy replikacji i transkrypcji. W ostatnich latach oprócz badań nad związkami monojądrowymi platyny rozpoczęto badania związków polijądrowych zawierających w swej strukturze 2 lub 3 centra metaliczne. W przypadku tego typu związków oczekuje się większej cytotoxycywności z powodu mniej naprawialnych uszkodzeń DNA. Wśród tych związków wielojądrowe kompleksy platyny, zawierające mostkujące poliaminy, stanowią nową klasę związków o potencjalnie lepszej charakterystyce antynowotworowej, niż te dotąd stosowane (Rys. 5) [106, 109, 111, 116]. Wprowadzenie biogennej aminy do struktur kompleksów platynowych powoduje znaczne zwiększenie ich efektywności cytotoxycywnych [109, 111, 117, 118]. Dimery nowej klasy kompleksów, w porównaniu do ich monomerycznych analogów, charakteryzują się szerszym zakresem aktywności wynikającym z możliwości tworzenia się nietypowych wewnętrznych i zewnętrznych połączeń krzyżowych wewnątrz helisy DNA [106, 109]. Co ciekawe, nawet małe różnice w strukturze poliamin prowadzić mogą do istotnych zmian w cytotoxycywnych właściwościach ich kompleksów z platyną. Obok zależności struktura-aktywność, cytotoxycywna efektywność biocząsteczek zależy również od ładunku, elastyczności i oddziaływań niekowalencyjnych [102, 109]. Wiele z polifunkcjonalnych chelatów zawierających di, tri czy też tetraaminy jako czynniki mostkujące są obecnie obiektem intensywnych prac [117, 119–128]. Jeden ze związków polijądrowych platyny(II) BBR3464, przeszedł pozytywnie testy kliniczne (Rys. 5) [119] i w najbliższym czasie będzie wprowadzony jako terapeutyk. Badano również aktywność cytotoxycywną nowych kompleksów poliamin z platyną(IV) [116, 120, 121]. Terapeutyczne możliwości kompleksów platyny(IV) w relacji do platyny(II) są podobne, ponieważ, jak się to sugeruje, *in vivo* nastę-

puje redukcja jonów Pt(IV) do Pt(II). W poszukiwaniach specyfików antynowotworowych lepsza rozpuszczalność w wodzie związków platyny(IV) ma ogromne znaczenie [110]. Intensywny rozwój nowoczesnych terapeutyków antyrakowych o szerokim farmakologicznym spektrum działania, łączących wysoki profil terapeutyczny z niską toksycznością polijądrowych kompleksów platyny dają duże nadzieje na zastąpienie takich leków jak cisplatyna i karboplatyna w chorobach, w których wykazują one niską skuteczność. Aminy biogenne putrescyna, spermidyna i spermina oraz ich N-alkilowane odpowiedniki są stosowane w szczególności jako ligandy mostkujące w kompleksach Pt(II) ale także z Pd(II) [107, 109, 110, 125, 129–142] Stwierdzono, że ID50 kompleksów palladu(II) z putrescyną i spermidyną jest dużo lepsze niż dla *cis*-DDP, jednak wartość ta jest wyraźnie gorsza dla sperminy, co koresponduje z faktem, że ta ostatnia amina nie może wywołać zmian konformacyjnych DNA [107, 108]. Wzrost aktywności przeciwnowotworowej związków, w których podstawiono Pd(II) w miejsce Pt(II) jest dość dokładnie opisywana w literaturze [143–146]. Szereg trijądrowych kompleksów poliamin z Pt(II) i Pd(II) zsyntetyzowano w celu uzyskania informacji o zależności struktura/aktywność w aspekcie ich potencjalnej właściwości cytotoksycznej [147]. Kompleks palladu w większym stopniu niż kompleks platyny redukuje komórkową aktywność dekarboksylazy ornityny [148]. Wśród rozpoznanych funkcji poliamin w procesach, w układach żywych, wpływających na wzrost, różnicowanie czy śmierć komórek zwrócić należy uwagę na ochronę kwasu nukleinowego przed uszkodzeniem w wyniku działania reaktywnych czynników oksydacyjnych (ROS) generowanych przez różnego typu substancje, także przez jony metali przejściowych: Cu(II), Fe(II) [149–151]. Zaobserwowano także znacznie mniej wyraźny spadek w żywotności komórek dla kultur traktowanych kompleksem BBR3464 niż dla tych, gdzie zastosowano *cis*-platynę. Ta różnica w cytotoksyczności jest wynikiem szybszej wewnątrzkomórkowej akumulacji wiązania do DNA trijądrowego kompleksu w porównaniu do *cis*-platyny [144].

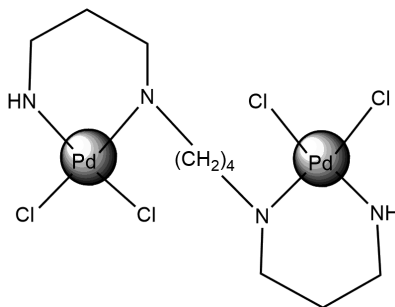


Rysunek 5. Kompleksy PA wykazujące aktywność antynowotworową [95]

Figure 5. Polyamine-transition metal complexes with antitumour activity [95]

Związki polijądrowe dały bardzo obiecujące rezultaty w kierunku leczenia raka trzustki, płuc, jajników i czerniaka, lecz ze względu na rozległy metabolizm oraz nieodwracalny proces łączenia się z białkami znajdującymi się w osoczu krwi zostały odrzucone w II fazie testów klinicznych [152–154].

Badano także efekt cytotoksyczny chelatu dijądrowego Pd(II) sperminy ($\text{PdCl}_2)_2(\text{Spm})$ (Rys. 6), na linie komórek nowotworu jamy ustnej (HSC-3) [109]. Uzyskane wyniki potwierdziły wzrost aktywności cytotoksycznej podstawionych związków Pd(II) w porównaniu do kompleksu Pt(II) [155].



Rysunek 6. Wzór chelatu dijądrowego Pd(II) sperminy ($\text{PdCl}_2)_2(\text{Spm})$
Figure 6. Tentative mode of coordination in ($\text{PdCl}_2)_2(\text{Spm})$

Kompleksy Pd(II) są zwykle bardzo labilne i ich deaktywacja przez izomeryzację cis/trans jest mało prawdopodobna. Wprowadzona do kompleksu spermina tworzy bardzo silne połączenia chelatowe z Pd(II), ze względu na duży efekt chelatowania [132], narzucając koordynację cis ligandom labilnym, takim jak Cl^- , zapobiegając dezaktywacji. Przeciwnie dezaktywacja w wyniku oddziaływania ze składnikami komórkowymi innymi niż DNA w wyniku wysokiej labilności obserwowanej dla kompleksów Pd(II) jest możliwa.

Można zaobserwować znacznie większy zakres ligandów ulegających wymianie w przypadku kompleksów Pd(II) niż dla analogicznych form z Pt(II). Istotny jest fakt, że wewnątrz komórki ($\text{PdCl}_2)_2(\text{Spm})$ (Rys. 6) ulega szybkiej hydrolizie, co umożliwia powstawanie uwodnionych indywiduów oddziałujących intensywniej z innymi składnikami komórkowymi (np. z tiolami) wcześniej niż z DNA. Pomimo że szybkość wymiany wody dla $\text{Pd}(\text{H}_2\text{O})_3^{2+}$ jest 106 razy wyższa niż dla $\text{Pt}(\text{H}_2\text{O})_4^{2+}$ [132, 141], dla innych układów kompleksy Pd(II) oraz Pt(II) mogą wykazywać identyczną szybkość wymiany ligandów [156–158].

Analogi poliamin N1,N11-bis(etylo)norspermina (BENSpm), N1-cyklo-propylometylo-N11-etylonorspermina (CPENSpm) jak również zsyntetyzowane dwujądrowe kompleksy Pd_2BENSpm (Pd-BENSpm), $\text{Pt}_2\text{CPENSpm}$ (Pt-CPENSpm) i Pd_2Spm (Pd-Spm) były badane na linii komórkowej nabłonka gruczołu piersiowego MCF-10A oraz na liniach komórkowych raka piersi JIMT-1 i L56BR-C1 w celu określenia ich aktywności. Uzyskane wyniki wykazały, że przyłączenie palladu do BENSpm skutkuje zwiększeniem cytotoksyczności w przeciwieństwie do skompleksowania platyny CPENSpm, w wyniku którego następuje redukcja cytotoksyczności. Ponadto Pd-BENSpm było najbardziej efektywnym związkiem niszczącym DNA i obniżającym populację tworzenia kolonii komórek. Z drugiej strony Pt-CPENSpm oraz Pd-Spm wykazują mniejszą toksyczność we wszystkich testach. Pd-Spm

skutecznie redukuje poziom komórkowych glutationianów, które prawdopodobnie występują w konsekwencji ich metabolicznej dezaktywacji poprzez przyłączenie do ich części endogenicznych tioli. W przypadku zdrowych komórek związki te są dużo mniej czułe jako czynniki działające niż w stosunku do komórek zdrowych. Tworzenie wielu połączeń typu *cross-links* z DNA prowadzi do zniekształcenia cząsteczki DNA. Kluczowe procesy biologiczne takie jak replikacja i transkrypcja DNA są hamowane, co skutkuje nieprawidłową syntezą białek i w konsekwencji zahamowaniem proliferacji komórek nowotworowych [159]. Problemy związane z występowaniem efektów ubocznych takich jak neurotoksyczność, nefrotoksyczność oraz rozszerzanie się nabytej odporności na leki należą do głównych czynników limitujących prawidłowy proces leczenia za pomocą *cis*-platyny, które w przypadku związków polijądrowych zawierających w swej budowie mostkujące aminy są znacznie obniżone [160].

UWAGI KOŃCOWE

Nie ulega wątpliwości, że poliaminy należą do substancji odgrywających kluczową rolę w wielu procesach życiowych. Całkowite stężenie PA w organizmach jest rzędu milimoli, jednakże stężenie wolnych poliamin jest relatywnie niskie. Wysokie stężenie niezwiązanych poliamin obserwowane jest w komórkach młodych w tym komórkach nowotworowych pozwala na detekcję stanów chorobowych oraz postępu leczenia poprzez badanie stężenia PA w moczu i krwi, a regulacja stężenia poliamin, ich biosyntezy i katabolizmu jest jedną z ważniejszych dróg w strategii poszukiwań chemioterapeutyków. Ingerowanie w metabolizm poliamin (poprzez stosowanie inhibitorów syntezy czy aktywatorów katabolizmu) wydaje się zasadne w przypadku zapobiegania stanom zapalnym odpowiedzialnym za powstawanie nowotworów. Ponadto stwierdzono, że wielojądrowe kompleksy platyny, zawierające mostkujące poliaminy, stanowią nową klasę związków o potencjalnie lepszej charakterystyce antynowotorowej niż stosowane dotąd leki takie jak *cis*-platyna czy karboksyplatyna. Wprowadzenie biogennej aminy do struktur kompleksów platynowych powoduje znaczne zwiększenie ich efektywności cytotoksycznych.

PODZIĘKOWANIE

Autorzy pragną podziękować wydawnictwu de Gruyter, które wydało rozszerzoną anglojęzyczną wersję tego artykułu w książce „New Generation of Bio-Inorganic Complexes” oraz profesorowi Lechosławowi Łomozikowi współautorowi wersji angielskiej.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] E.W. Gerner, F.L. Jr. Meyskens, *Nat. Rev. Cancer*, 2004, **4**, 781.
- [2] S.S. Cohen, *A Guide to the Polyamines*, Oxford University Press, New York, 1998.
- [3] L.J. Marton, A.E. Pegg, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 1995, **35**, 55.
- [4] A.E. Pegg, *Cancer Res.*, 1988, **48**, 759.
- [5] H.M. Wallace, A.V. Fraser, A. Hughes, *Biochem. J.*, 2003, **376**, 1.
- [6] B. Ganem, *Acc. Chem. Res.*, 1982, **15**, 290.
- [7] S. Yamamoto, Y. Koumoto, S. Shikami, S. Shinoda, *Microbiol. Immunol.*, 1990, **34**, 575.
- [8] L. Lomozik, A. Gasowska, R. Bregier-Jarzebowska, R. Jastrzab, *Coord. Chem. Rev.*, 2005, **249**, 2335.
- [9] H. Bachrach, *Plant. Physiol. Biochem.*, 2010, **48**, 490.
- [10] A. Raina, J. Jänne, *Med. Biol.*, 1975, **53**, 121.
- [11] P. Scherer, H. Kneifel, *J. Bacteriol.*, 1983, **154**, 1315.
- [12] M.D. Bratek-Wiewiorowska, M. Alejska, M. Figlerowicz, J. Barciszewski, M. Wiewiorowski, M. Jaskolski, *Pure Appl. Chem.* 1987; **59**, 407.
- [13] M.L. Antonelli, S. Balzamo, V. Carunchio, E. Cernia, R. Purrello, J. Inorg. Biochem., 1988, **32**, 153.
- [14] H. Tabor, C.W. Tabor, *Pharmacol. Rev.*, 1964, **16**, 245.
- [15] J. Jänne, L. Alhonen, P. Leinonen, *Ann. Med.*, 1991, **23**, 241.
- [16] A. Manni, *Cancer Lett.*, 1995, **92**, 49.
- [17] S. Gupta, N. Ahmad, S.R. Marengo, G.T. MacLennan, N.M. Greenberg, H. Mukhtar, *Cancer Res.*, 2000, **60**, 5125.
- [18] S.K. Gilmour, *Toxic. Appl. Pharm.*, 2007, **224**, 249.
- [19] J.R. Jr. Upp, R. Saydjari, C.M. Jr. Townsend, P. Singh, S.C. Barranco, J.C. Thompson, *Ann. Surg.*, 1989, **207**, 662.
- [20] H.G. Williams-Ashman, Z.N. Canellakis, *Perspect. Biol. Med.*, 1979, **22**, 421.
- [21] J. Jänne, A. Raina, M. Siimes, *Acta Physiol. Scand.*, 1964, **62**, 352.
- [22] O.P. Shukla, *J. Sci. Ind. Res.*, 1990, **49**, 263.
- [23] B. Frydman, W.M. Westler, K. Samejima, *J. Org. Chem.*, 1996, **61**, 2588.
- [24] B.G. Feuerstein, L.D. Williams, H.S. Basu, L.J. Marton, *J. Cell Biochem.*, 1991, **46**, 37.
- [25] H.C. Ha, N.S. Sirisoma, P. Kuppusamy, J.L. Zweier, P.M. Woster, R.A. Jr. Casero, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, **95**, 11140.
- [26] H.T. Kurata, L.J. Marton, C.G. Nichols, *J. Gen. Physiol.*, 2006, **127**, 467.
- [27] J.H. Park, *J. Biochem.*, 2006, **139**, 161.
- [28] J.H. Park, L. Aravind, E.C. Wolf, J. Kaewel, Y.S. Kim, M.H. Park, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006, **103**, 51.
- [29] K.E. Tobias, J. Shor, C. Kahana, *Oncogene*, 1995, **11**, 1721.
- [30] L.M. Shantz, V.A. Levin, *Amino Acids*, 2007, **33**, 213.
- [31] E. Holtta, L. Sistonen, K. Alitalo, *J. Biol. Chem.*, 1988, **263**, 4500.
- [32] N.A. Ignatenko, N. Babbar, D. Mehta, *Mol. Carcinog.*, 2004, **39**, 91.
- [33] P. Celano, C.M. Berchtold, F.M. Giardiello, R.A. Jr. Casero, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1989, **165**, 384.
- [34] G. Packham, C. Bello-Fernandez, J.L. Cleveland, *Cell. Mol. Biol. Res.*, 1994, **40**, 699.
- [35] J.A. Nilsson, K.H. Maclean, U.B. Keller, H. Pendeville, T.A. Baudino, J.L. Cleveland, *Mol. Cell Biol.*, 2004, **24**, 1560.
- [36] L.R. Sauders, E. Verdin, *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, 2006, **47**, 1093.
- [37] S.I. Harik, S.H. Snyder, *Brain. Res.*, 1974, **66**, 328.
- [38] G.G. Shaw, A.J. Pateman, *J. Neurochem.*, 1973, **20**, 1225.

- [39] C.W. Tabor, H. Tabor, *Annu. Rev. Biochem.*, 1984, **53**, 749.
- [40] N. Seiler, *J. Chromatogr.*, 1986, **379**, 157.
- [41] F. Schuber, *Biochem. J.*, 1989, **260**, 1.
- [42] C.W. Tabor, H. Tabor, *Annu. Rev. Biochem.*, 1976, **45**, 285.
- [43] J. Jänne, H. Pösö, A. Raina, *Biochim. Biophys. Acta*, 1978, **473**, 241.
- [44] P.E. Baze, G. Milano, P. Verrando, N. Renée, J.P. Ortonne, *Arch. Dermatol. Res.*, 1983, **275**, 218.
- [45] A.E. Pegg, *J. Biol. Chem.*, 2006, **281**, 14529.
- [46] Y. Takeda, K. Sameima, K. Nagano, M. Watanabe, H. Sugeta, Y. Kyogoku, *Eur. J. Biochem.*, 1983, **130**, 383.
- [47] H.R. Matthews, *Bioessays*, 1993, **15**, 561.
- [48] S.S. Cohen, *Nature*, 1978, **274**, 209.
- [49] W. Saenger, *Principles of Nucleic Acid Structure*, N.Y. Springer Verlag, 1984.
- [50] W.H. Braunlin, T.J. Strick, M.T. Record, *Biopolymers*, 1982, **21**, 1301.
- [51] Y. Fang, J.H. Hoh, *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, **120**, 8904.
- [52] I. Matsui, L. Wiegand, A.E. Pegg, *J. Biol. Chem.*, 1981, **256**, 2454.
- [53] A.E. Pegg, I. Matsui, J.E. Seely, M.L. Pritchard, H. Poso, *Med. Biol.*, 1981, **59**, 327.
- [54] L. Persson, A.E. Pegg, *J. Biol. Chem.*, 1984, **259**, 12364.
- [55] R.A. Jr. Casero, A.E. Pegg, *FASEB J.*, 1993, **7**, 653.
- [56] R.A. Jr. Casero, P. Celano, S.J. Ervin, N.B. Applegren, L. Wiest, A.E. Pegg, *J. Biol. Chem.*, 1991, **266**, 810.
- [57] R.A. Casero, A.E. Pegg, *Biochem. J.*, 2005, **421**, 323.
- [58] E. Holtta, *Biochem.*, 1977, **16**, 91.
- [59] E. Holtta, *Methods Enzymol.*, 1983, **94**, 306.
- [60] S. Vujcic, P. Liang, P. Diegelman, D.L. Kramer, C.W. Porter, *Biochem. J.*, 2003, **370**, 19.
- [61] T. Wu, V. Yankovskaya, W.S. McIntire, *J. Biol. Chem.*, 2003, **278**, 20514.
- [62] Y. Wang, A. Hacker, T. Murray-Stewart, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 2005, **56**, 83.
- [63] H.M. Wallace, J. Duthie, D.M. Evans, S. Lamond, K.M. Nicoll, S.D. Heys, *Clin. Cancer Res.*, 2000, **6**, 3657.
- [64] X. Xie, R.J. Gillies, E.W. Gerner, *J. Biol. Chem.* 1997, **272**, 20484.
- [65] Y. Wang, W. Devereux, P.M. Woster, T.M. Stewart, A. Hacker, R.A. Jr. Casero, *Cancer Res.*, 2001, **61**, 5370.
- [66] S. Vujcic, P. Diegelman, C.J. Bacchi, D.L. Kramer, C.W. Porter, *Biochem. J.*, 2002, **367**, 665.
- [67] Y. Wang, T. Murray-Stewart, W. Devereux, A. Hacker, B. Frydman, P.M. Woster, R.A. Jr. Casero, *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 2003, **304**, 605.
- [68] N. Babbar, R.A. Jr. Casero, *Cancer Res.*, 2006, **66**, 11125.
- [69] A.C. Goodwin, C.E.D. Shields, S. Wu, D.L. Huso, X. Wu, T.R. Murray-Stewart, A. Hacker-Prietz, S. Rabizadeh, P.M. Woster, C.L. Sears, R.A. Casero, *P. Natl. Acad. Sci. USA*, 2008, **108**, 15354.
- [70] R.A. Jr. Casero, L.J. Marton, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2007, **6**, 373.
- [71] A.E. Pegg, *IUBMB Life*, 2009, **61**, 880.
- [72] H.M. Wallace, *Eur. J. Clin. Invest.*, 2000, **30**, 1.
- [73] D. Soulet, B. Gagnon, S. Rivest, M. Audette, R.A. Poulin, *J. Biol. Chem.*, 2004, **279**, 49355.
- [74] M. Belting, S. Persson, L.A. Fransson, *Biochem. J.*, 1999, **338**, 317.
- [75] M. Belting, K. Mani, M. Jönsson, F. Cheng, S. Sandgren, S. Jonsson, K. Ding, J.G. Delcros, L.A. Fransson, *J. Biol. Chem.*, 2003, **278**, 47181.
- [76] G.M. Cragg, P.G. Grothaus, D.J. Newman, *Chem. Rev.* 2009, **109**, 3012.
- [77] R.A. Jr. Casero, Y. Wang, T.M. Stewart, W. Devereux, A. Hacker, Y. Wang, R. Smith, P.M. Woster, *Biochem. Soc. Trans.*, 2003, **31**, 361.

- [78] F. Balkwill, A. Mantovani, *Lancet*, 2001, **357**, 539.
- [79] L.M. Coussens, Z. Werb, *Nature*, 2002, **420**, 860.
- [80] I. Holm, L. Persson, O. Heby, N. Seiler, *Biochim. Biophys. Acta*, 1988, **972**, 239.
- [81] A. Anchini, L. Fabbrizzi, R. Barbucci, A. Mastroianni, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 1977, 2224.
- [82] L. Lomozik, *Metal complexes with polyamines*, [w:] *Handbook of metal-ligand interaction in biological fluids*, (Berthon G., Red.), New York, Basel, Hong Kong, Marcel Dekker Inc., 1995, 686.
- [83] M.L. Edwards, D.M. Stemerick, J.R. McCarthy, *Tetrahedron*, 1994, **50**, 5579.
- [84] T. Thomas, T.J. Thomas, *Cell Mol. Life Sci.*, 2001, **58**, 244.
- [85] D. Russell, S.H. Snyder, *P. Natl. Acad. Sci. USA*, 1968, **60**, 1420.
- [86] F.M. Giardiello, S.R. Hamilton, L.M. Hyland, *Cancer Res.*, 1997, **57**, 199.
- [87] C.A. Elmets, M. Athar, *Cancer Prev. Res.*, 2010, **3**, 8.
- [88] A. Manni, D. Mauger, P. Gimotty, B. Badger, *Clin. Cancer Res.*, 1996, **2**, 1901.
- [89] R. Chaturvedi, M. Asim, J. Romero-Gallo, D.P. Barry, S. Hoge, T. de Sablet, A.G. Delgado, L.E. Wroblewski, M.B. Piazuelo, F. Yan, D.A. Israel, R.A. Jr. Casero, P. Correa, A.P. Gobert, D.B. Polk, R.M. Jr. Peek, K.T. Wilson, *Gastroenterology*, 2011, **141**, 1696.
- [90] H. Xu, R. Chaturvedi, Y. Cheng, F.I. Bussiere, M. Asim, M.D. Yao, D. Potosky, S.J. Meltzer, J.G. Rhee, S.S. Kim, S.F. Moss, A. Hacker, Y. Wang, R.A. Casero, K.T. Wilson, *Cancer Res.*, 2004, **64**, 8521.
- [91] A.C. Goodwin, S. Jadallah, A. Toubaji, K. Lecksell, J.L. Hicks, *Prostate*, 2008, **68**, 766.
- [92] L. Alhonen, M. Halmekyto, V.M. Kosma, *Int. J. Cancer*, 1995, **63**, 402.
- [93] L. Huang, C. Zhu, Y. Sun, G. Xie, G.G. Mackenzie, G. Qiao, D. Komninou, B. Rigas, *Carcinogenesis*, 2010, **31**, 1982.
- [94] N. Babbar, N.A. Ignatenko, R.A. Jr. Casero, E.W. Gerner, *J. Biol. Chem.*, 2003, **278**, 47762.
- [95] M.D.T. Senanayake, H. Amunugama, T.D. Boncher, R.A. Casero, P.M. Woster, *Essays. Biochem.*, 2009, **46**, 77.
- [96] P.J. Dyson, G. Sava, *Dalton Trans.*, 2006, **16**, 1929.
- [97] M. Gielen, *Metal Based Antitumor Drugs*, Freud, London UK 1988.
- [98] N. Farrell, *Uses of Inorganic Chemistry in Medicine*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 1999.
- [99] S.P. Fricker, *Dalton Tran.*, 2007, **43**, 4903.
- [100] M.J. Hannon, *Pure Appl. Chem.*, 2007, **79**, 2243.
- [101] S.H. Rijt, P.J. Sadler, *Drug Discov. Today*, 2009, **14**, 1089.
- [102] N. Farrell, *Polynuclear platinum drugs*, [w:] *Metal Ions in Biological Systems*, (H. Sigel, Red.) Vol. 42, *Metal Complexes in Tumor Diagnosis and as Anticancer Agents*, 2004, 251.
- [103] D. Lebwahl, R. Canetta, *Eur. J. Cancer*, 1998, **34**, 1522.
- [104] H. Brunner, P. Hankofer, U. Holzinger, B. Treitinger, H. Schonenberger, *Eur. J. Med. Chem.*, 1990, **25**, 35.
- [105] N. Farrell, Y. Qu, L. Feng, B. Van Houten, *Biochem.*, 1990, **29**, 9522.
- [106] J.D. Roberts, B. Van Houten, Y. Qu, N.P. Farrell, *Nucleic Acids Res.*, 1989, **17**, 9719.
- [107] C. Navarro-Ranninger, F. Zamora, J.M. Perez, I. Lopez-Solera, S. Martinez-Carrera, J.R. Masaguer, C. Alonso, *J. Inorg. Biochem.*, 1992, **46**, 267.
- [108] C. Navarro-Ranninger, J.M. Perez, F. Zamora, V.M. Gonzales, J.R. Masaguer, C. Alonso, *J. Inorg. Biochem.*, 1993, **52**, 37.
- [109] L.J. Teixeira, M. Seabra, E. Reis, M.T. Girao da Cruz, M.C. Pedroso de Lima, E. Pereira, M.A. Miranda, M.P.M. Marques, *J. Med. Chem.*, 2004, **47**, 2917.
- [110] C. Navarro-Ranninger, P. Amo-Ochoa, J.M. Perez, V.M. Gonzalez, J.M. Masaguer, C. Alonso, *J. Inorg. Biochem.*, 1994, **53**, 177.
- [111] H. Rauter, R. Di Domenico, E. Menta, A. Oliva, Y. Qu, N. Farrell, *Inorg. Chem.*, 1997, **36**, 3919.

- [112] Y. Jung, S.J. Lippard, *Chem. Rev.*, 2007, **107**, 1387.
- [113] T. Rau, R. van Eldik, *Metal Ions in Biological Systems*, New York, NY, USA, 1996.
- [114] C. Orvig, M.J. Abrams, *Chem. Rev.*, 1999, **99**, 2202.
- [115] C.S. Allardyce, A. Dorcier, C. Scolaro, P.J. Dyson, *Appl. Organomet. Chem.*, 2005, **19**, 1.
- [116] P. Amo-Ochoa, V.M. Gonzalez, J.M. Perez, J.R. Masaguer, C. Alonso, C. Navarro-Ranninger, *J. Inorg. Biochem.*, 1996, **64**, 287.
- [117] N. Farrell, *Cancer Invest.*, 1993, **11**, 578.
- [118] B.A.J. Jansen, J. Van der Zwan, J. Reedijk, H. Den Dulk, J.A. Brouwer, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 1999, **9**, 1429.
- [119] A.H. Calvert, H. Thomas, N. Colombo, M. Gore, H. Earl, L. Sena, G. Camboni, P. Liati, C. Sessa, *Eur. J. Cancer*, 2001, **37**, 260.
- [120] H. Souzu, *Biochem. Biophys. Acta*, 1986, **861**, 353.
- [121] A. Alvarez-Valdes, J.M. Perez, I. Lopez-Solera, R. Lannegrand, J.M. Contiente, P. Amo-Ochoa, M.J. Camazon, X. Solans, M. Font-Bardia, C. Navarro-Ranninger, *J. Med. Chem.*, 2002, **45**, 1835.
- [122] K. Nishioka, *Polyamines in Cancer: Basic Mechanisms and Clinical Approaches*, Springer, Berlin, Germany, 1966.
- [123] Y. Qu, N.J. Scarsdale, M.C. Tran, N.P. Farrell, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2003, **8**, 19.
- [124] K. Chvalova, J. Kasparkova, N. Farrell, V. Brabec, *FEBS J.*, 2006, **273**, 3467.
- [125] E. Monti, M. Gariboldi, A. Maiocchi, *J. Med. Chem.*, 2005, **48**, 857.
- [126] M.R. Costa Couri, M. Vieira de Almeida, A.P. Soares Fontes, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2006, **9**, 1868.
- [127] Q. Liu, Y. Qu, R. van Antwerpen, N. Farrell, *Biochem.*, 2006, **45**, 4248.
- [128] J.W. Williams, Y. Qu, G.H. Bulluss, E. Alvorado, N.P. Farrell, *Inorg. Chem.*, 2007, **46**, 5820.
- [129] S. Kameda, T. Moulai, M. Chikuma, *Nucleic Acids Res.*, 2011, **39**, 325.
- [130] S.M. Fiuza, A.M. Amado, P.J. Oliveira, V.A. Sardão, L.A.E. Batista de Carvalho, M.P.M. Marques, *Lett. Drug Des. Discov.*, 2006, **3**, 149.
- [131] M.P.M. Marques, T. Girão, M.C. Pedrosa de Lima, A. Gameiro, E. Pereira, P. Garcia, *BBA-Mol. Cell Res.*, 2002, **1589**, 63.
- [132] A.S. Soares, S.M. Fiuza, M.J. Gonçalves, L.A.E. Batista de Carvalho, M.P.M. Marques, A.M. Urbano, *Lett. Drug Des. Discov.*, 2007, **4**, 460.
- [133] C. Navarro-Ranninger, J.M. Perez, F. Zamora, V.M. Gonzalez, J.R. Masaguer, C. Alonso, *J. Inorg. Biochem.*, 1993, **52**, 37.
- [134] M. Navarro, N.P. Peña, I. Colmenares, T. González, M. Arsenak, P. Taylor, *J. Inorg. Biochem.*, 2006, **100**, 152.
- [135] A. Hegmans, J. Kasparkova, O. Vrana, L.R. Kelland, V. Brabec, N.P. Farrell, *J. Med. Chem.*, 2008, **51**, 2254.
- [136] S.M. Fiuza, A.M. Amado, H.F. dos Santos, M.P.M. Marques, L.A.E. Batista de Carvalho, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2010, **12**, 14309.
- [137] R. Tummla, P. Diegelman, S.M. Fiuza, *Oncol. Rep.*, 2010, **24**, 15.
- [138] R. Tummla, P. Diegelman, S. Hector, *Cancer Chemoth. Pharm.*, 2011, **67**, 401.
- [139] O. Corduneanu, A.M. Chiorcea-Paquim, S.M. Fiuza, M.P.M. Marques, A.M. Oliveira-Brett, *Bioelectrochemistry*, 2010, **78**, 97.
- [140] O. Corduneanu, A.M. Chiorcea-Paquim, V. Diculescu, S.F.M. Fiuza, M.P.M. Marques, A.M. Oliveira-Brett, *Anal. Chem.*, 2010, **82**, 1245.
- [141] S.M. Fiuza, J. Holy, L.A.E. Batista de Carvalho, M.P.M. Marques, *Chem. Biol. Drug Des.*, 2011, **77**, 477.
- [142] A.L.M. Batista de Carvalho, S.M. Fiuza, J. Tomkinson, L.A.E. Batista de Carvalho, M.P.M. Marques, *Inter. J. Spect.*, 2012, **27**, 403.
- [143] W. Friebolin, G. Schilling, M. Zöller, E. Amtmann, *J. Med. Chem.*, 2005, **48**, 7925.

- [144] C. Manzotti, G. Pratesi, E. Menta, R. Di Domenico, E. Cavalletti, H.H. Fiebig, L.R. Kelland, N. Farrell, D. Polizzi, R. Supino, G. Pezzoni, F. Zunino, *Clin. Cancer Res.*, 2000, **6**, 2626
- [145] A. Messere, E. Fabri, M. Borgatti, R. Gambari, B. Di Blasio, C. Pedone, A. Romanelli, *J. Inorg. Biochem.*, 2007, **101**, 254
- [146] V. Alverdi, L. Giovagnini, C. Marzano, R. Seraglia, F. Bettio, S. Sitran, R. Graziani, D. Fregona, *J. Inorg. Biochem.*, 2004, **98**, 1117
- [147] M.P.M. Marques, L.A.E. Batista de Carvalho, *Biochem. Soc. Trans.*, 2007, **35**, 374
- [148] T.M. Silva, S. Andersson, S.K. Sukumaran, M.P. Marques, L. Persson, S. Oredsson, *PLoS ONE*, 2013, **8**, e55651
- [149] B. Tadolini, *Mol. Cell Biochem.*, 1988, **83**, 179
- [150] B. Matkovics, V. Kecskemeti, S.I. Varga, Z. Novak, Z. Kertesz, *Comp. Biochem. Physiol. B*, 1993, **104**, 475
- [151] E. Pedreno, A. Lopez-Contreras, J. Cremades, A. Penafiel, *J. Inorg. Biochem.*, 2005, **99**, 2074
- [152] L. Kelland, *Nature Rev. Cancer*, 2007, **7**, 573
- [153] L. Gatti, P. Perego, R. Leone, *Mol. Pharmaceut.*, 2010, **7**, 207
- [154] D.I. Jodrell, T.R.J. Evans, W. Steward, *Eur. J. Cancer*, 2004, **40**, 1872
- [155] R. Bonomi, G. Saielli, P. Scrimin, F. Mancin, *Supramol. Chem.*, 2013, **25**, 665
- [156] N. Hallinan, V. Besançon, M. Forster, G. Elbaze, Y. Ducommun, A.E. Merbach, *Inorg. Chem.*, 1991, **30**, 1112
- [157] U. Frey, S. Elmroth, B. Moullet, L.I. Elding, A.E. Merbach, *Inorg. Chem.*, 1991, **30**, 5033
- [158] H. Hohmann, B. Hellquist, R. Van Eldik, *Inorg. Chim. Acta*, 1991, **188**, 25
- [159] D. Esteban-Fernández, E. Moreno-Gordaliza, B. Cañas, M.A. Palacios, M.M. Gómez-Gómez, *Metallomics*, 2010, **2**, 19
- [160] N. Farrell, J.A. McCleverty, T.J. Meyer, *Metal complexes as drugs and chemotherapeutic agents*, [w:] *Comprehensive Coordination Chemistry II*, Pergamon, Oxford, UK, 2003, 809.

Praca wpłynęła do Redakcji 10 stycznia 2015

KAMIENIE MIŁOWE W CHEMII KLINICZNEJ
MILESTONES IN CLINICAL CHEMISTRY

Katarzyna Klimasz, Przemysław J. Tomasik*

*Zakład Biochemii Klinicznej Instytut Pediatrii
Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego
ul. Wielicka 265, Kraków
e-mail: p.tomasik@uj.edu.pl

Mgr Katarzyna Klimasz, technik analityki medycznej; zainteresowania badawcze: początki diagnostyki laboratoryjnej jako samodzielnej dyscypliny, historia laboratoriów analitycznych we wiodących ośrodkach naukowych (Kraków, Lwów, Wilno, Warszawa, Poznań) ze szczególnym uwzględnieniem laboratoriów przy szpitalach pediatrycznych, rozwój badań analitycznych od czasów starożytnych do teraźniejszości.

dr hab. n. med. Przemysław Tomasik – adiunkt w Zakładzie Biochemii Klinicznej Instytutu Pediatrii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego. Autor ponad 80 publikacji naukowych. Zainteresowania: gastroenterologia dziecięca i diagnostyka laboratoryjna oraz diagnostyka *in vitro* w miejscu opieki nad pacjentem.

ABSTRACT

clinical chemistry is the science on the border of the two disciplines: medicine and chemistry. It is defined as the application of the chemistry in the study of biological samples in order to diagnose, treat, cure diseases as well as in monitoring and prognosis [1]. Development of clinical chemistry is dated on the 19th century. Biuret test, and a method for detection of sugar in the urine were then described, also blood gases were extracted [13, 17]. In the mid of 19th century blood could be analyzed for the presence of potassium, sodium, phosphorus and calcium [31]. In the second half of 19th century Duboscq built first colorimeter. This model was widely adapted in laboratories and was in use till the 20-ties of 20th century [44]. Colorimetry also became the most popular technique in the clinical chemistry. In the 80ties of 19th century was developed a method for estimating the concentration of creatinine and detection of bilirubin [36, 39]. Increasing number of available laboratory tests resulted in the separation laboratory diagnostic as a distinguish branch of science. At the beginning of 20th century has been introduced quantitative analytical methods for determination of ammonia, urea, creatinine, cholesterol, uric acid, nitrogen, phosphorus, and chloride in biological fluids as well as measurements of blood gases. In 1930 was introduced clinical enzymology with the first method for assessing the activity of alkaline phosphatase. In the mid of 20th century in the medical laboratories routinely were measured amylase, lipase, acid and alkaline phosphatase, phosphocreatine kinase, alanine and asparagine aminotransferases [78, 79]. Development of electrical engineering and computing resulted with intensive development of laboratory instruments. First automated spectrophotometer was invented in 1957 (Autoanalyzer, Technicon company). In 1970, Automatic Clinical Analyzer f. Du Pont was able to perform determinations in any configurations not as so far in the series [99].

Keywords: clinical chemistry, glucose, protein, enzymes, colorimetry

Słowa kluczowe: chemia kliniczna, glukoza, białko, enzymy, kolorymetria

Chemia kliniczna jest nauką z pogranicza dwóch dyscyplin, medycyny i chemii. Może być definiowana jako zastosowanie metodyki chemicznej w badaniu materiału biologicznego w celu diagnostyki, leczenia chorób, monitorowania ich przebiegu oraz prognozowania [1]. O ile początki alchemii w medycynie datują się na starożytność to intensywny rozwój chemii klinicznej obserwujemy w czasach nam współczesnych. Wiąże się to z postępem w biologii, chemii i fizyce ale też w inżynierii, programowaniu komputerowym, nanotechnologiach.

Opisując rozwój metod analitycznych w chemii klinicznej nie sposób nie wspomnieć o paru kluczowych postaciach. Phillipus Aureolus Theophrastus Bombastus von Hohenheim (1493–1541) znany jako Paracelsus, jako pierwszy próbował połączyć dwie dyscypliny naukowe: chemię, a właściwie alchemię i medycynę. Medycyna chemiczna, znana też jako jatrochemia lub chemiatria (ιατρός (iatros) – to po grecku lekarz) skupiała się głównie na leczeniu chorób za pomocą związków chemicznych. Paracelsus rozwinął także techniki ilościowego wykonywania badań ogólnych moczu.[2] Johann Babtist van Helmont (1579–1644) flamandzki lekarz i chemik, uważany za twórcę chemii fizjologicznej zwrócił uwagę na proces trawienia, który według niego był wynikiem naturalnej fermentacji. Wprowadził jako pierwszy pojęcie „gaz” i „węgla gaz” (dwutlenek węgla) [3]. Badania nad trawieniem i sokami trawiennymi kontynuował jego uczeń Franciscus Sylvius właśc. François Deleboe, (de la Boé) (1614–1672), natomiast odkrycie dwutlenku węgla przypisywane jest też Josephowi Blackowi (1728–1799), szkockiemu chemikowi. Wielki wkład w rozwój chemii klinicznej wniósł angielski fizyk, chemik, filozof i przyrodnik Robert Boyle (1629–1691). Użył terminu „analizy” aby opisać reakcje chemiczne, dzięki którym poszczególne substancje mogą być oddzielone od siebie i usystematyzował je. Wprowadził też definicję pierwiastka chemicznego, a także użył wskaźników w celu odróżnienia kwasów od zasad. Rozwinął chemiczną analizę jakościową i jako pierwszy opisał chemiczną analizę krwi [4]. W II połowie XVIII wieku drogę rozwoju chemii wytyczali Karl Wilhelm Scheele (1742–1786) – pierwszy zsyntetyzował glicerol, Joseph Priestley (1733–1804) odkrywca m.in. tlenu, amoniaku i tlenku węgla, Antoine Laurent Lavoisier (1743–1794) – wyjaśnił naturę procesu oddychania i koncepcję utleniania, oraz Justus von Liebig (1803–1873) – zapoczątkował ilościową analizę elementarną [5]. W XVII w. belgijski lekarz i chemik Johann Baptista van Helmont pierwszy raz wprowadził do badania moczu analizę wagową [6]. W roku 1694 Holender Dekker Federik Leiden zaobserwował, że mocz zawierający białko tworzy osady, gdy gotuje się go z dodatkiem kwasu octowego [7, 8]. Dzięki odkryciu Leidena badanie moczu stało się bardziej wartościowe i przydatne w diagnozowaniu chorób. Angielski lekarz Thomas Willis w 1674 r. odświeżył wiedzę starożytnych Greków, Chińczyków, Egipcjan czy Hindusów i wprowadził do ówczesnej diagnostyki test smaku moczu [9]. Test ten pozwalał odróżnić wielomocz towarzyszący cukrzycy od moczu prostej [8]. W 1776 r. Mattew Dobson udowodnił, że słodki smak moczu i surowicy krwi chorych na cukrzycę jest spowodowany obecnością cukru [9]. W 1789 r. Antoine François de Fourcroy odkrywa cholesterol. W XIX

wieku swój początek mają też pierwsze prace badawcze nad enzymami. W 1835 r. Theodor Ambrose Hubert Schwann doniósł o obecności pepsyny w soku żołądkowym, a dziesięć lat później Louis Mialhe odkrył amylazę w ślinie. W 1846 r. Claude Bernard demonstruje jak w soku trzustkowym trawiona jest skrobia. Trzydzieści lat później Wilhelm Friedrich Kühne po raz pierwszy izoluje trypsynę.

Bardzo intensywny rozwój chemii klinicznej w latach 30. XIX w. doprowadził do wyodrębnienia diagnostyki laboratoryjnej jako osobnej gałęzi nauki. W 1830 r. Gerardus Mulder dokonał pierwszej analizy pierwiastkowej białek, a trzy lata później reakcja biuretowa została opisana przez Ferdinanda Rosego. Rose do roztworu białka jajka dodał siarczanu miedzi(II) oraz wodorotlenku potasowego, co spowodowało powstanie fioletowego zabarwienia roztworu [10]. W roku 1857 opisał ją niezależnie polski fizjolog Gustaw Piotrowski stąd czasami nazywano ją reakcją Piotrowskiego [11]. W roku 1844 Johann Florian Heller opisał test wykrywający obecność albuminy w moczu [4]. Po dodaniu do moczu stężonego kwasu azotowego na granicy płynów powstaje biały pierścień, który świadczy o obecności albuminy w badanym materiale [12]. Test ten nazwano od nazwiska odkrywcy testem pierścieniowym Hellera.

W 1837 r. Theodor Ludwig Wilhelm von Bischoff posługując się analizami biochemicznymi ustalił, że we krwi obecny jest wolny tlen i wolny dwutlenek węgla. Natomiast fizyk berliński Heinrich Gustav Magnus za pomocą aparatu próżniowego Toricellego ekstrahował lotne składniki (gazy) krwi i wykazał we krwi tętnicznej, a także żylny obecność tlenu, dwutlenku węgla i azotu. Naukowiec ten udowodnił, że we krwi tętnicznej przeważa tlen a w żylny dwutlenek węgla [3].

W 1838 r. George Owen Rees wykazał obecność glukozy we krwi cukrzyków i wyizolował ją w postaci kryształów [13]. W 1841 r. Karl August Trommer opracował metodę wykrywania cukru w moczu. W metodzie tej cukry redukują kationy miedzi Cu^{2+} same utleniając się do kwasów aldonowych (np. glukoza utlenia się do kwasu glukonowego). Nie miała ona jednak tak szerokiego zastosowania jak jej modyfikacja, którą w 1849 r. rozpowszechnił niemiecki chemik Hermann Christian von Fehling [14, 15]. Przeprowadza się ją przy użyciu odczynnika Fehlinga tj. kationów miedzi(II) kompleksowanych anionami winianowymi. Pojawienie się czerwonego osadu tlenku miedzi(I) oznacza pozytywny wynik próby [5].

W 1844 r. Max Joseph von Pettenkofer pierwszy opisał proces wykrywania kwasów żółciowych [16]. Test nazywany od nazwiska odkrywcy polegał na reakcji kwasów żółciowych z hydroksymetylofurfurałem – powstającym w czasie działania stężonego kwasu siarkowego na sacharozę [17, 18]. Pojawienie się barwy czerwonej lub fioletowej świadczyło o obecności w próbce kwasów żółciowych [19, 20].

W 1847 r. lekarz i chemik Henry Bence Jones publikuje opis patologicznego białka w moczu, które jest obecne u niektórych pacjentów z chorobami układu kostnego (szpiczakiem mnogim) [4]. Metoda wykrywania tzw. lekkich łańcuchów immunoglobulin opracowana została przez kolegów Bence Jonesa – doktorów MacIntyre'a i Watsona. Zauważyli oni, że mocz jednego z pacjentów jest opalizujący

jący. Badając ten mocz zauważyli białkowy osad wytrącony po podgrzaniu do temp. 60°C. Po dalszym podgrzaniu osad rozpuścił się, a schłodzenie moczu do temp. 60°C spowodowało ponowne pojawienie się osadu. Ze względu na niemożność identyfikacji białka wspomniani powyżej lekarze wysłali próbkę moczu do dr Bence Jonesa, który zweryfikował oraz opublikował ich odkrycie, w końcu białko nazwano jego nazwiskiem [21].

W 1850 r. Carl Schmidt przeprowadził pierwszą analizę krwi, która pozwoliła ustalić zawartość składników organicznych i nieorganicznych [22]. Schmidt analizował krew pod kątem obecności potasu, sodu, fosforu i wapnia. Odkrył, że większe stężenie potasu znajduje wewnątrz komórki, natomiast sód w wyższym stężeniu obecny jest w osoczu [23]. W 1854 r. Hermann Welcker zapoczątkował badania nad oznaczaniem barwnika krwi [22]. Nazwanie barwnika krwi hemoglobina i oznaczania jej stężeń nastąpiło dopiero w latach 1864–65 dzięki pracy Felixa Hoppe-Seylera [24].

W 1868 r. Max Jaffè zauważył, że po dodaniu cynku mocz gorączkujących pacjentów wykazuje silną, zieloną fluorescencję [25]. Reagujący w ten sposób związek nazwano urobiliną. Jaffè stwierdził także, że jest ona obecna również w moczu pacjentów zdrowych, lecz w innym stężeniu. Spostrzeżenie to przyczyniło się do podjęcia próby określania granic prawidłowych dla niektórych składników fizjologicznych moczu [14]. W 1886 r. Jaffè opracował metodę szacowania stężenia kreatyniny z użyciem pikrynianu. W wyniku reakcji pikrynianów z kreatyniną w środowisku alkalicznym powstaje pochodna 2,4,6,-trinitro-cykloheksadienu o zabarwieniu żółto-czerwonym. Intensywność zabarwienia jest wprost proporcjonalna do stężenia kreatyniny [26].

W 1884 r. Paul Ehrlich opisał reakcję bilirubiny z kwasem *p*-diazobenzeno-sulfonowym i zastosował ją do wykrywania bilirubiny w moczu [27]. W 1913 r. A. A. Hymens van den Bergh i J. Snapper użyli tego testu do wykazania obecności bilirubiny w surowicy krwi [28]. Bilirubina z dwuazowym kwasem sulfanilowym (odczynnik dwuazowy Ehrlicha) tworzy barwną pochodną azobilirubinę. Intensywność czerwonego zabarwienia jest proporcjonalna do ilości bilirubiny w surowicy krwi. Trzy lata później van den Bergh i P. Muller odkryli dwie formy bilirubiny: bezpośrednią – reagującą od razu z odczynnikiem Ehrlicha oraz tzw. bilirubinę pośrednią, która reagowała z odczynnikiem Ehrlicha po dodaniu do próbki metanolu [29]. W 1901 r. Ehrlich wprowadził metodę z *p*-dimetyloaminobenzaldehydem w obecności kwasu solnego, który daje zabarwienie czerwone w teście na obecność urobilinogenu w moczu. W 1925 r. Adrianus Johannes Leonardus Terwen opisał metodę oznaczania urobilinogenu w stolcu [30]. W 1933 r. Armand J. Quick zaproponował test z kwasem hipurowym, aby ocenić funkcjonowanie wątroby. Test oparty był na reakcji sprzęgania w wątrobie egzogenego benzoesu sodu z glicyną, w konsekwencji czego powstaje kwas hipurowy, który następnie wydalany jest z moczem [31].

Otto Knut Folin (1867–1934) szwedzki profesor biochemii opracował w latach 1904–1922 ilościowe metody analityczne dla mocznika, amoniaku, kreatyniny, kwasu moczowego, azotu, fosforu i chlorków. Folin zaproponował oznaczanie mocznika za pomocą chlorku magnezu a kwasu moczowego przez strącanie siarczanem amonu i mianowanie osadu rozpuszczając go kwasem [32]. Kreatynina w alkalicznym roztworze kwasu pikrynowego daje zabarwienie czerwone. Folin wprowadził do chemii klinicznej kolorymetrię, mierząc zabarwienia próbek kreatyniny z odczynnikiem Jaffego w odniesieniu do zabarwienia roztworów kreatyniny o znanym stężeniu przy użyciu kolorymetru Duboscq'a [33, 34]. Folin opracował też pierwsze wartości prawidłowe dla kwasu moczowego we krwi, azotu mocznikowego oraz białka w surowicy krwi [35]. Folin i Hsien Wu w 1919 r. opracowali metodę wykrywania cukru poprzez redukcję kwasu wolframowego w próbce pełnej krwi, którą następnie filtrowano [36]. W 1923 r. swoją metodę oznaczania cukru wprowadzili Hans Christian Hagedorn i Briger Norman Jensen. W metodzie tej cukier redukuje żelazicyjanek do żelazocyjanku a nadmiar żelazicyjanku oznacza się jodometrycznie miareczkując tiosiarczanem [37].

W 1906 r. Richard Bauer wprowadził test tolerancji galaktozy z podaniem jej doustnie. Wykazał, że jest ona obecna w moczu po około 5 godzinach od podania [38]. Mocz pobrany od pacjenta badano metodami jakościowymi Fehlinga, Benedicta i Nylander'a. Brak cukru w moczu świadczył o wyniku negatywnym całego testu, gdy zaś stwierdzano jego obecność wówczas należało go oznaczyć ilościowo przy użyciu polarymetru [39].

Metody oznaczania sodu i potasu opracowane przez Benjamin'a Kramera i Fredericka F. Tisdalla były bardzo czasochłonne i niedokładne. W przypadku potasu zasada metody polegała na wytrąceniu potasu z surowicy jako azotynokobaltanu sodowo-potasowego i miareczkowaniu osadu nadmanganianem. Natomiast sód wytrącano jako piroantymonian po czym oznaczano jodometrycznie antymon [33]. Przełomem okazało się stworzenie fotometru płomieniowego. Chlorki w płynach biologicznych określano ilościowo po dodaniu stężonego azotanu srebra, który wytrącał je z badanego płynu ustrojowego. W 1921 r. J.C. Whitehorn zastosował tę procedurę z użyciem kwasu wolframowego, a następnie filtrował krew pełną [40].

W celu określenia stężenia wapnia używano metody Kramera-Tisdalla, która następnie została zmodyfikowana przez E.P. Clarka i J.B. Collipa w 1925 r. [41]. Zasada metody polegała na wytrąceniu wapnia szczawianem amonowym. Wytrącony szczawian wapnia rozpuszczał się w kwasie siarkowym. Uwolniony przy tym kwas szczawiowy oznaczano manganometrycznie. Technikę tę kontynuowano i standaryzowano przez następne 40 lat [42]. W 1922 r. Willey Glover Denis opracowała pierwszą metodę laboratoryjną pozwalającą na oznaczenie magnezu w surowicy krwi, osoczu i krwi pełnej. Metoda polegała na usunięciu wapnia jako szczawianu, następnie wytrąceniu magnezu w postaci fosforanu amonowo-magnezowego. W powstałym osadzie oznaczano kwas fosforowy kolorymetrycznie i z niego obliczano zawartość magnezu [43]. W oznaczeniach fosforu nieorganicznego wykorzy-

stywano kwas molibdenowy. Postępem było wprowadzenie w 1921 r. przez Cyrusa H. Fiske i Yellapragda Subbarowa kwasu alfa- aminonaftolosulfonowego jako czynnika redukującego a powstające niebieskie zabarwienie porównywano kolorymetrycznie z zabarwieniem roztworów wzorcowych [44]. Metoda ta stosowana była w laboratoriach aż do początku XXI wieku.

W 1939 r. Edward Joseph Conway i Robert Cooke opracowali pierwszą metodę laboratoryjną oznaczania amoniaku we krwi. Zasada oznaczenia polegała na wyparciu amoniaku przez nasycony roztwór węgla potasu i związanie go przez kwas borowy, a następnie miareczkowanie boranu amonowego kwasem siarkowym wobec wskaźnika Ma Zanzaga [45].

W 1902 r. Joseph Barcroft i John Scott Haldane wprowadzili pojęcie „gazometria” dla pomiaru gazów obecnych we krwi [46, 47]. Pierwsze satysfakcjonujące oznaczenie pH krwi nastąpiło w 1912 r. z użyciem elektrody wodorowej przez Karla Hasselbalcha i Christiana Lundsgaarda [48] oraz Leonora Michaelisa i W. Davidoffa [49]. Dziesięć lat później Glenn E. Cullen opisał kolorymetryczną metodę oznaczania pH w osoczu [50, 51]. Donald Dexter Van Slyke (1883–1971) użył jako pierwszy w 1917 r. gazometru własnej konstrukcji w celu określenia całkowitego dwutlenku węgla, tlenu i tlenku węgla we krwi pełnej [52]. Próbkę krwi zakwaszano a uwolniony dwutlenek węgla przedostawał się do komory, w której wytworzono próżnię. Później gaz sprężano do ciśnienia atmosferycznego i mierzono jego objętość [49].

Pierwsze metody określenia stężenia białka bazowały na procedurach Johana Kjeldahl'a. Do diagnostyki wprowadzili je w 1920 r. Glenn E. Cullen i Donald D. Van Slyke [53]. Związki organiczne spalano kwasem siarkowym(VI) w obecności katalizatora (jony miedzi). Uwolniony amoniak z powstałego siarczanu amonowego oznaczano przy pomocy miareczkowania [54].

Białko ostrej fazy (CRP) opisali po raz pierwszy w 1930 r. William Smith Tillett i Thomas Francis jr [55]. Przez ponad 50 lat CRP było oznaczane przede wszystkim dla potrzeb diagnostyki chorób reumatycznych przy użyciu metody immunodyfuzji radialnej, która była czasochłonna, wynik otrzymywano dopiero po 48 godzinach. W drugiej połowie lat 80-tych przy użyciu metod immunoturbidymetrycznych czas oczekiwania na wynik skrócił się do kilkunastu minut. Kolejnym etapem było zwiększenie czułości oznaczeń CRP (tzw. metody wysokiej czułości (ang. *high sensitivity*)) poprzez wykorzystanie cząstek lateksu opłaszczonych przeciwciałami [56].

W 1910 r. metodę oznaczania cholesterolu we krwi bazującą na reakcji Karla Theodora Liebermanna-H. Burcharda opisał A. Grigaut. Cholesterol w obecności kwasu siarkowego i bezwodnika kwasu octowego tworzy zielony kwas monosulfonowy bicholestadienu [57]. Natomiast bezpośrednią metodę chemicznego oznaczania triglicerydów opisał dopiero w 1957 r. Emile Van Handel i Donald Zilversmit. Po ekstrakcji lipidów i usunięciu fosfolipidów z ekstraktu, hydrolizuje się triglicerydy do gliceryny i wolnych kwasów tłuszczowych. Powstającą glicerynę oznacza się kolorymetrycznie. W metodzie do ekstrakcji wykorzystuje się chloroform a do absorpcji kwas krzemowy [58].

W 1930 r. Hubert Davenport Kay dał początek enzymologii klinicznej opracowując pierwszą metodę oceny aktywności fosfatazy alkalicznej. Jako substratu użył czystego krystalicznego β -glicerofosforanu sodu o pH 7,6 [59]. Dwa lata później I.S.Cherry i L.A. Crandall opracowali metody pomiaru aktywności lipazy w surowicy krwi. Najczęściej używanym substratem do oznaczania aktywności lipaz była oliwa z oliwek zawierająca trioleinian glicerolu. Zawiesinę oliwy inkubowano z próbką materiału biologicznego. Ilość uwolnionych kwasów tłuszczowych oznaczano przez miareczkowanie ługiem potasowym w obecności fenoloftaleiny jako wskaźnika [60].

W 1938 r. Michael Samogyi rozwinął metody oznaczania amylazy w surowicy i moczu. Zasada metody oparta jest na określeniu czasu potrzebnego do rozkładu skrobi z zaadsorbowanym na powierzchni jodem (niebieska barwa roztworu) przez obecną w badanym materiale biologicznym diastazę (amylazę) do niskocząsteczkowych dekstryn (roztwór bezbarwny) [61]. W tym samym roku Alexander B. Gutman i Ethel B. Gutman opracowali pierwszy test pozwalający określić aktywność fosfatazy kwaśnej w surowicy krwi. Jako substratu użyli fenylofosforanu [62]. Do 1948 r. w laboratoriach medycznych rutynowo oznaczano tylko cztery enzymy: amylazę i lipazę w diagnostyce ostrego zapalenia trzustki, fosfatazę kwaśną służącą jako wskaźnik przy diagnozowaniu raka prostaty oraz fosfatazę alkaliczną wykorzystywaną w diagnostyce żółtaczek lub zmian w układzie kostnym [63]. Intensywny rozwój enzymologii klinicznej przypadł na połowę XX w. W 1954 r. Stephen A. Kuby i współpracownicy opracowali metodę oznaczania kinazy fosfokreatynowej (CPK) [64]. W roku 1955 Arthur Karmen wprowadził metodę oznaczania aktywności aminotransferazy asparaginowej (AST), a Felix Wróblewski i John S. LaDue wprowadzili metodę oznaczania aktywności aminotransferazy alaninowej (ALT). AST katalizuje reakcję L-asparagianu i α -ketoglutaranu, w wyniku której powstaje szczawiooctan i L-glutaminian. Natomiast ALT katalizuje przeniesienie grupy aminowej od L-alaniny do α -ketoglutaranu z utworzeniem L-glutaminianu i pirogronianu [65]. Metody te, po modyfikacjach, dalej zalecane są przez IFCC (*International Federation of Clinical Chemistry*). W tym samym roku Wróblewski i LaDue wprowadzili metodę oznaczania dehydrogenazy mleczanowej (LDH), która również jest dalej zalecana przez IFCC. Dehydrogenaza mleczanowa katalizuje konwersję pirogronianu do mleczanu. Jednocześnie cząsteczka NADH utlenia się do cząsteczki NAD⁺. W roku 1960 oznaczono także aktywność gamma-glutamylotranspeptydazy (GGT) [66]. GGT katalizuje przeniesienie grupy γ -glutamylowej z L- γ -glutamilo-3-karboksy-4-nitroanilidu na glicyloglicynę, w wyniku czego powstaje L- γ -glutamylglicyloglicyna i żółto zabarwiony 5-amino-4-nitrobenzoesan. Szybkość przyrostu absorbancji mierzona przy długości fali 405 nm jest proporcjonalna do aktywności GGT. Metoda ta też jest obecnie powszechnie wykorzystywana.

Początki endokrynologii laboratoryjnej to przełom XIX i XX w. – w latach 1898–1902 John Jacob Abel i Jokichi Takamine wyizolowali po raz pierwszy aktywną epinefrynę (adrenalinę). Pierwszą metodę jej oznaczania (fluorymetryczną) zapro-

ponował Alf Lund w 1949 r. [67, 68]. W 1938 r. Frank Herbert Shaw wyizolował przy użyciu tlenku glinu katecholaminy z materiału biologicznego i opisał występowanie tych substancji we krwi i moczu ludzkim. W 1938 r. Nancy Helen Callow i Robert Kenneth Callow opisali występowanie 17-ketosterydów w moczu [69], a dwa lata później tym samym problemem zajęli się A.F. Holtroff i F.C. Koch. Naukowcy wykozystali w tym celu reakcję Zimmermana, który 1935 roku zauważył, że 17-ketosterydy z *m*-dinitrobenzenem w zasadowym roztworze alkoholu zabarwiają się na kolor czerwony [70]. 17-hydroksykortykosterydy nie były oznaczane w laboratoriach aż do 1950 r., kiedy to Curt C. Porter i Robert H. Silber opisali reakcję kolorymetryczną z fenylohydrazyną [71]. W 1919 r. Edward Calvin Kendall jako pierwszy wyizolował tyroksynę, a jej budowę chemiczną odkrył Charles Robert Harington w 1926 r. [72]. W 1937 r. Ernest Birger Sandell i Izaak Maurits Kolthoff przedstawili czułą metodę pomiaru jodu [73], a w 1939 r. Virginia Trevorrow zademonstrowała, że jod we krwi występuje w dwóch formach: organicznej i nieorganicznej [74]. Druga połowa XX w. to szybki rozwój diagnostyki hormonalnej jednak związany z postęпами w immunologii i immunochemii.

Podobna sytuacja ma miejsce w toksykologii. Pierwsze metody ilościowego oznaczania alkoholu we krwi pojawiły się na początku dwudziestego stulecia, ale dopiero metoda Erika Widmarka, opublikowana w 1920 roku, upowszechniła się na całym świecie i była stosowana w laboratoriach do końca lat 90. XX w. [75]. Zawarty we krwi alkohol, w warunkach izotermicznych w szczelnie zamkniętej kolbie Widmarka ulega oddestylowaniu do mianowanego roztworu dichromianu potasu w stężonym kwasie siarkowym(VI). Mieszanina chromowa utlenia alkohol do kwasu octowego. Nieprzereagowaną chromiankę miareczkuje się tioglikolem sodu [55]. Obecnie większość toksycznych związków oznaczana jest metodami immunochemicznymi lub przy pomocy chromatografii i spektrometrii mas.

Początkowo objętości krwi lub surowicy jakich używano do wykonania pojedynczego oznaczenia były ogromne. W latach 40. XIX w. na oznaczenie albuminy potrzebowano 180 ml krwi, glukozy 360 ml, kwasu moczowego 65 ml [30]. Na przełomie XIX i XX w. używanie próbki mniejszej niż 1 ml do badań rutynowych w chemii klinicznej było ewenementem. Oznaczenie kwasu moczowego wymagało pobrania 15–25 ml krwi, mocznik oznaczano z próbki o objętości 10 ml, ale satysfakcjonujące wyniki można było uzyskać już z objętości 3 ml [10]. Na oznaczenie jonów sodowych i potasowych zużywano po 5 ml surowicy na każdy [30], oraz w późniejszych latach po 2 ml na oznaczenie jonów wapniowych i magnezowych [33]. Jednak szybko zauważono konieczność stosowania metod, które wykorzystywałyby mniejszą objętość krwi. Wiązało się to też ze stale rozszerzającym panelem dostępnych badań, co powodowało pobieranie większych objętości materiału przy ograniczonej dostępności materiału biologicznego u dzieci i małych zwierząt doświadczalnych. Ponadto konieczność częstego pobierania krwi nawet u dorosłych mogła doprowadzić do anemii. Jednym z prekursorów opracowywania mikrometod był Ivar Christian Bang (1869–1918), który wprowadził do diagnostyki laboratoryj-

nej pierwsze mikrometody oznaczania glukozy, azotu pozabiałkowego, mocznika, oraz separowania albumin i globulin, które wymagały pobrania tylko 0,1–0,2 ml krwi na jedno oznaczenie. Jednak zmniejszenie objętości próbek w rutynowych w oznaczeniach laboratoryjnych do 0,1–1,0 ml krwi na oznaczenie jednego parametru wymagało nie tylko specjalnych technik, ale i aparatów, które wprowadzono powszechnie dopiero w latach 50. XX w. [10].

Przed wprowadzeniem do rutynowych oznaczeń metod kolorymetrycznych bardzo często bazowano na ocenie wizualnej koloru badanej próbki przez porównywanie go z zabarwieniem standardów o znanym stężeniu. Sposoby te były bardzo niedokładne i subiektywne – w dużej mierze zależały od indywidualnych predyspozycji. Na początku XX w. intensywnie rozwijano metody kolorymetryczne, które pozwoliły na obiektywne, powtarzalne, a także szybkie i stosunkowo łatwe oznaczanie coraz większej liczby składników krwi i innych płynów ustrojowych [52]. Pierwszy kolorymetr został opracowany w 1854 r. przez Julesa Duboscq'a. Tego typu instrumenty były produkowane jeszcze w latach dwudziestych XX w. Celem oznaczeń kolorymetrycznych było zrównanie barwy badanego roztworu z barwą roztworu wzorcowego. W kolorymetrze Duboscq'a realizowano to założenie poprzez zmianę grubości warstwy roztworu badanego. Do jednej próbki (cylindra) wlewano roztwór wzorca o znanym stężeniu, do drugiej roztwór badany. W obu próbkach zanurzano szklane walce. Głębsze zanurzenie walca lub podniesienie próbki, zmniejszało grubość warstwy między dnem próbki a końcem walca, a tym samym grubość warstwy roztworu przez jaką przechodziło kierowane od góry na walce światło. Zabarczenie próbek obserwowano na odpowiednio umieszczonym lusterku pod próbkami. Ze znanego stężenia roztworu wzorcowego i stosunku grubości warstw roztworów, można było wyliczyć stężenie nieznanego roztworu. Istniały też kolorymetry klinowe, w których zmiana grubości warstwy cieczy zmieniana była przez wsuwanie klina (kolorymetry Helliga) oraz kolorymetry w których doprowadzano do zrównania barwy roztworów poprzez rozcieńczenie próbki badanej (hemoglobinometr Sahliego). Kolorymetry fotometryczne wprowadzono do użytku w latach trzydziestych XX wieku. W 1939 r. William H. Summerson stworzył urządzenie z podwójnymi fotokomórkami i kuwetami typu „test-tube”, punktem zerowym i skalą absorbancji od 0 do 1.00. Aparat nazwano Klett-Summerson. W 1940 r. został wykorzystany do oznaczeń po raz pierwszy spektrofotometr zbudowany przez Edwina D. Colemana, a rok później Henry „Howard” Cary i Arnold O. Beckman zbudowali spektrofotometr Beckman DU. Model ten znalazł szerokie zastosowanie w badaniach biochemicznych [49]. Aż do czasów obecnych pomiary kolorymetryczne są standardem w analizach chemii klinicznej. Wraz z rozwojem elektrotechniki a następnie komputeryzacją następowały kolejne etapy rozwoju laboratoryjnego instrumentarium – w 1957 roku wprowadzono do użytku pierwszy zautomatyzowany spektrofotometr (Autoanalyzer firmy Technicon), a w 1970 roku Automatic Clinical Analyzer f. Du Pont zapoczątkowując nową erę w diagnostyce laboratoryjnej – wykonywanie oznaczeń w dowolnych konfiguracjach, a nie jak do

tej pory w seriach [76]. Duża wydajność kolejnych generacji automatów spowodowała zanik małych pracowni i rozwój dużych laboratoriów, z reguły daleko od pacjenta. Odpowiedzią na kliniczną potrzebę skrócenia czasu oczekiwania na wynik jest rozwój diagnostyki wykonywanej przy pacjencie przez lekarzy lub pielęgniarki. W ten sposób historia zatacza koło, choć obecnie samodzielnie wykonywana diagnostyka *in vitro* wydaje się być dla lekarzy złem koniecznym.

Ogromny wzrost liczby parametrów wykonywanych w laboratoriach diagnostycznych w ostatnich latach nie wynika z rozwoju metod chemicznych. Raczej jest efektem wprowadzania pod koniec XX wieku do diagnostyki laboratoryjnej metod fizykochemicznych – jak wysokosprawna chromatografia cieczowa, elektroforeza kapilarna, spektrometria masowa, oraz immunochemicznych bazujących na reakcjach antygen przeciwciała. Nowe możliwości diagnostyczne pozwalają na ocenę funkcjonowania organizmu w szerszym kontekście, w ramach tzw. biologii systemowej – proteomiki czy metabolomiki. Karty tej historii dopiero się otwierają.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] P. Stewart, *Clin. Chem.*, 1964, **10**, 268.
- [2] M. Michalik, *Kronika medycyny. Kronika*, Warszawa 1994.
- [3] H. Pankiewicz, *Farm. Pol.*, 1971, **2**, 1005.
- [4] S. Winsten, *Clin. Chem.*, 1969, **15**, 740.
- [5] J. Fruton, S. Simmonds, *Biochemia ogólna*, PZWL Warszawa 1966.
- [6] D. Berger, *MLO Med. Lab. Obs.*, 1999, **7**, 28.
- [7] W. White, *Clin Chem.*, 1991, **37**, 121.
- [8] J. Bolodeoku, D. Donaldson, *J. Clin. Path.*, 1996, **49**, 624.
- [9] E. Dukan, I. Milne, *J. R. Physicians Edinb.*, 2011, **41**, 376.
- [10] L. Rosenfeld, *Four Centuries of Clinical Chemistry*, Taylor & Francis, New York 1999.
- [11] F. Rose. *Annalen der Physik und Chemie*, 1833, doi:10.1002/ andp.18331040512.
- [12] E. Kaiser, *Eur. J. Clin. Chem. Biochem.*, 1994, **32**, 579.
- [13] N. Coley. *Med. His.*, 1986, **30**, 214.
- [14] T. Brzeziński, *Historia medycyny*, PZWL, Warszawa 2000.
- [15] P. Davies, *J. R. S. Med.*, 1993, **86**, 161.
- [16] W. Griffiths, J. Sjövall, *J. Lipid Res.*, 2010, **51**, 23.
- [17] I. MacIntyre, I. Wootton, *Clin. Biochem. Ann. Rev. Biochem.*, 1960, **29**, 635.
- [18] M. Cieszyńska, *Medyk Białostocki*, 2010, **89-92**, 26.
- [19] N. Mani *J. Clin.Chem. Clin. Biochem.*, 1981, **19**, 316.
- [20] M. Aldrich, M. Bledsoe, *J. Biol. Chem.*, 1927, **77**, 519.
- [21] J. Abadie, *LabMedicine*, 2009, **40**, 181.
- [22] B. Urbanek, *Kwartalnik Historii Nauki i Techniki*, 2009, **54**, 102.
- [23] C. McCay, *J. Nutr.*, 1953, **49**, 3.
- [24] L. Hazelwood, *Can't Live Without It. The Story of Hemoglobin in Sickness and in Health*, Nova Science Publishers, Inc., Nowy Jork 2001.
- [25] P. Lowry, N. Ziegler, C. Watson, *Bulletin of the University of Minnesota Hospitals and Minnesota Medical Foundation*, 1952, **24**, 166.
- [26] M. Jaffe, *Zeitschrift für physiologische Chemie*, 1886, **10**, 391.

- [27] P. Ehrlich, Z. Klin. Med. (Journal of Clinical Medicine), 1882–1883, 5, 1.
- [28] C. Watson. Ann. Intern. Med., 1956, 45, 351.
- [29] P. Bosma. J. Hepatol., 2003 38, 107.
- [30] W. Caraway. Clin. Chem., 1973, 19, 380.
- [31] A. Quick. Am. J. Med. Sci., 1933. 185, 630.
- [32] W. Moraczewski, Chemik Polski, 1902, 25, 583.
- [33] B. Charłampowicz-Laszczkowa, *Mikrochemiczne analizy lekarskie krwi i moczu*, Księgarnia Stefana Kamińskiego, Kraków, 1949.
- [34] O. Folin, J. Morris, J. Biol. Chem., 1914, 17, 469.
- [35] L. Rosenfeld, Bull. Hist. Chem., 1999, 24, 42.
- [36] L. Winter, W. Smith. Br. Med. J., 1923, 32, 894.
- [37] M. Tulczyński, *Metody laboratoryjne diagnostyki klinicznej*, PZWL, Warszawa 1962.
- [38] H. Colcher, A. Patek, F. Kendall, J. Clin. Invest. 1946, 25, 768.
- [39] F. Loewy, JAMA, 1931, 96, 459.
- [40] J. Short, A. Gellis, J. Biol. Chem., 1927, 73, 219.
- [41] I. MacIntyre, Biochem. J., 1957, 67, 164.
- [42] S. Meiters, Clin. Chem., 2000, 46, 1011.
- [43] S. Meiters, Clin. Chem., 1985, 31, 777.
- [44] C. Fiske, Y. Subbarow, J. Biol. Chem., 1925, 66, 375.
- [45] E. Conway, R. Cooke, Biochem. J., 1939, 33, 457.
- [46] F. Roughton, J. Kendrew, *Haemoglobin- A symposium based on a Conference held at Cambridge in June 1948 in memory of Sir Joseph Barcroft*, London Butterworths Scientific Publication, New York Interscience Publishers INC, 1949.
- [47] F. Dickens, G. Greville. Biochem. J., 1933, 27, 213
- [48] J. Severinghaus, P. Astrup, J. Murray, Am. J. Resp. Crit. Care Med., 1998, 157, 117
- [49] W. Caraway, J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 1981, 19, 494
- [50] J. Severinghaus, P. Astrup, J. Clin Monitor., 1985; 1, 260
- [51] M. Lisse, O. Jensen, R. Tittsler, J. Bacteriol., 1931 21, 384
- [52] L. Rosenfeld, Clin. Chem., 2000, 48, 193,
- [53] L. Rosenfeld, *Origins of Clinical Chemistry: The Evolution of Protein Analysis*, Academic Press, New York 1982
- [54] F. Kokot, *Metody badań laboratoryjnych stosowanych w klinice*, PZWL Warszawa 1969.
- [55] L. Sherwood, *William Smith Tillett 1892–1974*, National Academy of Sciences, Washington D.C. 1993.
- [56] D. Bobilewicz, Przegl. Med. Lab., 2011, 1, 12.
- [57] N. Rifai, G. Cooper, W. Brown, W. Friedewald, R. Havel, G. Myers, G. Warnick, Clin. Chem., 2004, 50, 1861.
- [58] J. McNamara, G. Warnick, G. Cooper, Clin. Chim Acta, 2006; 369, 160.
- [59] H. Kay, J. Biol. Chem., 1930, 89, 235.
- [60] L. Crandall, I. Cherry, Arch. Neurol. Psych., 1932, 27, 367.
- [61] M. Samogyi, Arch. Intern. Med., 1941, 67, 665.
- [62] A. Gutman, E. Gutman, J. Robinson. Am. J. Cancer, 1940, 38, 103.
- [63] L. Rosenfeld, Clin. Chem., 2000, 46, 1712.
- [64] A. Teixeira, G. Borges, Braz. J. Biomotricity, 2012, 6, 53.
- [65] A. Karmen, F. Wróblewski, J. LaDue, J. Clin. Invest., 1955, 34, 126.
- [66] J. Goldbarg, O. Frideman, E. Pineda, Arch Biochem Biophys., 1960, 91, 61
- [67] A. Lund, Acta Pharmacol. Toxicol., 1949, 5, 121
- [68] J. Parascandola, J. Allergy Clin. Immunol., 2010, 125, 515

- [69] N. Callow, R. Callow, *Biochem. J.*, 1938, **32**, 1759
- [70] A. Holtorff, F. Koch, *J. Biol. Chem.*, 1940, **135**, 377
- [71] T. Maeda, H. Matsuzaki, T. Sekine, *Clin. Chem.*, 1988, **34**, 1392
- [72] C. Harington, *Biochem. J.*, 1926, **20**, 293
- [73] E. Sandell, I. Kolthoff, *Microchim. Acta*, 1937, **1**, 9
- [74] V. Trevorrow, *J. Biol. Chem.*, 1939, **127**, 737
- [75] T. Konopka, *Archiwum Medycyny Sądowo-Kryminologicznej*, 2010, **60**, 164
- [76] M. Bishop, E. Fody, L. Schoeff, *Clinical Chemistry: Principles, Techniques, and Correlations*, Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia 2013.

Praca wpłynęła do Redakcji 14 stycznia 2016

**SPEKTROMETRIA MAS W BADANIACH SKAŻEŃ
MIKROBIOLOGICZNYCH ŚRODOWISKA. CZĘŚĆ II.
KWASY 3-HYDROKSYTŁUSZCZOWE JAKO
BIOMARKERY LIPOPOLISACHARYDÓW
(ENDOTOKSYN) ŚCIAN KOMÓRKOWYCH BAKTERII
GRAMUJEMNYCH**

INVESTIGATION (DETECTION) OF ENVIRONMENT
MICROBIAL CONTAMINATION BY MASS
SPECTROMETRY. PART II.
3-HYDROXY FATTY ACIDS AS A
LIPOPOLYSACCHARIDES (ENDOTOXIN)
BIOMARKERS OF THE GRAM-NEGATIVE BACTERIAL
CELL WALLS

Karol Bal, Zbigniew Mielniczuk

*COBRO - Instytut Badawczy Opakowań
ul. Konstancińska 11, 02-942 Warszawa
e-mail: bal@cobro.org.pl*

Abstract

Wstęp

1. Struktura chemiczna lipopolisacharydu
2. Funkcje biologiczne lipopolisacharydu
3. Metody oznaczania lipopolisacharydów
4. Przykłady zastosowania chromatografii i spektrometrii mas w badaniach lipopolisacharydów
5. Przykładowe widma mas pochodnych kwasów 3-hydroksytłuszczowych
6. Zastosowania praktyczne
 - 6.1. Obliczanie zawartości lipopolisacharydu w próbkach

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane



Karol Piotr Bal, urodzony w 1949 r. (Krosno), ukończył studia chemiczne na Uniwersytecie Warszawskim w 1972 r. Doktorat nauk chemicznych uzyskał w Instytucie Chemii Organicznej Polskiej Akademii Nauk w 1976 r. W latach 1977–1978 odbył staż podoktorski na Wydziale Chemii Uniwersytetu Nowego Brunswicku we Fredericton, Kanada. W latach 2005–2006 przebywał jako „guest scientist” na Wydziale Mikrobiologii Medycznej Uniwersytetu w Lund, Szwecja w zespole Prof. L. Larssona. Adiunkt w IChO PAN w latach 1976–1985. W latach 1986–1998 adiunkt w Instytucie Sportu w Laboratorium

Badań Antydopingowych. W latach 1999–2006 adiunkt w Instytucie Żywności i Żywienia w Warszawie. Obecnie adiunkt w COBRO – Instytut Badawczy Opakowań, Warszawa. Autor ponad 20 oryginalnych artykułów oraz około 30 innych publikacji w czasopismach krajowych i zagranicznych. Członek Polskiego Towarzystwa Chemicznego od 1975 r.



Zbigniew Maksym Mielniczuk, urodzony w 1941 r., zm. 17.06.2013 r. ukończył studia chemiczne na Politechnice Warszawskiej w 1971 r. Doktorat nauk technicznych na Akademii Rolniczej w Poznaniu 1976 r. W latach 1977–1978 odbył staż podoktorski na Wydziale Chemii Uniwersytetu Dalhousie, Halifax, Kanada. W latach 1992–1994 przebywał jako „guest scientist” na Wydziale Mikrobiologii Medycznej Uniwersytetu w Lund, Szwecja w zespole Prof. L. Larssona. Doktor habilitowany nauk biologicznych – Uniwersytet Łódzki 1997 r. Sekretarz Naukowy oraz Prof. nzw. w COBRO - Instytut Badawczy

Opakowań. Autor ponad 40 oryginalnych artykułów oraz około 80 innych publikacji w czasopismach krajowych i zagranicznych

ABSTRACT

Microorganisms synthesize several monomeric chemical structures that are not found elsewhere in nature, e.g. muramic acid (an amino sugar) and D-amino acids (D-alanine and D-glutamic acid) are ubiquitous in bacterial peptidoglycan (PG). Characteristic sugars (e.g. heptoses) and 3-hydroxylated fatty acids are found in the endotoxin (lipopolysaccharide, LPS) of gram-negative bacteria [1].

The best way to protect against environment contamination is microbial control. Methods in current use for monitoring microorganisms mainly include culture and direct microscopy. However, several factors, including samples collection, growth conditions, incubation temperature and interaction between different organisms all affected the culture results.

Additionally, culture based methods can detect only viable organisms and they are also time consuming, sometimes taking days or weeks.

However, since both living and dead microorganisms express irritating and toxic structures, they should all be taken into consideration.

Muramic acid has been suggested for use as a chemical marker in gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) determination of bacterial peptidoglycan [2]. While 3-hydroxylated fatty acids are the best proposition for use as a chemical markers in gas chromatography-mass spectrometry determination of bacterial lipopolysaccharide (endotoxin) of gram-negative bacteria in both clinical and environmental samples [38]. Two derivatives have been applied, including the trimethylsilyl (TMS) and pentafluorobenzoyl (PFBO) derivatives [80].

Both derivatives (TMS and PFBO) have been proven suitable for use with GC-ion-trap tandem MS [3].

The aim of our proposition is trial of application of gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) method as an alternative or complement to culturing, microscopy and other assays for detection, characterization and monitoring of microbial contamination of environment (e.g. water, air, air-conditioning systems), contamination of biochemical and food production chain processes, packaging for foodstuffs etc. by analysis of bacterial 3-hydroxylated fatty acids as a biochemical markers.

A method is described for the quantitation of methyl esters of 3-hydroxyacids, markers of bacterial lipopolysaccharide (endotoxin), as trimethylsilyl or pentafluorobenzoyl derivatives using GC/MS method.

The described methods are quick and simple, can be applied for monitoring microbial contamination directly, without prior culturing, in complex environmental samples.

This method can be also applied for testing processes of cleaning and disinfections on packaging materials or on both packaging materials/foodstuffs in order to decrease their microbial load and thus to ensure better shelf-life.

- [1] Z. Mielniczuk, K. Bał, Spektrometria mas w badaniach skażeń mikrobiologicznych środowiska. Część I. Kwas muraminowy jako biomarker ścian komórkowych bakterii, *Wiad. Chem.*, 2012, **66**, 445.
- [2] K. Bał, L. Larsson, E. Mielniczuk, Z. Mielniczuk, Structure of muramic acid TMS derivative mass spectrum's base ion ($m/z=185$) used for quantification of bacterial peptidoglycan, *J. Microbiol. Meth.*, 2002, **48**, 267.
- [3] A. Saraf, L. Larsson, Identification of microorganisms by mass spectrometry, *Advances in Mass Spectrometry*, 1998, **14**, 449.
- [38] Z. Mielniczuk, E. Mielniczuk, L. Larsson, Gas chromatography-mass spectrometry methods for analysis of 2- and 3-hydroxylated fatty acids: Application for endotoxin measurement, *J. Microbiol. Meth.*, 1993, **17**, 91.
- [80] Z. Mielniczuk, S. Alugupalli, E. Mielniczuk, L. Larsson, Gas chromatography-mass spectrometry of lipopolysaccharide 3-hydroxy fatty acids: comparison of pentafluorobenzoyl and trimethylsilyl methyl ester derivatives, *J. Chromatogr.*, 1992, **623**, 115.

Keywords: LPS, lipopolysaccharide, gas chromatography-mass spectrometry

Słowa kluczowe: LPS, lipopolisacharyd, chromatografia gazowa, spektrometria mas

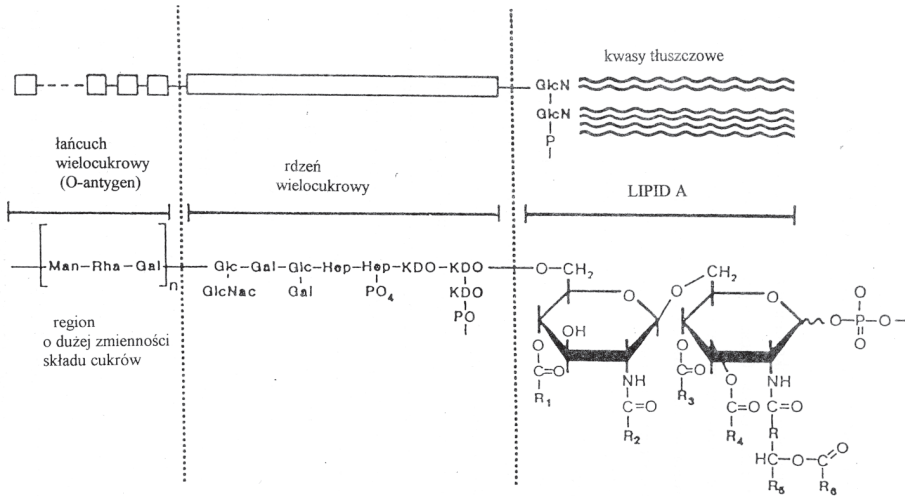
WSTĘP

Kontrolę skażeń mikrobiologicznych szeroko rozumianego środowiska naturalnego można prowadzić metodami klasycznymi, takimi jak np. immunologicznymi [radioimmunologicznymi (RIA), immunofluorescencyjnymi (IF), immunoenzymatycznymi (ELISA)] lub genetycznymi polegającymi na identyfikacji ściśle dobranego fragmentu materiału genetycznego z użyciem techniki „Polymerase Chain Reaction” (PCR), jak również poprzez hodowlę drobnoustrojów na pożywkach połączonych z badaniami mikroskopowymi. Metody oparte na hodowli są pracochłonne i do uzyskania wyniku wymagają co najmniej kilku dni, a nawet kilku tygodni. Ponadto pozwalają wykryć tylko żywe organizmy, a jak wiadomo zarówno żywe jak martwe mikroorganizmy posiadają toksyczne struktury i dlatego obie formy powinny być brane pod uwagę podczas monitorowania skażeń mikrobiologicznych. Alternatywą do w/w metod może być zastosowanie chromatografii gazowej i spektrometrii mas (GC/MS) do monitorowania unikalnych markerów chemicznych bakterii, a tym samym do wykrywania skażeń mikrobiologicznych w otoczeniu (np. w powietrzu, wodzie, kurzu) [1–3].

Wszystkie bakterie mają stosunkowo prostą budowę i są osłonięte błoną komórkową. Komórki bakterii (z wyjątkiem *Mycoplasmatales* i *Archaeobacterie*) otoczone są leżącą na zewnątrz błoną, ścianą komórkową tworzącą szkielet zewnętrzny decydujący m.in. o kształcie komórki. Jednym z ważniejszych składników ścian komórkowych bakterii gram-ujemnych jest zewnętrzna osłona zbudowana z białek oraz lipopolisacharydu [4, 5]. Lipopolisacharyd (LPS), którego brakuje u bakterii gram-dodatnich, jest endotoksyną stanowiącą amfifilowy integralny składnik zewnętrznej błony komórkowej osłony bakterii gram-ujemnych, gdzie tworzy on złożone struktury z białkami i fosfolipidami.

Ze względu na ważną rolę jaką ściana komórkowa odgrywa w funkcjach życiowych bakterii oraz że właśnie ona zawiera wiele unikalnych związków chemicznych, poniżej, w dużym uproszczeniu opisana została budowa chemiczna lipopolisacharydu, składnika ściany komórkowej bakterii gram-ujemnych.

1. STRUKTURA CHEMICZNA LIPOPOLISACHARYDU



Rysunek 1. Schemat struktury lipopolisacharydu bakterii gram-ujemnych [6], po modyfikacjach
 Figure 1. Schematic structure of the lipopolysaccharide of gram-negative bacteria, [6] after modifications

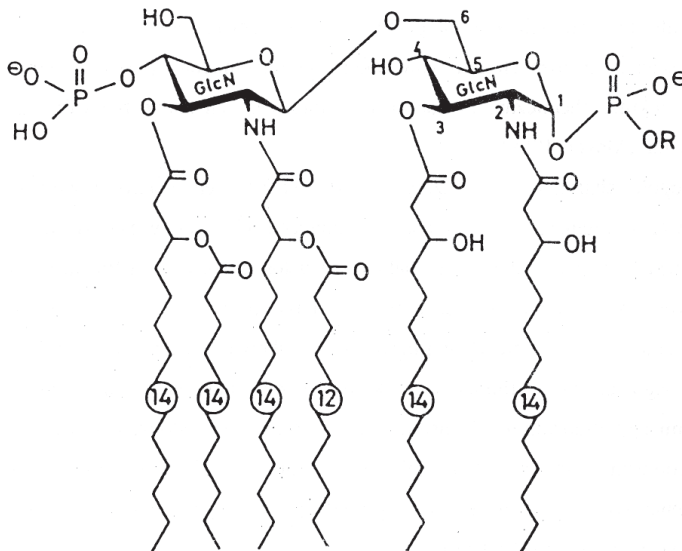
Duża, kompleksowa makrostruktura LPS, przedstawiona schematycznie na Rysunku 1 składa się z trzech części: pierwszej, zewnętrznej, zbudowanej z wielocukrów, odpowiedzialnej za swoistość antygenową (tzw. łańcuch O-swoisty); jest to najbardziej wyeksponowana na zewnątrz część LPS [7], charakteryzująca się znaczną zmiennością. Fragment ten zbudowany jest z powtarzających się od 20 do 40 jednostek, z których każda składa się z jednej do siedmiu cząsteczek cukrów.

Drugą część stanowi oligosacharydowy rdzeń LPS, który zawiera dwa rzadko spotykane cukry: kwas 2-keto-3-deoksyoktanowy (KDO), występujący we wszystkich lipopolisacharydach, (jest on ogniwem łączącym wielocukier z lipidem A), oraz siedmio węglowy cukier, heptozę.

KDO jest związkiem bardzo rzadko występującym w przyrodzie i poza lipopolisacharydami można go znaleźć w nielicznych roślinach i glonach. Wiązanie KDO z lipidem A jest bardzo słabe i może ulegać hydrolizie kwaśnej w bardzo umiarkowanych warunkach [8].

Trzecią częścią LPS jest właśnie lipid A. Jest to najmniej zmienna część LPS, odpowiedzialna za jego toksyczne oddziaływanie. Lipid A zawiera rdzeń cukrowy złożony z dwóch reszt cząsteczek *N*-acetylo-*D*-glukozyaminy (GlcNac) połączonych ze sobą wiązaniem beta-1,6 [9]. Do tego kompleksu, przyłączone są dwie grupy fosforylowe [10] i cztery kwasy tłuszczowe (Rys. 2). Są to kwasy nie zawierające grupy hydroksylowej, 3-hydroksy- oraz bardzo rzadko kwasy 2-hydroksytłuszczowe, o długości łańcucha od 10 do 20 atomów węgla, połączonych z GlcNac wiązaniem estrowym lub amidowym [11]. Skład kwasów tłuszczowych LPS jest charak-

terystyczny dla pałeczek gram-ujemnych, i może być użyty jako chemiczny marker przydatny do ich wykrywania, a nawet identyfikacji [12, 13]. Chemiczną strukturę lipidu A *E. coli* przedstawiono na Rysunku 2.



Rysunek 2. Struktura chemiczna lipidu A *E. coli* [5], po modyfikacjach
Figure 2. Chemical structure of the lipid A of *E. coli*, [5], after modifications

2. FUNKCJE BIOLOGICZNE LIPOPOLISACHARYDU

Zewnętrzna warstwa osłony komórkowej bakterii gram-ujemnych stanowi doskonałą, nieprzepuszczalną barierę dla wielu substancji [14, 15]. W roku 1952 Westphal i Lüderitz i in. [16] wyizolowali składnik toksyczny z pałeczek *Salmonella*, *Serratia* i *Vibro*. Autorzy stwierdzili, że zawiera on zawsze wielocukier oraz lipid (stąd: lipopolisacharyd, LPS), powiązane z grupą fosforanową, która bardzo zmienia reaktywność obu składników. Lipopolisacharyd będący najbardziej wysuniętą częścią składową zewnętrznej warstwy osłony komórkowej bierze udział w wielu czynnościach życiowych bakterii. M.in. pełni zasadniczą rolę w zachowaniu kształtu bakterii i ich ochronie przed czynnikami zewnętrznymi. Lipopolisacharydy różnych gatunków bakterii gram-ujemnych posiadają bardzo podobną strukturę chemiczną. Przedmiotem najliczniejszych badań był LPS z pałeczek *Salmonella* [9].

Lipopolisacharyd – z biologicznego punktu widzenia endotoksyna – spełnia, jak wspomniano wyżej, wiele bardzo ważnych funkcji życiowych bakterii gram-ujemnych. Część wielocukrowa, a zwłaszcza łańcuch O-specyficzny nadaje bakterii swoistość antygenową. LPS warunkuje też właściwości pasożytnicze i chorobotwórcze bakterii, wpływa na wrażliwość komórek na działanie antybiotyków i licznych czynników chemicznych. Jego obecność tłumaczy większość różnic pomiędzy bak-

teriami gram-ujemnymi i gram-dodatnimi. Najistotniejszą właściwością endotoksyny jest zdolność do wywoływania zarówno u ludzi jak i u zwierząt gorączki oraz objawów wstrząsu (zaburzenia krążenia powodujące nieprawidłowe funkcjonowanie wielu narządów prowadzące do śmierci) [17].

Endotoksyny w mniejszych ilościach, oddziałują korzystnie na organizm przez stymulację jego ogólnej odporności na zakażenia bakteryjne, wirusowe, a także wykazują działanie nekrotyzujące w stosunku do tkanek nowotworowych. Zdaniem wielu badaczy, kontakt z endotoksynami ma istotne znaczenie dla prawidłowego rozwoju i funkcjonowania układu odpornościowego.

Podanie osobie zdrowej, LPS np. w ilości 4 ng/kg masy ciała powoduje wytwarzanie i uwalnianie mediatorów stanu zapalnego jako czynnika nekrozy nowotworów (TNF- α), cytokin (w tym interleukiny 1, 6 i 8), rodników tlenowych (tlen atomowy, nadtlenek wodoru, tlenek azotu) oraz lipidów, jak prostaglandyna E2 i tromboksan A2 [18, 19]. Pobudzone przez LPS makrofagi wytwarzają mediatory stanu zapalnego w umiarkowanej ilości, które stymulują korzystne reakcje organizmu, jak stany podgorączkowe, pobudzenie układu odpornościowego, czy też niszczenie drobnoustrojów. W ciężkich zakażeniach, endotoksyny są gromadzone w dużych ilościach we krwi, co stymuluje uwalnianie przez makrofagi mediatorów w obrębie całego ustroju. Efektem tego działania są reakcje niepożądane, takie jak wysoka gorączka, znaczne obniżenie ciśnienia krwi, wewnętrzznaczyniowe wykrzepianie krwi, wstrząs zagrażający życiu. Obserwacje te zostały potwierdzone po zsyntetyzowaniu lipidu A i przebadaniu jego aktywności biologicznej [20, 21].

Przebywanie w środowisku o wysokim stężeniu endotoksyn, (np. w pomieszczeniach o niedostatecznej lub wadliwej wentylacji jak w szkołach, szpitalach, biurach, rzeźniach, farmach hodowlanych, fabrykach tekstylnych, przy skażeniu bakteriami wody używanej do klimatyzacji), może być przyczyną wielu schorzeń górnych dróg oddechowych, np. alergii, czy przewlekłych nieżytów oskrzeli [22, 23]. Uważa się, że stężenie LPS w powietrzu (kurzu) w ilości 0,1–0,2 mg/m³ jest stężeniem krytycznym wywołującym w/w objawy [24].

Instytucje oraz firmy np. farmaceutyczne, zajmujące się hodowlą tkankową, inżynierią genetyczną, czy też produkcją leków, przyjmują dopuszczalne stężenie endotoksyn w produkcie końcowym na poziomie 0,025 ng/ml (25 pg/ml). Kurz obecny praktycznie wszędzie w normalnym środowisku, jest złożoną mieszaniną związków organicznych i nieorganicznych, przy czym jego skład zależy od środowiska. Endotoksyny pochodzące z bakterii gram-ujemnych obecnych w kurzu, wydają się być głównymi składnikami odpowiedzialnymi za zaburzenia układu oddechowego [25, 26].

3. METODY OZNACZANIA LIPOPOLISACHARYDÓW

W wielu krajach oficjalnie uznaną metodą stwierdzania obecności lipopolisacharydu jest test pirogeny z wykorzystaniem królików. Jest on jednak mało dokładny i kosztowny [27].

Stężenie lipopolisacharydów w środowisku jest oznaczane głównie testem „LAL” (*Limulus ameocyte lysate test*). LAL jest wodnym wyciągiem z komórek krwi (*amebocytes*) kraba morskiego, „*Limulus polyphemus*” [28].

Lipopolisacharyd aktywuje kaskadową reakcję krzepnięcia LAL, prowadząc do utworzenia żelu. Stopień żelowania LAL pozostaje w ścisłym związku z ilością LPS w badanej próbce [29]. Spektrofotometryczny pomiar pozwala na określenie zawartości LPS o stężeniu powyżej 1 pg/ml [30].

Połączona metoda LAL z testem immunoenzymatycznym (ang. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, ELISA) obniża próg wykrywania LPS do stężenia poniżej 1 pg/ml [31]. Metoda LAL znalazła m.in. zastosowanie kliniczne do szybkiej diagnostyki zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych [32].

Wiadomo jednak, że wiele innych substancji niż LPS, m.in. peptydoglikan, dekstrany, niektóre białka oraz polinukleotydy, aktywują reakcję LAL, natomiast inne: typu elektrolitów, hormonów, czy antybiotyków, mogą ją hamować [33].

W roku 1978, Iwanaga i in. [34], wprowadzili, a w 1983 r. Harris i in. [35] ulepszyli kolorymetryczną metodę ilościowego oznaczania endotoksyn używając syntetycznego peptydu (S-2423) jako substratu dodawanego do badanej próbki inkubowanej uprzednio z LAL. W trakcie zachodzącej reakcji, z substratu wydziela się zabarwiona na żółto p-nitroanilina, której absorbancja mierzona przy 405 nm jest proporcjonalna do zawartości endotoksyn.

Te klasyczne techniki biochemiczne są często niedostatecznie selektywne, pracochłonne i ilościowo nieprecyzyjne. Porównanie oznaczania lipopolisacharydów w kurzu znajdującym się w pomieszczeniach produkcyjnych zakładów drobiarskich metodą chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (GC/MC) i metodą LAL [36], wykazały niewielką korelację pomiędzy zastosowanymi metodami. Wyższe wartości stężeń uzyskiwano przy stosowaniu metody GC/MS. Ciągłe udoskonalanie testu LAL pozwala jednak uzyskiwać lepsze korelacje z GC-MS [37]. Poniżej porównano niektóre cechy testu *Limulus* z metodą GC/MS:

	Limulus	GC/MS
czułość	wysoka (pg/ml)	umiarkowana (ng/w próbce)
swoistość	umiarkowana	wysoka
pomiar	„wolny” LPS	całkowita ilość LPS

Chromatografia gazowa (GC), sprzężona najczęściej ze spektrometrią mas (MS) jest szczególnie użyteczną metodą do wykrywania i oznaczania ilościowego markerów chemicznych bakterii [1], w tym kwasów 3-hydroksy tłuszczowych charakterystycznych markerów lipopolisacharydów (endotoksyn) składników ścian

komórkowych bakterii gram-ujemnych. Wysoka czułość i specyficzność tego układu analitycznego umożliwia oznaczenie markerów bezpośrednio w próbkach klinicznych i środowiskowych, bez uprzedniej, często długiej hodowli. Pozwala wykrywać zanieczyszczenia bakteriami w tak skomplikowanych próbkach jak np. kurz z powietrza [38, 39], w próbkach materiałów klinicznych [40], czy też glebie [41].

Przygotowanie próbki do badań jest proste i nie wymaga często pracochłonnej i długotrwałej hodowli bakterii. Składa się ono z kilku następujących etapów:

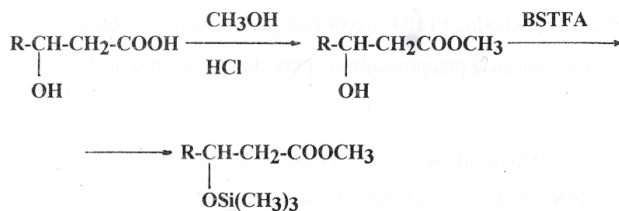
1. wydzielenie pojedynczych markerów chemicznych ze złożonej matrycy materiału wyjściowego, poprzez hydrolizę metanolem w roztworze HCl i ekstrakcję wytworzonych estrów metylowych kwasów tłuszczowych heksanem [42].
2. przeprowadzenie estrów metylowych w pochodne trimetylosililowe umożliwiające wykonanie analizy metodą GC-MS. Etap ten prowadzi do obniżenia polarności związków, zwiększa ich stabilność oraz wykrywalność.

Najczęściej stosowaną metodą jonizacji próbek jest metoda „electron impact” (EI) z zastosowaniem kwadropolowego detektora. Stosuje się również pochodne pentafluorobenzoilowe (PFBO). Do ich detekcji wymagana jest ujemna jonizacja chemiczna (CI) z zastosowaniem metanu, izobutanu lub amoniaku jako gazu jonizującego.

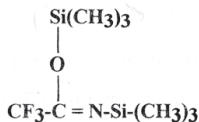
Detekcję związków można prowadzić metodą SIM (monitorowanie pojedynczych jonów) lub metodą SCAN (TIC, pomiar całkowitego prądu jonowego). Do obliczeń ilościowych najczęściej stosuje się kwas 3-OH tridekanowy (3-OH C13:0) nie występujący w strukturach bakterii.

Reakcje tworzenia pochodnych kwasów 3-hydroksytłuszczowych przebiegają według następujących schematów:

1. pochodne trimetylosililowe estrów metylowych (Me/TMS):

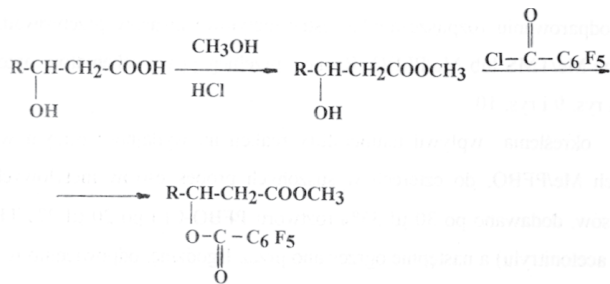


BSTFA = N,O-bis(trimetylosililo)trifluoroacetamid



R = rodnik alkilowy

2. pochodne pentafluorobenzoilowe estrów metylowych (Me/PFBO):



R = rodnik alkilowy

4. PRZYKŁADY ZASTOSOWANIA CHROMATOGRAFII I SPEKTROMETRII MAS W BADANIACH LIPOPOLISACHARYDÓW

Metodą GC/MS, jak wspomniano wyżej, możliwe jest wykrywanie i oznaczenie ilościowe, markerów chemicznych ścian komórkowych bakterii gram-ujemnych jakimi są kwasy 3-hydroksytłuszczowe. Związki te były wykrywane we wszystkich lipopolisacharydach. Już we wczesnych latach sześćdziesiątych uważano, że chromatografia gazowa może być zastosowana do charakteryzowania bakterii gram-ujemnych, poprzez analizę kwasów tłuszczowych, będących składnikami ich komórek [43].

Od tego czasu opublikowano wiele prac dotyczących klasyfikacji i identyfikacji bakterii na podstawie składu kwasów tłuszczowych [44, 45]. Kwasy te oznaczano również metodą chromatografii cieczowej [46] oraz gazowej połączonej ze spektrometrią mas (GC/MS) [47–49].

Oznaczanie tych kwasów prowadzi bezpośrednio do określenia stężenia LPS w badanym materiale [50, 51]. Z dokładniejszych badań wynika, że w czystych hodowlach są to głównie kwasy (*R*) 3-hydroksytłuszczowe [52], połączone w lipidzie A z glukozaminą zarówno wiązaniem estrowym jak i amidowym. Kwasy tego typu są związkami nie spotykanymi w naturze. Bliższe określenie jakościowe i ilościowe składu kwasów tłuszczowych pozwala na ocenę nie tylko ilości LPS, ale również rodzaju lub gatunku bakterii [53]. Skład kwasów tłuszczowych lipopolisacharydów niektórych bakterii gram-ujemnych podaje Wilkinson [54].

Ocena profilu kwasów organicznych wydzielanych z komórek bakteryjnych jest szczególnie istotna w przypadku konieczności szybkiej identyfikacji i klasyfikacji np. wolno rosnących bakterii lub pałeczek niefermentacyjnych [55–58].

Niewielkie ilości kwasów 3-hydroksytłuszczowych były wykrywane we frakcjach fosfolipidów ścian komórkowych *Mycobacterium* [59].

Ogólnie, w/w kwasy tłuszczowe zawarte w LPS stanowią od 15 do 22% całkowitej ilości kwasów tłuszczowych komórki bakteryjnej [60].

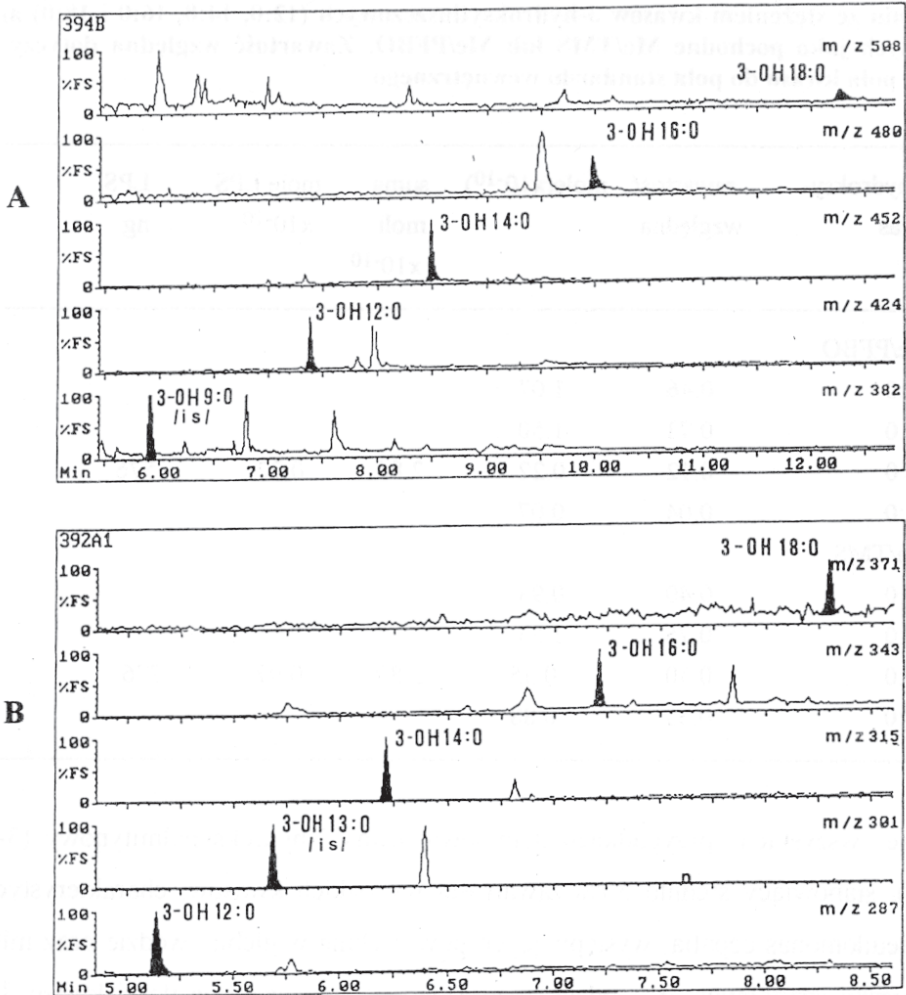
Należy nadmienić, iż w naturze rozpowszechnione są również kwasy 2-hydroksytyłuszczowe, ale najczęściej pochodzenia niebakteryjnego. Występują one np. w grzybach i jarzynach [61, 62].

W strukturze LPS występują 3-hydroksykwasy tłuszczowe zawierające najczęściej od 10 do 18 atomów węgla. Kwasy te mogą być użyte jako chemiczne markery endotoksyn w środowisku naturalnym [63]. Zawartość endotoksyn była badana w próbkach powietrza i kurzu pobranego z kabin samolotów pasażerskich w czasie rejsu. Stwierdzono iż stężenie endotoksyn w tych przypadkach było wyższe niż w próbkach pobranych z pomieszczeń mieszkalnych i biur. Były to kwasy o długości łańcucha od C10:0 do C18:0. Oznaczenia prowadzono metodą chromatografii gazowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas typu pułapki jonowej oraz testem LAL [64].

Larsson i in. [65, 66] badali metodą spektrometrii mas stężenie endotoksyn w powietrzu pomieszczeń dla palaczy i niepalących. Stężenie endotoksyn w pokoju dla palaczy było 120 razy większe aniżeli w pomieszczeniu dla niepalących. Autorzy stwierdzają, że tego rodzaju badania mogą przyczynić się do wyjaśnienia genezy chorób górnych dróg oddechowych u palaczy.

Park i in. [67] metodą GC/MS badali stężenia endotoksyn w pomieszczeniach wolnostojących domów (sypialnia, kuchnia, bawialnia, duży pokój) w których przebywały dzieci chore na astmę oraz alergie. Autorzy stwierdzili różnice zarówno w stężeniu jak i długości łańcucha kwasów 3-hydroksytyłuszczowych w zależności od pomieszczenia. Kurz w kuchni zawierał najwyższą koncentrację kwasu 3-OH C:10 i wykazywał najwyższą aktywność endotoksyn (mierzoną testem LAL). Kurz w sypialni charakteryzował się dużą zawartością długołańcuchowych 3-OH kwasów i niską specyficzną aktywnością endotoksyn.

Pomorska i in. [68] stosując metodę chromatografii gazowej sprzężoną z tandemową spektrometrią mas typu pułapki jonowej (GC/MS/MS) zbadali powietrze (kurz organiczny) z 22 pomieszczeń dla zwierząt (owiec, świń, koni, krów, drobiu jak również stodoł) na obecność endotoksyn. Największe ich stężenie („*airborne endotoxin*”, LPS) stwierdzono w pomieszczeniach dla owiec, najmniejsze w stodołach. Zostało to potwierdzone testem LAL. We wszystkich jednak przypadkach przekroczony został podawany przez różnych autorów limit stężenia endotoksyn wynoszący 0,1 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ co może stwarzać zagrożenie dla układu oddechowego zarówno ludzi jak i zwierząt.

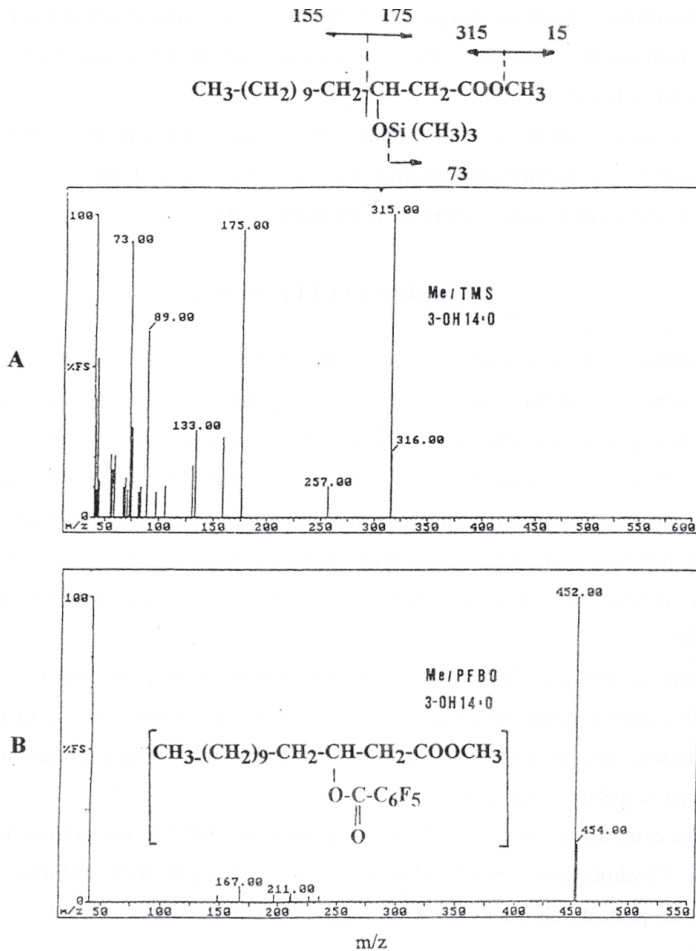


Rysunek 3. Chromatogramy jonowe próbki klinicznej zanieczyszczonej bakteriami otrzymane przez analizę GC/MS pochodnych Me/PFBO (A) lub Me/TMS (B) estrów metyloowych kwasów 3-hydroksy [80]
 Figure 3. Ion chromatograms of pharmacological samples contaminated with bacteria obtained by GC/MS analysis of Me/PFBO (A) or Me/TMS (B) derivatives of methyl esters of 3-hydroxyacids[80]

Na Rysunku 3 przedstawiono chromatogramy jonowe (SIM) pochodnych Me/PFBO, (A) oraz pochodnych trimetylosililowych (TMS) estrów metyloowych Me/TMS, (B) kwasów 3-hydroksy tłuszczowych próbki klinicznej zanieczyszczonej bakteriami.

Do rozdzielu kwasów najczęściej stosowanymi kolumnami są kwarcowe kolumny kapilarne o długości 15–30 m i średnicy wewnętrznej 0,25 mm, ze związaną fazą stacjonarną o grubości filmu 0,25 μm (np. CP-Sil 5 CB-MS, SE-54, OV-1).

5. PRZYKŁADOWE WIDMA MAS POCHODNYCH KWASÓW 3-HYDROKSYTŁUSZCZOWYCH



Rysunek 4. Widmo mas kwasu 3-hydroksymirystynowego – głównego składnika LPS *E. coli* – jako pochodnej Me/TMS (A) lub Me/PFBO (B) [80]

Figure 4. Mass spectrum of 3-hydroxy myristic acid – the main component of LPS of *E. coli* – a derivative of Me/TMS (A) or Me/PFBO (B) [80]

Rysunek 4 przedstawia widma mas kwasu 3-hydroksymirystynowego – głównego składnika LPS *E. coli* – jako pochodnej Me/TMS (A) lub Me/PFBO (B). Przykładowo zaznaczono również fragmentację związku.

Widma mas pochodnych Me/TMS kwasów 3-hydroksytłuszczowych charakteryzują się dwoma bardzo silnymi jonami: jeden o stosunku m/z równym M-15, związany z utratą grupy metylowej (np. dla kwasu 3-OH 14:0 jest to jon 315), i drugi o wartości m/z równym 175, (występujący we wszystkich kwasach 3- hydroksytłuszcz-

czowych) związany z rozerwaniem wiązania między czwartym a piątym węglem w cząsteczce. Jon $m/z = 73$ występuje we wszystkich pochodnych TMS (nie tylko w kwasach) i jest związany z grupą $-(CH_3)_3Si$. W zakresie wyższych mas występuje jon $m/z 257$ (M-73), związany utratą grupy $-(CH_3)_3Si$.

Dla pochodnej Me/PFBO kwasu 3-OH C14:0 w widmie mas występuje intensywny jon $m/z = 452$.

6. ZASTOSOWANIA PRAKTYCZNE

6.1. OBLICZANIE ZAWAROŚCI LIPOPOLISACHARYDU W PRÓBKACH (DLA POCHODNYCH ME/TMS)

Łatwo można oznaczyć lipopolisacharydy zawarte w materiale wyjściowym w stężeniu kilku nanogramów. Dotyczy to obu rodzajów pochodnych: Me/TMS oraz Me/PFBO.

Krzywe kalibracyjne dla oznaczania LPS *E.coli* w zakresie stężeń do 600 ng (stosując jako marker *E. coli* kwas 3-OH 14:0 i standard wewnętrzny kwas 3-OH 13:0) charakteryzują się równaniami:

$$\text{dla pochodnych Me/TMS: } y = (4,7x - 54,4)10^{-3}$$

$$\text{dla pochodnych Me/PFBO: } y = (3,9x - 50,6)10^{-3}$$

gdzie:

x = zawartość LPS w próbce,

y = stosunek pola jonu oznaczanego kwasu do pola jonu wzorca wewnętrznego
Współczynnik korelacji w obu przypadkach wynosił 0,9937.

Minimum detekcji wynosiło odpowiednio 3 pg dla pochodnych Me/TMS oraz 1 pg dla Me/PFBO, przy stosunku sygnału do szumu wynoszącym 4. Wartości te otrzymano w rutynowych warunkach analitycznych, przy monitorowaniu jonów metodą SIM.

Przy obliczaniu zawartości endotoksyn w środowisku, przyjęto założenie, że 1 mol lipidu A zawiera 4 mole 3-hydroksykwasów [20] oraz że średni ciężar cząsteczkowy LPS wynosi 8000 [69, 70].

Kolejność obliczeń:

1. obliczenie ilości moli 3-hydroksylovanego kwasu (3-OHK) w próbce:
według wzoru:

$$3\text{-OHK} = \frac{\text{pole jonu } m/z 175 \text{ danego kwasu} \times 50 \times 10^{(-9)}}{\frac{\text{pole jonu } m/z 175 \text{ standardu wewnętrznego}}{\text{ciężar cząsteczkowy kwasu}}}$$

gdzie: pola jonów $m/z 175$ mierzone przez GC/MS,

$50 \times 10^{(-9)}$ ilość wzorca (IS) dodanego do próbki – 50 ng kwasu 3-OH 13:0

Ciężar cząsteczkowy kwasów 3-hydroksylowych (mole):

kwas:	10:0	12:0	13:0	14:0	16:0	18:0
mole:	188	216	244	272	300	328

2. obliczenie sumy moli wszystkich kwasów w próbce (S3-OHK)

3. obliczenie ilości moli LPS (IMLPS)

$$\text{IMLPS} = \text{S3-OHK}/4$$

gdzie: 4 jest (umowną) ilością cząsteczek kwasów w cząsteczce LPS

4. obliczenie ilości ng LPS w próbce

$$\text{LPS}(\text{ng}) = \text{IMLPS} \times 8000$$

Przykład obliczeń:

Stężenie lipopolisacharydów oznaczano w próbce zebranej na filtrze Millipore 0,45 mm zasysając przez 2 godziny kurz (ok. 3 mg) z powietrza w laboratorium, próżniową pompką wodną. Wykryto następujące kwasy 3-hydrokstłuszczowe:

C12:0 C14:0 C16:0 C18:0

poła kwasów w jednostkach umownych wynosiły odpowiednio:

166 305 405 113

pole standardu wewnętrznego (kwas 3-OH C13:0) : 294

ilość moli poszczególnych kwasów (3-OHK):

0,13 0,19 0,23 0,06

suma moli wszystkich kwasów (S3-OHK) : 0.61

ilość moli LPS (IMLPS): 0,15

obliczona zawartość LPS w próbce: 1200 ng

Chromatogramy jonowe otrzymano z liofilizowanej próbki klinicznej, po przeprowadzeniu hydroksykwasów do pochodnych Me/TMS i Me/PFBO. Próbka zawierała kwasy: 3-OH 12:0, 3-OH 14:0, 3-OH 16:0 i 3-OH 18:0, zidentyfikowane metodą GC/MS w układzie SCN. Obliczona ilość LPS w próbce wynosiła, 576 ng, dla pochodnych Me/PFBO i 776 ng dla pochodnych Me/TMS.

Podobne postępowanie analityczne zastosowano w przypadku analizy próbek kurzu pobranych z odkurzacza z pomieszczeń mieszkalnych, komputera oraz wody pitnej w Lund, Szwecja [38].

Najwyższą zawartość LPS stwierdzono w kurzu zebrany z komputera (ok. 350 ng/mg kurzu) oraz z pokoju rekreacyjnego (ok. 170 ng/mg). Zawartość LPS w wodzie pitnej była bardzo niska (ok. 25 ng/100 ml).

We wszystkich przypadkach dominował kwas 3-hydroksypalmitynowy (3-OH 16:0), stanowiący średnio 50% zawartości wszystkich kwasów, charakterystyczny dla *Pseudomonas cepacia*, występujących powszechnie w glebie, wodzie oraz mikro środowisku szpitalnym. W wodzie stwierdzono ponadto znaczne ilości kwasu 3-hydroksymirystynowego (3-OH 14:0), charakterystycznego np. dla pałeczek *Salmonella*.

Zawartość procentowa LPS oznaczona w 1 mg suchej masy bakterii *H. pylori*, *P. mirabilis* i *E. coli*. wynosiła odpowiednio: 0,20, 0,82, 0,43% (1972, 8213 i 4291 ng/mg) przy stosunku jak 1,0: 4,1: 2,2. Najwięcej LPS posiada więc *P. mirabilis*.

W przypadku lipidu A *H. pylori* (NCTC 11637) dominującym kwasem jest 3-hydroksystearynowy (3-OH 18:0), przy czym udziały procentowe kwasów 3-OH wynosiły odpowiednio: dla 3-OH 14:0, (0,9%), 3-OH 16:0, (31,6%) oraz 3-OH 18:0, (67,5%). Należy nadmienić, że stężenie LPS w *H. pylori* jest zależne od szczepu bakterii, natomiast udziały procentowe poszczególnych kwasów ulegają jedynie bardzo małym wahaniom (własne nie publikowane dane [71]).

Dla *E. coli* i *P. mirabilis*, dominującym jest kwas 3-hydroksymirystynowy (3-OH 14:0) stanowiący ponad 99% kwasów 3-hydroksytłuszczowych.

PODSUMOWANIE

Wiele symptomów chorobowych (np. alergie, astma i inne) może być wywołanych wdychaniem mikroorganizmów obecnych w środowisku. Próby powiązania niektórych objawów klinicznych, z zawartością LPS w kurzu wdychanym z powietrzem jest zjawiskiem opisanym w literaturze [72–74]. Symptomy te związane są z określonymi bakteriami zawierającymi struktury chemiczne warunkujące ich aktywność biologiczną. Są one często bardzo skomplikowane, unikalne, nie występujące nigdzie indziej w naturze, złożone z połączonych ze sobą monomerycznych składników zwanych markerami chemicznymi.

Chromatografia gazowa połączona ze spektrometrią mas (GC/MS) pozwala na wykrywanie i identyfikację tych markerów, co często umożliwia określenie składu mikrobiologicznego analizowanej próbki [75].

Lipopolisacharyd (LPS), jest przykładem złożonej struktury zawierającej kwasy 3-hydroksytłuszczowe, które są chemicznymi markerami prawie wszystkich bakterii gram-ujemnych.

Spośród wielu metod, chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas (GC/MS), wydaje się być najdogodniejszą metodą analityczną dla wykrywania i oznaczania ilościowego kwasów tłuszczowych [76]. Analiza kwasów 3-hydroksytłuszczowych metodą GC/MS, pozwala na dokładne ilościowe oznaczenie endotoksyn nawet w skomplikowanych próbkach pobranych ze środowiska. Kwasy te są

składnikami lipidu A, który jest częścią struktury LPS odpowiedzialnego za efekt endotoksyczny [77].

Skład kwasów 3-OH jest różny dla poszczególnych bakterii, a analiza GC/MS może dostarczyć informacji o pochodzeniu LPS. Na przykład, kwas 3-OH 14:0 jest dominującym w pałeczkach z rodziny *Enterobacteriaceae*, (*E. coli*, *P. mirabilis*), podczas gdy 3-OH 10:0, 3-OH 12:0, i 3-OH 16:0 w pałeczkach gram-ujemnych z rodziny *Pseudomonadaceae*, a 3-OH 18:0 w *H. pylori*. W niektórych bakteriach identyfikowane były również kwasy 3-hydroksytłuszczowe z nieparzystą liczbą atomów węgla [78]. Informacje uzyskane metodą GC/MS mogą być przydatne np. dla określenia pochodzenia zanieczyszczenia bakteriami gram-ujemnymi.

Uwolnienie kwasów tłuszczowych z LPS można osiągnąć stosując zarówno hydrolizę kwasową, jak i zasadową. Obie metody uwalniają kwasy z wiązań estrowych jak i amidowych, którymi są połączone z glukozoaminą. Z wielu względów takich jak tworzące się artefakty, czy też dłuższą procedurę, preferowana jest hydroliza metanolowym roztworem chlorowodoru. Hydroliza i przeprowadzenie kwasów do estrów metylowych, zachodzą w tym samym etapie przygotowania próbki [79–81]. Do ilościowego oznaczania LPS metodą GC/MS konieczne jest jeszcze przeprowadzenie kwasów 3-hydroksytłuszczowych w pochodne Me/TMS lub Me/PFBO.

Pochodne TMS były badane wcześniej [82], przy czym minimum detekcji LPS (metodą EI^+), wynosiło ok. 100 ng w 1 ml badanej próbki. Sonesson [83] wykazał, że stosując pochodne PFBO w analizie GC/MS metodą CI^- , możliwe jest wykrywanie 1 ng (10^{-9} g) LPS w próbce wyjściowej. Czulość metody CI^- zastosowanej do analizy pochodnych Me/PFBO nie odbiegała od podawanej w literaturze [83], tzn. 1 ng LPS w próbce wyjściowej jest wykrywalny w rutynowych warunkach analizy.

Różnica w czulości metod (CI^-) i (EI^+), przy zastosowaniu pochodnych Me/PFBO lub Me/TMS, okazała się mniejsza niż przypuszczano. Szczególnie jest to widoczne dla kwasu 3-OH 14:0, gdzie oznaczane ilości były takie same dla obu rodzajów pochodnych. Wyższe wartości ilościowe uzyskiwano dla pochodnej Me/TMS kwasu 3-OH 18:0 w porównaniu z pochodną Me/PFBO. Z doświadczeń własnych wynika również, że w celu uzyskania maksymalnej czulości i powtarzalności opisywanej metody zalecane jest:

1. użycie szkła (głównie probówek) z nieaktywną powierzchnią oraz nakrętek z teflonowymi podkładami,
2. unikanie zanieczyszczeń związkami pochodzącymi z detergentów, odczynników itp., w trakcie przygotowywania próbki,
3. użycie szklanego wkładu w dozowniku chromatografu gazowego, który powinien być dezaktywowany i czyszczony regularnie, szczególnie przy nowej serii oznaczeń, ze spodziewanymi, małymi stężeniami markerów w próbce,
4. użycie krótkiego odcinka kolumny (ok. 0,5–1 m), od strony dozownika, który powinien być wymieniany po serii oznaczeń, w celu uniknięcia

adsorpcji, i/lub rozkładu próbki na aktywnej powierzchni kolumny pokrytej cząsteczkami węgłonego materiału, głównie z węglowodorów, jak np. heksan, używanych jako rozpuszczalników,

5. źródło jonów spektrometru masowego powinno być rutynowo czyszczone,
6. do każdej serii oznaczeń powinna być dołączona „ślepa” próba tylko z odczynników przechodząca przez wszystkie etapy przygotowania właściwej próbki. Pozwala to nie tylko na ocenę „czystości” procedury, ale również stanu aparatury.

Jednakże, przygotowanie pochodnych Me/TMS jest łatwiejsze, reakcja jest szybka (15 min. w 80°C), oraz nie wymaga dodatkowych ekstrakcji, jak w przypadku pochodnych Me/PFBO. Dodatkową korzyścią jest bardzo niski poziom szumów analitycznych w przypadku oznaczania pochodnych Me/TMS, nawet wówczas gdy analizowano bardzo małe ilości LPS.

Stwierdzoną prawidłowością jest także fakt dłuższej pracy włókna (korzyści ekonomiczne) w źródle jonów spektrometru mas pracującego w trybie jonizacji dodatniej EI^+ aniżeli w trybie ujemnej jonizacji chemicznej CI^- .

Kwasy 3-OH (poza LPS) były wykrywane w fosfolipidach np. w grupie *Flavobacterium* – *Cytophaga* [84], jak również w bardzo małych ilościach w lipidach ścian komórkowych *Mycobacterium* [85]. Dane o występowaniu tych kwasów w różnych rodzajach bakterii gram-ujemnych podaje Wilkinson [86].

Zastosowanie metody GC/MS umożliwia ich rozróżnienie przez wykrywanie charakterystycznych dla nich jonów.

Pochodne Me/TMS kwasów 3-OH są wykrywane przez rejestrowanie jonu $m/z = 175$. Występowanie określonych jonów w widmie mas dla pochodnych Me/PFBO uzyskanych metodą CI^- zależy od temperatury źródła jonów, czego nie obserwowano dla pochodnych Me/TMS analizowanych metodą EI^+ .

Obserwowany był jednak częściowy rozkład próbki podczas reakcji przeprowadzanej w 150°C w czasie 1 godziny.

Reakcja powstawania pochodnych Me/TMS zachodzi po ogrzewaniu próbki w 80°C przez 15 minut.

Oba rodzaje pochodnych są chemicznie stabilne podczas przechowywania przez kilka tygodni w temperaturze 4°C (dane nie publikowane).

Porównanie oznaczeń LPS metodą GC/MS z połączonym testem kolorymetrycznym i Limulus, wykazało, że np. w kurzu występują inne niż LPS aktywne substancje [87]. Dla ilościowego oznaczania kwasów 3-hydroksytyluszczowych niezbędne jest użycie standardu wewnętrznego. Jako najbardziej przydatne okazały się kwasy: 3-hydroksynonanowy (3-OH 9:0) [83] oraz 3-hydroksytridekanowy (3-OH 13:0) [80, 81]. Obydwa związki zawierają nieparzystą liczbę atomów węgla, posiadają identyczne właściwości chemiczne jak oznaczane kwasy co powoduje, że dodane w określonej, zawsze tej samej ilości do próbki, przechodzą przez wszystkie etapy jej przygotowania, podobnie jak kwasy zawarte w próbce.

E. coli jest pewnego rodzaju standardem, naturalną florą naszego organizmu, ale z drugiej strony są szczepy chorobotwórcze wywołujące np. biegunki u dzieci. Drobnoustrój ten występuje powszechnie w naszym środowisku i jest wskaźnikiem jego skażenia (miano coli), pośrednio wskazując na występowanie innych bakterii.

P. mirabilis, z klinicznego punktu widzenia jest ważny w przypadku zakażenia dróg moczowych. Bardzo rozpowszechniony w szpitalach (zakażenia wewnątrzszpitalne), łatwo namnaża się. Częstą przyczyną zakażeń może być np. cewnikowanie, stąd ważna jest kontrola bakteriologiczna używanego sprzętu medycznego, płynów itd.

P. aeruginosa może powodować powikłania np. w leczeniu ran pooperacyjnych.

H. pylori jest drobnoustrojem, klinicznie związanym z chorobą wrzodową żołądka i dwunastnicy zarówno u dorosłych jak i dzieci. Jest on bardzo intensywnie badany przez wiele ośrodków naukowych na świecie, stąd wynika potrzeba opracowania nowych, czułych metod jego wykrywania i identyfikacji. Metoda GC/MS i bardzo charakterystyczne spektrum kwasów LPS tej bakterii (m.in. wyjątkowa dominacja kwasu 3-OH 18:0) wydaje się być idealna do osiągnięcia tego celu [88]. Metoda GC/MS może służyć do wczesnego i szybkiego wykrycia skażenia bakteriami urządzeń produkcyjnych, reaktorów, surowców itp. używanych w procesach biotechnologicznych, fermentacyjnych w przemyśle farmaceutycznym, czy też spożywczym.

Wczesne wykrycie skażenia bakteriami, jeszcze przed rozpoczęciem procesu technologicznego, może przynosić wymierne korzyści ekonomiczne przyczyniając się do zmniejszenia strat finansowych przez uniknięcie strat w produkcji, czy też poprawę jakości wyrobu gotowego.

Należy nadmienić, że niedostateczna kontrola bakteriologiczna może prowadzić nie tylko do obniżenia jakości wytwarzanego produktu czy nawet jego całkowitego zniszczenia, ale może stanowić zagrożenie dla personelu i środowiska.

Obecnie ciągle jeszcze stosowane metody kontroli bakteriologicznej opierają się głównie na hodowlach badanych próbek i różnego rodzaju testach biochemicznych co może trwać od kilku godzin do kilku dni.

Rosnące zagrożenie skażeń bakteriami szpitali, sanatoriów, środowiska (np. wody), żywności, powoduje, że istnieje zapotrzebowanie na opracowanie nowych, czułych i szybkich metod oceny mikrobiologicznej wyżej wymienionych zagrożonych obszarów. Metoda GC/MS oznaczania specyficznych markerów ścian komórkowych bakterii, może być zastosowana do wykrywania zakażeń bakteryjnych u ludzi. Wykrywanie markerów chemicznych metodą GC/MS może znaleźć zastosowanie także do oceny mikrobiologicznej zanieczyszczenia systemów wentylacyjnych i klimatyzacyjnych.

Pomiary te mogą być wykonane bezpośrednio z pobranej próbki, bez uprzedniej, często długiej i trudnej hodowli bakterii.

Ogólnie można powiedzieć, że markerów chemicznych bakterii należy szukać przede wszystkim tam, gdzie w normalnych warunkach, skażenie bakteriami nie powinno mieć miejsca.

Zastosowanie chromatografii gazowej i spektrometrii mas jako metody analitycznej w mikrobiologii jest jedynie alternatywą do innych biologicznych metod badania drobnoustrojów. Może stanowić podstawę do znalezienia korelacji pomiędzy np. wdychaniem organicznego kurzu z określonego środowiska, a występującymi objawami klinicznymi.

Można przewidywać, że dalszy rozwój zastosowania metody GC/MS do wykrywania i ilościowego oznaczania markerów chemicznych ścian komórkowych bakterii może znaleźć zastosowanie np. do:

- a) szybkiego wykrywania zakażeń bakteryjnych u ludzi,
- b) oceny mikrobiologicznej skażeń procesów fermentacyjnych i biochemicznych w przemyśle farmaceutycznym i spożywczym,
- c) oceny mikrobiologicznej zanieczyszczenia środowiska naturalnego, (wody, powietrza), szpitalnego i sanatoryjnego, płynów infuzyjnych, dializacyjnych, hodowli tkankowych,
- d) oceny mikrobiologicznej zanieczyszczenia systemów wentylacyjnych i klimatyzacyjnych.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] Z. Mielniczuk, K. Bal, *Wiad. Chem.*, 2012, **66**, 445.
- [2] K. Bal, L. Larsson, E. Mielniczuk, Z. Mielniczuk, *J. Microbiol. Meth.*, 2002, **48**, 267.
- [3] A. Saraf, L. Larsson, *Adv. Mass Spectr.*, 1998, **14**, 449.
- [4] S.M. Hammond, P.A. Lambert, A.N. Rycroft, *The bacterial cell surface*, Croom Helm, Becknham, U.K. 1984.
- [5] E.Th. Rietschel, U. Brade, U. Schade, U. Seydel, S. Zahringer, S. Kusumoto, H. Brade, *Bacterial endotoxins: properties and structure of biologically active domains* [w:] *Surface structures of microorganisms and their interactions with the mammalian host*, (E. Schrinner, M.H. Richmond, G. Seibert, U. Schwarz), VHC Publishers, Weinheim, 1997.
- [6] A. Fox, S.L. Morgan, L. Larsson, G. Odham, *Analytical microbiology methods. Chromatography and mass spectrometry*, Plenum Press, New York 1990.
- [7] P.J. Hitchcock, L. Leive, P.H. Makela, E.Th. Rietschel, W. Strittmatter, D.C. Morrison, *J. Bacteriol.*, 1986, **166**, 699.
- [8] I.C. Hancock, I.R. Poxton, *Separation and purification of surface components* [w:] *Bacterial cell surface techniques*, John Wiley and Sons, Chichester, 1988, 67.
- [9] Z. Sidorczyk, U. Zahringer, E.Th. Rietschel, *Eur. J. Biochem.*, 1983, **137**, 15.
- [10] H. Mayer, U.R. Bhat, H. Masoud, J. Radziejewska-Lebrecht, C. Widemann, J.H. Krauss, *Pure and Appl. Chem.*, 1989, **61**, 1271.
- [11] E.Th. Rietschel, H.W. Wollenwebe, H. Brade U. Zahringer, B. Lindner, U. Seydel, O. Bradaczek, H. Barnickel, H. Labischinski, P.W. Giesbrecht, *Handbook of Endotoxin*, Vol. 1, Chemistry of Endotoxin (E.Th. Rietschel, Red.), Elsevier, Amsterdam, 1984, str. 187.

- [12] A. Fox, J. Gilbert, S.L. Morgan, *Analytical microbiology: a perspective w Analytical microbiology methods. Chromatography and mass spectrometry*, (A. Fox, S.L. Morgan, L. Larsson, G. Odham, Red.), Plenum Press, New York 1990, str. 1.
- [13] S.G. Wilkinson, *Gram-negative bacteria [w:] Microbial lipids*, Vol. 1, (C. Ratledge, S.G. Wilkinson Red.), Academic Press 1988, Jovanovich H.B., Publishers.
- [14] H. Nikaido, T. Nakae, *The outer membrane of Gram-negative bacteria str.163-250 [w:] Advances in microbial physiology*, (A.H. Rose, J.G. Morris, Red.), Vol. 20, Academic Press, London 1979.
- [15] M. Vaara, H. Nikaido, *Molecular organization of bacterial outer membrane*, [w:] *Handbook of endotoxin*, (E.Th. Rietschel, Red.), vol. 1, Chemistry of endotoxin, Elsevier, Amsterdam 1984, str. 1.
- [16] O. Westphal, O. Luederitz, Ch. Galanos, H. Mayer, E.Th. Rietschel, *The story of bacterial endotoxin*, [w:] *Advances in Immunolpharmacology 3* (L. Chedid, J.W. Hadden, F. Spreafico, P. Dukor, D. Willoughby, Red.), Pergamon Press, Oxford 1986, 13.
- [17] A.C. McCartney, A.C. Wardlaw, *Endotoxic activities of lipopolysaccharides [w:] Immunolgy of bacterial cell envelope*, (D.E.S. Stewart-Tull, M. Davis, Reds.), John Wiley and Sons Ltd., Chichester, 1985, 203.
- [18] C.A. Dinarello, J.G. Cannon, S.M. Wolff, H.A. Bernheim, B. Beutler, A. Cerami, I.S. Figari, M.A. Palladino Jr., J.V. O'Connor, *J. Exp. Med.*, 1986, **163**, 1433.
- [19] G.D. Matrich, R.L. Danner, M. Ceska, A.F. Suffredini, *J. Exp. Med.*, 1991, **173**, 1021.
- [20] H. Takada, S. Kotani, *Crit. Rev. Microbiol.*, 1989, **16**, 477.
- [21] Ch. Galanos, O. Luederitz, E.Th. Rietschel, O. Westphal, H. Brade, L. Brade, M. Freudengerg, U. Schade, M. Imoto, H. Yoshimura, S. Kusumoto, T. Shiba, *Eur. J. Biochem.*, 1985, **148**, 1.
- [22] P. Malmberg, *Am. J. Indust. Med.*, 1990, **17**, 7.
- [23] R. Rylander, *Am. J. Indust. Med.*, 1990, **17**, 39.
- [24] R. Rylander, *Am. J. Indust. Med.*, 1987, **12**, 687.
- [25] R.M. Castellan, S.A. Olenchock, K.B. Kinslay, J.L. Hankinson, *N. Engl. J. Med.*, 1987, **317**, 605.
- [26] D.C. Morrison, J.L. Ryan, *Ann. Rev. Med.*, 1987, **38**, 417.
- [27] Z. Markiewicz, *Struktura i funkcje osłon bakteryjnych*, Wydaw. Naukowe PWN, Warszawa, 1993, str. 45.
- [28] J. Aleksandrowicz, Z. Kudelski, *Roczn. PZH*, 1997, **48**, 275.
- [29] J.F. Cooper, J. Levin, H.N. Wagner Jr., *J. Lab. Clin. Med.*, 1971, **78**, 138.
- [30] P. Friberger, M. Knos, L. Mellstam, *A quantitative endotoxin assay utilizing LAL and a chromogenic substrate*, [w:] *Endotoxins and their detection with the Limulus amoebocyte lysate test* (S.W. Watson, J. Levin, T.J. Novitsky, Red.), *Prog. Clin. Biol. Res.*, vol. 93, Alan R. Liss, New York, 1982, str. 195.
- [31] G.H. Zhang, L. Beak, C.J. Koch, *J. Clin. Microbiol.*, 1988, **26**, 1464.
- [32] T.L. Dwelle, L.M. Dunkle, L. Blair, *J. Clin. Microbiol.*, 1987, **25**, 856.
- [33] K. Ikemura, K. Ikegami, T. Shimazu, T. Yoshioka, T. Sugimoto, *J. Clin. Microbiol.*, 1989, **27**, 1965.
- [34] S. Iwanaga, T. Morita, T. Harada, Harada T, S. Nakamura, M. Niwa, K. Takada, T. Kimura, S. Sakakibara, *Haemostasis*, 1978, **7**, 183.
- [35] R.I. Harris, P.C.W. Stone, J. Stuart, *J. Clin. Pathol.*, 1983, **36**, 1145.
- [36] A. Sonesson, L. Larsson, A. Schutz, L. Hagmar, T. Hallberg, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1990, **56**, 1271.
- [37] S.J. Reynolds, D.K. Milton, D. Heederik, P.S. Thorne, K.J. Donham, E.A. Croteau, K.M. Kelly, J. Douwes, D. Lewis, M. Whitmer, I. Connaughton, S. Koch, P. Malmberg, B.-M. Larsson, J. Deddens, A. Saraf, L. Larsson, *J. Environ. Monit.*, 2005, **7**, 1371.
- [38] Z. Mielniczuk, E. Mielniczuk, L. Larsson, *J. Microbiol. Meth.*, 1993, **17**, 91.
- [39] A. Saraf, L. Larsson, *J. Mass Spect.*, 1996, **31**, 389.
- [40] B. Christensson, J. Gilbert, A. Fox, S.L. Morgan, *Arthritis Rheum.*, 1989, **32**, 1268.
- [41] M. Walters, D. Milton, L. Larsson, T. Ford, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1994, **60**, 996.

- [42] Z. Mielniczuk, E. Mielniczuk, L. Larsson, Determination of bacterial endotoxin and peptidoglycan by GC/MS after a selective extraction procedure, Third, International Symposium Analytical Chemistry in Environmental Microbiology, March 12–16, 1995, Knoxville, Tennessee, USA.
- [43] K. Abel, H. deSchmertzling, J.I. Peterson, *J. Bacteriol.*, 1963, **85**, 1039.
- [44] D.B. Drucker, *Analysis of structural components of microorganisms by gas chromatography*, [w:] *Microbiological application of gas chromatography*, Cambridge University Press, Cambridge 1981.
- [45] P. Whittaker, F.S. Fry, S.K. Curtis, S.F. Al-Khalidi, M.M. Mossoba, M. Pete Yurawecz, V.C. Dunkel, *J. Agric. Food Chem.*, 2005, **53**, 3735.
- [46] N.M. Morris, E.A. Catalano, R.J. Berni, *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, 1988, **49**, 81.
- [47] A. Sonesson, L. Larsson, A. Fox, G. Westerdaahl, G. Odham, *J. Chromatogr. Biomed. Applic.*, 1988, **431**, 1.
- [48] A. Sonesson, L. Larsson, A. Schutz, L. Hagmar, T. Hallberg, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1990, **56**, 1271.
- [49] Y1 Li, S. Wu, L. Wang, Y. Li, F. Shi, X. Wang, *J. Sci. Food Agric.*, 2010, **90**, 1380.
- [50] H.-W. Wollenbenweber, E.Th. Rietschel, *J. Microbiol. Meth.*, 1990, **11**, 195.
- [51] S.K. Maitra, R. Nachum, F.C. Pearson, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1986, **52**, 510.
- [52] W. Gradowska, L. Larsson, *J. Microbiol. Meth.*, 1994, **20**, 55.
- [53] I. Mattsby-Baltzer, Z. Mielniczuk, L. Larsson, K. Lindgren, S. Goodwin, *Infect. Immun.*, 1992, **60**, 4383.
- [54] S.G. Wilkinson, *Gram-negative bacteria* [w:] *Microbial lipids*, Vol. 1, (C. Ratledge, S.G. Wilkinson, Red.), Academic Press, London 1988, str. 299.
- [55] C.O. Thoen, A.G. Karlson, R.D. Ellefson, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1972, **24**, 1009.
- [56] E. Jantzen, K. Bryn, *Whole cell and lipopolysaccharide fatty acids and sugars of gram-negative bacteria*, [w:] *Chemical methods in bacterial systematics*, (M. Goodfellow, D.E. Minnikin, Red.), The Society for Applied Bacteriology Technical Series No. 20, Academic Press, London 1985.
- [57] S.L. Morgan, A. Fox, J. Gilbert, *J. Microbiol. Meth.*, 1989, **9**, 57.
- [58] A. Fox, J. Gilbert, S.L. Morgan, *Analytical microbiology: a perspective*, [w:] *Analytical microbiology methods. Chromatography and mass spectrometry*, (A. Fox, S.L. Morgan, L. Larsson, G. Odham Red.), Plenum Press, New York 1990, str. 1.
- [59] S. Alugupalli, F. Porataels, L. Larsson, *J. Bacter.*, 1994, **176**, 2962.
- [60] E. Jantzen, K. Bryn, *Analysis of cellular constituents from Gram-negative bacteria* [w:] *Chemical methods in prokaryotic systematics*, (M. Goodfellow, A.G. O'Donnell, Reds.), John Wiley & Sons, Chichester, 1994, 21.
- [61] G. Kawai, *Biochim. Biophys. Acta*, 1989, **1001**, 185.
- [62] H. Spreitzer, G. Spiteller, *Monatsh. Chem.*, 1989, **120**, 1139.
- [63] B. Szponar, E. Norin, T. Midtvedt, L. Larsson, *J. Microbiol. Methods*, 2002, **50**, 283.
- [64] C. Hines, M. Waters, L. Larsson, M. Petersen, A. Saraf, D. Milton, *Indoor Air*, 2003, **13**, 166.
- [65] L. Larsson, *J. Environ. Monit.*, 2008, **10**, 301.
- [66] A. Nilsson, E. Kihlström, V. Lagesson, B. Wessén, B. Szponar, L. Larsson, C. Tagesson, *Indoor Air*, 2004, **14**, 74.
- [67] J. Park, B. Szponar, L. Larsson, D.R. Gold, D.K. Milton, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2004, **70**, 262.
- [68] D. Pomorska, L. Larsson, C. Skorska, J. Sitkowska, J. Dutkiewicz, *Ann. Agric. Environ. Med.*, 2007, **14**, 291.
- [69] A.A. Peterson, A.A., E.J. McGroarty, *J. Bacteriol.*, 1985, **162**, 738.
- [70] M. Rivera, L.E. Bryan, R.E. Hancock, E.J. McGroarty, *J. Bacteriol.*, 1980, **170**, 512.
- [71] Z. Mielniczuk, *Oznaczanie niektórych chemicznych markerów ścian komórkowych bakterii metodą chromatografii gazowej i spektrometrii mas*, Praca habilitacyjna, Warszawa, 1966.
- [72] R. Rylander, *Am. J. Indust. Med.*, 1987, **12**, 687.

- [73] R.M. Castellan, S.A. Olenchock, J.L. Hankinson, P.H. Millner, J.B. Cocke, C.K. Bragg, H.H. Perkins Jr., R.R. Jacobs, *Ann. Int. Med.*, 1984, **101**, 157.
- [74] S.A. Olenchock, J.J. May, D.S. Pratt, P.R. Morey, *Occupational exposures to airborne endotoxins in agriculture [w:] Detection of bacterial endotoxins with the Limulus Ameboctyte Lysate Test*, (S.W. Watson, J. Levin, T.J. Novitsky, Reds.) 1987, 475.
- [75] L. Larsson, *APMIS*, 1994, **102**, 161.
- [76] A. Kukis, *Handbook of lipid research*, Vol. 1. Fatty acids and glycerydes, (D.J. Hanahan Red.), Plenum Press, New York 1982, str. 1.
- [77] C. Galanos, O. Lüderitz, E.Th. Rietschel, O. Westphal, Galanos, *Newer aspects of the chemistry and biology of bacterial lipopolysaccharides, with special reference to their lipid A component*, [w:] *Biochemistry of lipids II. International review of biochemistry*, vol. 14, (T.W. Goodwin Red.), University Park Press, Baltimore 1977, str. 239.
- [78] *Microbial lipids*, (C. Ratledge, S.G. Wilkinson (Red.)), Vol. 1, Academic Press, London 1988.
- [79] H.-W. Wollenweber, E.Th. Rietschel, *J. Microb. Meth.*, 1990, **11**, 195.
- [80] Z. Mielniczuk, S. Alugupalli, E. Mielniczuk, L. Larsson, *J. Chromatogr.*, 1992, **623**, 115.
- [81] Z. Mielniczuk, E. Mielniczuk, L. Larsson, *J. Microbiol. Meth.*, 1993, **17**, 91.
- [82] S.K. Maitra, R. Nachum, F.C. Pearson, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1986, **52**, 510.
- [83] A. Sonesson, L. Larsson, G. Westerdahl, G. Odham, *J. Chromatogr.*, 1987, **417**, 11.
- [84] H. Oyaizu, K. Komagata, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 1981, **27**, 57.
- [85] S. Alugupalli, F. Porataels, L. Larsson, *J. Bacter.*, 1994, **176**, 2962.
- [86] S.G. Wilkinson, *Gram-negative bacteria [w:] Microbial lipids*, Vol. 1, (C. Ratledge, S.G. Wilkinson, Red.), Academic Press, 1988, Jovanovich H.B., Publishers.
- [87] A. Sonesson, L. Larsson, A. Schutz, L. Hagmar, T. Hallberg, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1990, **56**, 1271.
- [88] I. Mattsby-Baltzer, Z. Mielniczuk, L. Larsson, K. Lindgren, S. Goodwin, *Infect. Immun.*, 1992, **60**, 4383.

Praca wpłynęła do Redakcji 18 stycznia 2016

INFORMACJE

SPRAWOZDANIE KOMITETU GŁÓWNEGO OLIMPIADY CHEMICZNEJ Z ORGANIZACJI OLIMPIADY CHEMICZNEJ W ROKU 2015

W roku szkolnym 2015 odbył się II i III etap 61. Olimpiady Chemicznej oraz I etap 62. Olimpiady Chemicznej. Olimpiada Chemiczna organizowana jest na podstawie umowy z Ministerstwem Edukacji Narodowej i finansowana ze środków przekazanych przez to Ministerstwo.

Zgodnie z uchwałą Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Chemicznego z czerwca 2014 r. od 1 września 2014 r. pracami Komitetu Głównego Olimpiady Chemicznej kieruje Prezydium w składzie: prof. dr hab. Marek Orlik – przewodniczący, prof. dr hab. Aleksandra Misicka-Kęsik – wiceprzewodnicząca, dr hab. Ewa Poboży – sekretarz naukowy oraz mgr Wanda Szelańska – kierownik organizacyjny.

Etap II odbył się w trzynastu miejscowościach będących siedzibami Komitetów Okręgowych, 30 i 31 stycznia 2015 r. Uczniowie mieli do rozwiązania pięć zadań teoretycznych oraz jedno zadanie laboratoryjne. Do III etapu (finału) Komitet Główny zakwalifikował dziewięćdziesięciu dwóch uczniów z czterdziestu pięciu szkół.

Finałowe zawody III etapu odbyły się 10 i 11 kwietnia 2015 r. w Warszawie. Zawody laboratoryjne przeprowadzone zostały w pracowniach Wydziału Chemicznego Politechniki Warszawskiej, a zawody teoretyczne w salach Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego. W części teoretycznej zawodnicy rozwiązywali 5 zadań, a w części laboratoryjnej – 2 zadania, dotyczące jakościowej i ilościowej analizy chemicznej.

Po sprawdzeniu prac Komitet Główny wyłonił 32 laureatów (tabela 2), w tym 4 reprezentantów Polski na 47. Międzynarodową Olimpiadę Chemiczną, która odbyła się w Baku (Azerbejdżan) w dniach 20–29 lipca 2015 r. Wszyscy czterej zawodnicy zdobyli medale: Michał Kopyt zdobył medal złoty, Michał Gala i Karol Rząd – medale srebrne, a Damian Jędrzejowski – medal brązowy. Zawodnikiem rezerwowym był Michał Kostrzanowski.

Wszystkie zadania (wraz z przykładowymi rozwiązaniami) z poszczególnych etapów oraz z Olimpiady Międzynarodowej zamieszczone są na naszej stronie internetowej <http://www.olchem.edu.pl>.

Laureaci, nauczyciele i dyrektorzy szkół zostali zaproszeni na uroczyste zakończenie Olimpiady, które odbyło się 20 czerwca 2015 r. w Auli Wydziału Chemii Uni-

wersytetu Warszawskiego. Uroczystość tę zaszczylicili swoją obecnością znakomici goście, którzy wspierali Komitet Główny zarówno w pracy, jak i finansowo w nagradzaniu laureatów. Byli nimi przedstawiciele:

Ministerstwa Edukacji Narodowej: p. mgr Beata Kosiec, naczelnik Wydziału Wspierania Szans Edukacyjnych,

władz Warszawy: p. mgr Małgorzata Żuber-Zielicz, przewodnicząca Komisji Edukacji i Rodziny, radna m. st. Warszawy,

Polskiej Akademii Nauk: prof. dr hab. Elżbieta Frąckowiak - wiceprezes PAN, prof. dr hab. Robert Hołyst - dyrektor Instytutu Chemii Fizycznej PAN, dr Piotr Lipkowski - zastępca dyrektora Instytutu Chemii Organicznej PAN oraz prof. dr hab. Marek C. Chmielewski z IChO PAN, były wiceprezes PAN,

Polskiego Towarzystwa Chemicznego: prof. dr hab. Michał Cyrański, reprezentujący Zarząd Główny PTCh oraz prof. dr hab. Adam Proń - przewodniczący Oddziału Warszawskiego PTCh,

Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego: dziekan, prof. dr hab. Paweł Kulesza oraz prodziekani - prof. dr hab. Zbigniew Stojek i dr hab. Andrzej Kudelski, a także prof. dr hab. Ewa Bulska - dyrektor Centrum Nauk Biologiczno-Chemicznych Uniwersytetu

Warszawskiego oraz prof. dr hab. Marek T. Krygowski, emerytowany profesor Wydziału, laureat pierwszych dwóch krajowych Olimpiad Chemicznych,

Kolegium Międzywydziałowych Indywidualnych Studiów Matematyczno-Przyrodniczych Uniwersytetu Warszawskiego, w osobie dyrektora, prof. dr hab. Andrzeja Twardowskiego, reprezentującego także Wydział Fizyki UW,

Wydziału Chemicznego Politechniki Warszawskiej, w osobie dziekana, prof. dr hab. inż. Zbigniewa Brzózki oraz prodziekanów: prof. dr hab. inż. Elżbiety Malinowskiej i dr inż. Andrzeja Królikowskiego, a także dr hab. inż. Michała Fedoryńskiego, prof. PW,

Wydziału Chemii Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu, w osobie reprezentującego władze Wydziału oraz Komitet Okręgowy Olimpiady Chemicznej w Poznaniu prof. dr hab. Lechosława Łomozika.

Obecni byli także działacze olimpijscy, członkowie Komitetu Głównego Olimpiady Chemicznej i zespołu redagującego zadania konkursowe - wieloletnia sekretarz naukowa, dr Małgorzata Jelińska (Wydział Chemii UW) oraz nowi członkowie Komitetu Głównego: prof. dr hab. Józef Mieczkowski (Wydział Chemii UW, przewodniczący Komitetu Okręgowo Olimpiady Chemicznej w Warszawie), dr hab. inż. Janusz Zachara, prof. PW oraz dr Andrzej Żywociński z IChF PAN.

Przewodniczący Komitetu Głównego Olimpiady Chemicznej, prof. dr hab. Marek Orlik wręczył laureatom oraz ich nauczycielom (tabela 2) dyplomy i nagrody od Komitetu Głównego Olimpiady Chemicznej. Nagrodami tymi były: dla zwycięzcy i drugiego w kolejności zawodnika – laptopy Asus, a dla pozostałych zawodników – tablety firmy Samsung, kamery JVC, iPody shuffle firmy Apple oraz dyski zewnętrzne firmy Western Digital. Wszyscy laureaci otrzymali także książki подарowane przez Polskie Towarzystwo Chemiczne i Wydawnictwo Naukowe PWN oraz pamiętkowe pamięci USB 8GB. Tradycyjnie przyznane zostały też nagrody specjalne. Najlepsze wyniki finałowe nagrodzone zostały kamerami SONY, które otrzymali: Michał Gala – od Prezesa spółki Novichem, Damian Jędrzejowski – od Dziekana Wydziału Chemicznego PW, a Karol Rząd – od Dziekana Wydziału Chemii UW. Dyrektor Instytutu Chemii Fizycznej PAN, prof. dr. hab. Robert Hołyst wręczył specjalne nagrody pieniężne za najlepiej rozwiązane zadania z chemii fizycznej: Michałowi Kostrzanowskiemu, Bartłomiejowi Banasiowi i Sebastianowi Kaczorowi, zaś za najlepiej rozwiązane zadania z chemii organicznej wicedyrektor IChO PAN, dr Piotr Lipkowski, wręczył takie nagrody Michałowi Kopytowi, Wojciechowi Jankowskiemu i Karolowi Rządowi.

Nagrodzony został także najmłodszy laureat, Wojciech Jankowski, uczeń trzeciej klasy Gimnazjum nr 24 w Gdyni, który otrzymał kamerę SONY od Dziekana Wydziału Chemii UAM.

Dzięki hojności sponsorów wartościowe upominki: ekskluzywne pióra Parkera z dedykacją, pamięci USB 8 GB oraz książki: „Akademicki zbiór zadań z chemii ogólnej” autorstwa K.M. Pazdry, A. Rola-Noworyty i „Laboratorium w szufladzie”, pióra A. Gumkowskiej otrzymali także nauczyciele laureatów. Specjalne podziękowania otrzymali także wspierający organizację zawodów niedawni laureaci Olimpiady, a obecnie studenci różnych uczelni.

Zgodnie z miłą tradycją, członkom polskiej reprezentacji na Olimpiadę Międzynarodową flagę Polski, wraz z życzeniami powodzenia na zawodach w Baku, przekazał Wojciech Łyczek, złoty medalista ubiegłorocznej 46. IChO w Hanoi.

Wszyscy finaliści (uczestnicy III etapu) i laureaci otrzymali wystawione przez Komitet Główny zaświadczenia, które zwalniają z notą najwyższą z egzaminu maturalnego oraz są podstawą do skorzystania z odpowiednich uprawnień przy przyjmowaniu na I rok studiów wyższych.

Po zakończeniu części oficjalnej wszyscy obecni zostali zaproszeni do Starej Biblioteki Wydziału Chemii UW na okolicznościowy poczęstunek.

Przygotowania do zawodów 62. Olimpiady chemicznej rozpoczęły się już po zakończeniu finału 61.O.Ch.. Tak jak w latach poprzednich, podczas uroczystości zakończenia 61 Olimpiady obecnym zostały rozdane foldery z zadaniami wstępnymi a następnie zostały one rozesłane do szkół i jednocześnie umieszczone w wersji elektronicznej na stronie internetowej Olimpiady: www.olchem.edu.pl. Zainteresowani uczniowie mogli indywidualnie rozpocząć rozwiązywanie zadań jeszcze przed wakacjami, uzupełniając swoje wiadomości i rozwijając umiejętności na podstawie zalecanej literatury oraz korzystając z konsultacji nauczycieli i starszych kolegów.

Podobnie jak w ubiegłym roku do 24 października 2015 r. wszyscy chętni musieli zarejestrować się na stronie internetowej Olimpiady i zarazem przekazać rozwiązania zadań (obowiązkowych, przygotowujących do I etapu zawodów) z części A swojemu nauczycielowi. W roku 2015 zarejestrowało się 1114 zawodników z 304 szkół. Nauczyciele, po sprawdzeniu prawidłowości rozwiązań, przesyłali je do odpowiednich Komitetów Okręgowych. Na podstawie potwierdzonych przez nauczycieli rozwiązanych zadań etapu wstępnego 937 uczniów z 253 szkół zostało zakwalifikowanych do etapu pierwszego.

Etap I odbył się 28 listopada 2015 r. w kilkunastu większych miastach Polski, pod nadzorem komisji powołanych przez Komitety Okręgowe. Zawodnicy rozwiązywali 5 zadań teoretycznych. Na podstawie uzyskanych wyników Komitet Główny zakwalifikował do następnego (II) etapu 381 zawodników ze 148 szkół. Zawody te odbędą się 29 i 30 stycznia 2016 roku w uczelniach będących siedzibami Komitetów Okręgowych.

Lista dodatkowych sponsorów 61. Olimpiady Chemicznej:

1. Dyrektor Instytutu Chemii Fizycznej Polskiej Akademii Nauk
2. Dyrektor Instytutu Chemii Organicznej Polskiej Akademii Nauk
3. Dziekan Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego
4. Dziekan Wydziału Chemicznego Politechniki Warszawskiej
5. Dziekan Wydziału Chemii Uniwersytetu Adama Mickiewicza

oraz firmy: PKN ORLEN, NOVICHEM, GRUPA AZOTY, SYNTHOS oraz



Oficyna Edukacyjna *
* Krzysztof Pazdro



SPRAWOZDANIE Z 47. MIĘDZYNARODOWEJ OLIMPIADY CHEMICZNEJ W BAKU (AZERBEJDŻAN) 20–29.07.2015 R.

47. Międzynarodowa Olimpiada Chemiczna (IChO) odbyła się w dniach 20–29.07.2015 r. w Baku. Wzięło w niej udział 290 zawodników z 75 krajów: Arabii Saudyjskiej, Argentyny, Australii, Austrii, Azerbejdżanu, Belgii, Białorusi, Brazylii, Bułgarii, Chin, Chorwacji, Cypru, Czarnogóry, Czech, Danii, Estonii, Finlandii, Francji, Gruzji, Grecji, Hiszpanii, Holandii, Indii, Indonezji, Iranu, Irlandii, Islandii, Izraela, Japonii, Kanady, Kazachstanu, Kirgistanu, Korei Płd., Kostaryki, Kuby, Liechtensteinu, Litwy, Łotwy, Macedonii (Fyrom), Malezji, Meksyku, Mołdawii, Mongolii, Niemiec, Nigerii, Norwegii, Nowej Zelandii, Omanu (po raz pierwszy), Pakistanu, Peru, Polski, Portugalii, Rosji, Rumunii, Salwadoru, Serbii, Singapuru, Słowacji, Słowenii, Stanów Zjednoczonych Ameryki Północnej, Syrii, Szwajcarii, Szwecji, Tadżykistanu, Tajlandii, Tajwanu, Turcji, Turkmenistanu, Ukrainy, Urugwaju, Uzbekistanu, Węgier, Wielkiej Brytanii, Wietnamu i Włoch. Obecni byli również obserwatorzy z 4 krajów: Egiptu, Filipin, Republiki Południowej Afryki i Liechtensteinu, w związku z zamiarem przystąpienia lub powrotu do uczestnictwa tych krajów w przyszłych olimpiadach międzynarodowych. Oznacza to, że liczba krajów uczestniczących w tegorocznej IChO była taka sama, jak w roku ubiegłym. Uwagę zwróciła nieobecność reprezentacji Armenii.

Głównym organizatorem tegorocznej IChO był usytuowany w Baku oddział Państwowego Moskiewskiego Uniwersytetu im. Łomonosowa, co w praktyce oznaczało zapewnienie opieki merytorycznej (w tym – autorstwa zadań) przez zespół moskiewski, przy pozostawieniu kwestii organizacyjnych uniwersytetowi w Baku. Finansowanie IChO zapewnili: Ministerstwo Edukacji oraz Ministerstwo Młodzieży i Sportu Republiki Azerbejdżanu, Państwowe Przedsiębiorstwo Naftowe Republiki Azerbejdżanu (SOCAR) oraz Centrum Heydara Aliyeva.

Skład polskiej reprezentacji na IChO został wyłoniony przez Komitet Główny Olimpiady Chemicznej zgodnie z algorytmem obejmującym wyniki obecnej i poprzednich krajowych Olimpiad, z uwzględnieniem ewentualnych osiągnięć na poprzednich IChO. Polską reprezentację tworzyli następujący zawodnicy:

Michał Gala – z II klasy I LO im. E. Dembowskiego w Gliwicach (nauczyciel: mgr Katarzyna Czapla), zwycięzca 61. Krajowej Olimpiady Chemicznej

Karol Jakub Rząd – z III klasy LO II LO im. Mieszka I w Szczecinie (nauczyciel: mgr Teresa Kołogrecka-Bajek), laureat 2. miejsca w 61., 4. miejsca w 60. i wyróżniony (36. miejsce) w 59. Krajowej Olimpiadzie Chemicznej, zdobywca srebrnego medalu na 46. Międzynarodowej Olimpiadzie Chemicznej w Hanoi.

Damian Paweł Jędrzejowski – z III klasy V LO im. A. Witkowskiego w Krakowie (nauczyciel: dr Wojciech Przybylski), laureat 3. miejsca w 61. Krajowej Olimpiadzie Chemicznej.

Michał Kopyt – z III klasy II LO im. K. Morawskiego w Przemyśle (nauczyciel: mgr inż. Marian Sztaba), laureat 6. miejsca w 61. Krajowej Olimpiadzie Chemicznej i 19. miejsca w 59. Krajowej Olimpiadzie.

Komitet Główny Olimpiady Chemicznej powierzył funkcję opiekunów naszej reprezentacji (i zarazem – członków Międzynarodowego Jury) dwóm pracownikom naukowym Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego: **prof. dr. hab. Markowi Orlikowi** (przewodniczącemu KG Olimpiady Chemicznej) i **prof. dr. hab. Aleksanderze Misickiej-Kęsik** (wiceprzewodniczącej KG).

Jak co roku, dla wyjeżdżającej do Azerbejdżanu grupy i jednego zawodnika rezerwowego – **Michała Kostrzanowskiego** z III klasy I LO im. Władysława Jagiełły w Krasnymstawie (laureata 4. miejsca w 61. Krajowej Olimpiadzie), Komitet Główny Olimpiady Chemicznej zorganizował w dniach: 22.06–3.07 br. obóz przygotowawczy, w trakcie którego przerobione zostały wszystkie przysłane przez organizatorów IChO zadania teoretyczne i laboratoryjne oraz przedyskutowane wybrane zagadnienia dodatkowe. Zaangażowani w to byli pracownicy naukowci Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego i Wydziału Chemicznego Politechniki Warszawskiej, w większości – autorzy zadań na zawody Krajowej Olimpiady.

Zawody Międzynarodowej Olimpiady Chemicznej odbywały się w Baku, na terenie lokalnego oddziału Państwowego Moskiewskiego Instytutu im. Łomonosowa (część laboratoryjna – 23 lipca i część teoretyczna – 25 lipca). Jak zwykle, zawodnicy otrzymali teksty zadań przetłumaczone wcześniej przez opiekunów na swoje języki narodowe, po ustaleniu ostatecznych treści zadań przez Międzynarodowe Jury (opiekunów wszystkich ekip narodowych). Na czas dyskusji i tłumaczenia zadań (21–25 lipca) członkowie Międzynarodowego Jury zostali przewiezieni do położonego ok. 220 km od Baku kompleksu hotelowego w podkawkaskiej miejscowości Gabala.

Motywytem przewodnim tegorocznej IChO było hasło: *Life is a huge lab* („Życie to ogromne laboratorium”). Organizatorzy tegorocznej IChO przewidzieli 3 zadania laboratoryjne i 8 zadań teoretycznych.

Tematyka zadań **laboratoryjnych** była następująca:

Zadanie 1 (chemia organiczna):	Selektywne bromowanie katalityczne
Zadanie 2 (chemia analityczna):	Analiza składu roztworu soli chromu i wanadu
Zadanie 3 (chemia fizyczna):	Kinetyczna metoda oznaczania leku - diklofenaku

Tematyka zadań **teoretycznych** była następująca:

Zadanie 1 (chemia fizyczna i technologia):	Nowe i stare czynniki chłodnicze – charakterystyka termodynamiczna
Zadanie 2 (chemia fizyczna):	Sprzężone reakcje chemiczne – aspekty kinetyczne i termodynamiczne
Zadanie 3 (chemia ogólna i nieorganiczna):	Równowagi tworzenia kompleksów z dwoma centrami wiążącymi – konkurencja i kooperacja
Zadanie 4 (chemia nieorganiczna)	Diagnoza składu i struktury połączenia siarki z fosforem
Zadanie 5 (chemia analityczna):	Oznaczanie glukozy i fruktozy w soku owocowym
Zadanie 6: (chemia organiczna):	Otrzymywanie składników zapachowych chleba z piperodyny
Zadanie 7 (chemia organiczna):	Struktura i synteza peletieryny – alkaloidu z owoców granatu
Zadanie 8 (chemia organiczna i chemia środowiska):	Metody utylizacji płam ropy

Samo zestawienie tematów zadań nie ujawnia nowatorskiego charakteru obecnej IChO, szczególnie w odniesieniu do sposobu wykonywania zadań laboratoryjnych. Wymagały one bowiem posługiwania się bardziej niż zwykle zaawansowanym sprzętem, w tym – samodzielnego zestawienia aparatury do destylacji pod obniżonym ciśnieniem, pomiarów spektrofotometrycznych w warunkach termostatycznych i opracowywania danych eksperymentalnych z użyciem arkusza kalkulacyjnego Excel.

Zgodnie z Regulaminem IChO, złote medale Międzynarodowe Jury przyznaje 8–12% zawodników, srebrne: 18–22 % i brązowe: 28–32% zawodników. Ze względu na oceniany przez Międzynarodowe Jury jako bardzo wysoki stopień trudności zadań, w tym roku przyznano stosunkowo dużo, bo 35 medali złotych, ponadto 63 srebrne i 91 brązowych oraz 10 wyróżnień (dla osób pozostających tuż za pułką medalową).

Niewątpliwymi zwycięzcami tegorocznej IChO są zawodnicy chińscy, którzy zajęli cztery pierwsze miejsca w klasyfikacji indywidualnej. Najlepszy nasz zawodnik, także zdobywca złotego medalu, zajął miejsce 11.

Oto zestawienie wyników naszych zawodników (fot. 1):

Michał Kopyt – **złoty** medal (11. miejsce w klasyfikacji indywidualnej)

Karol Jakub Rząd – **srebrny** medal (39. miejsce w klasyfikacji indywidualnej)

Michał Łukasz Gala – **srebrny** medal (58. miejsce w klasyfikacji indywidualnej)

Damian Paweł Jędrzejowski – **brązowy** medal (147. miejsce w klasyfikacji indywidualnej)

Wyniki te oznaczają, iż przyjęta przez Komitet Główny strategia przygotowywania zawodników na IChO poprzez zapewnienie odpowiedniego poziomu zadań na Krajowej Olimpiadzie jest zasadniczo słuszna, choć oczywiście wskazane jest wzmo-

żenie starań dla podwyższania kwalifikacji przyszłych zawodników, aby wyniki takie jak powyższe lub lepsze zdarzały się częściej. Trzeba zarazem zdawać sobie sprawę z rosnącej, ze względu na stale narastającą liczbę krajów uczestniczących w IChO, konkurencji, przy tradycyjnie wysokim poziomie zawodników z krajów azjatyckich, takich jak Chiny, Korea Płd., Tajwan, czy Singapur. Warto też zwrócić uwagę na rosnącą liczbę zawodników azjatyckiego pochodzenia reprezentujących takie kraje, jak USA, Kanadę, Australię, Nową Zelandię, a ostatnio nawet niektóre kraje europejskie. Istnieje przekonanie, że sukcesy tych zawodników są wynikiem przede wszystkim ich pracowitości i cierpliwości - cech kultywowanych i konsekwentnie egzekwowanych w procesie wychowawczym przez ich konserwatywne rodziny. Bez tej konstatacji i bez zrozumienia tego zasadniczego, a dającego do myślenia nad kondycją naszej cywilizacji, związku przyczynowo-skutkowego, prowadzenie rozważań o roli samych tylko programów szkolnych i poziomu zadań konkursowych w sukcesach olimpijskich może prowadzić do zaledwie uproszczonych wniosków. O dojrzałości zwycięzcy tegorocznej IChO, Chińczyka Yifu Ouyanga, może świadczyć jego, skierowana do audytorium po otrzymaniu złotego medalu, emanująca skromnością wypowiedź: „jestem przekonany, że jeden egzamin to nie jest pełny egzamin i że część życia to nie jest całe życie”, nagrodzona owacją na stojąco.

W nieoficjalnej klasyfikacji medalowej zwycięzcami, obok Chin, są: Korea Płd. i Tajwan, których drużyny zdobyły również 4 złote medale. 2 złote medale i 2 srebrne zdobyły takie kraje, jak: Japonia, Indie i Rosja. 2 złote medale, 1 srebrny i 1 brązowy zdobyli zawodnicy z Rumunii. 1 złoty medal i 3 srebrne przypadły Singapurowi, Tajlandii, USA, Turcji oraz Republice Czeskiej. Polska, z 1 złotym, 2 srebrnymi i 1 brązowym medalem, znalazła się w następnej grupie, razem z Serbią, Iranem, Wietnamem, Kazachstanem i Słowacją.

Oprócz zawodów organizatorzy IChO zapewnili zawodnikom liczne atrakcje i wycieczki, w trakcie których pozostawali pod życzliwą opieką Tamilli Mammadovej, absolwentki filologii Uniwersytetu w Baku, studiującej literaturę rosyjską i język polski jako drugi język obcy. Również członkowie Międzynarodowego Jury, między zebraniem i pracą nad tłumaczeniem zadań, mieli możliwość poznać różne interesujące miejsca, jak np. teren wykopalisk archeologicznych w pobliżu Gabali, choć najbardziej interesujące wydaje się malownicze Baku, z powodzeniem łączące nowoczesną i staromiejską zabudowę (fot. 2 i 3), w której można dopatrzeć się działalności polskich architektów z przełomu XIX i XX wieku.

Więcej informacji o 47. IChO, włącznie z pełną listą nagrodzonych medalami zawodników i oficjalnym raportem organizatorów, zawartych jest na stronie internetowej: <http://icho2015.msu.az/>

Ze względu na odwołanie przez organizatorów planowanej na rok 2016 olimpiady w Kazaniu (Rosja) powstał poważny problem z lokalizacją następnej, 48. IChO. Upoważniony przez Międzynarodowe Jury Komitet Sterujący przyjął propozycję Pakistanu, aby w 2016 r. Olimpiada odbyła się w Karaczi. Jednak, na podstawie negatywnej rekomendacji naszego Ministerstwa Spraw Zagranicznych w kwestii jakichkolwiek podróży do Pakistanu i również negatywnej, pisemnej opi-

nii Ministerstwa Edukacji Narodowej, wydanej w trosce o bezpieczeństwo zawodników, Prezydium Komitetu Głównego Olimpiady podjęło w grudniu 2015 r. decyzję o nieuczestniczeniu naszej reprezentacji w 48. IChO.



Fot. 1. Polscy medaliści 47. IChO. Od lewej: Damian Paweł Jędrzejowski (brązowy medal), Karol Jakub Rząd (srebrny medal), Michał Kopyt (złoty medal), Michał Łukasz Gala (srebrny medal).



Fot. 2. Panorama Baku z widokiem na nowoczesne wieżowce w kształcie płomieni.



Fot. 3. Staromiejska część Baku

INFORMACJE REDAKCJI „WIADOMOŚCI CHEMICZNYCH”

CENY PRENUMERATY NA ROK 2016

Redakcja miesięcznika PTChem „Wiadomości Chemiczne” zawiadamia, że wysokość prenumeraty rocznej „Wiadomości Chemicznych” za 2016 r. będzie wynosiła **231 zł** dla instytucji i niezrzeszonych prenumeratorów indywidualnych. Dla członków PTChem **20 zł**. Należność za prenumeratę prosimy przekazywać na konto:

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

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

- prenumerata „Wiadomości Chemicznych” na rok 2016 wraz ze składką członkowską, w ramach której dostarczany jest „Orbital”, wynosi **70 zł** (składka – 50 zł, prenumerata – 20 zł);
- emeryci, doktoranci oraz studenci płacą **35 zł** (składka – 15 zł, prenumerata – 20 zł); a nauczyciele szkół średnich i podstawowych płacą **40 zł** (składka – 20 zł, prenumerata – 20 zł).

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

PTChem Warszawa, ul. Freta 16
Bank BGŻ
54 2030 0045 1110 0000 0261 6290

WYRÓŻNIONE PRACE DOKTORSKIE LUB HABILITACYJNE

Redakcja „Wiadomości Chemicznych” w porozumieniu z Radą Redakcyjną podjęła decyzję o utworzeniu nowego działu, zatytułowanego „Wyróżnione prace doktorskie i habilitacyjne”. Redakcja przyjmuje do publikacji artykuły oparte na pracach doktorskich lub habilitacyjnych, które zostały wyróżnione przez Rady Wydziałów, przed którymi toczyły się odpowiednie procesy.

Objętość prac nie powinna przekraczać piętnastu stron maszynopisu. Artykuły powinny zawierać: przedstawienie doniosłości podjętej tematyki badawczej, cel rozprawy doktorskiej lub habilitacyjnej oraz w miarę zwięzły opis uzyskanych wyników przedstawiony w możliwie przystępny sposób a także wnioski końcowe.

W notce biograficznej autora poza standardowymi informacjami powinny zostać zamieszczone następujące dane: termin obrony pracy doktorskiej lub kolokwium habilitacyjnego, Rada Wydziału, przed którą toczył się przewód, nazwisko promotora (dotyczy rozpraw doktorskich) oraz nazwiska recenzentów.

Serdecznie zapraszamy doktorów habilitowanych oraz doktorów, których prace zostały wyróżnione w ciągu ostatniego roku do nadsyłania swoich prac.

PODZIĘKOWANIA ZA OKAZANĄ POMOC I WSPARCIE FINANSOWE UDZIELONE „WIADOMOŚCIOM CHEMICZNYM” W ROKU 2015

W imieniu Komitetu Redakcyjnego „*Wiadomości Chemicznych*” składam serdeczne podziękowania za okazaną pomoc i wsparcie finansowe udzielone w roku 2015. Podziękowania kieruję do:

- prof. dra hab. inż. Andrzeja Trochimczuka, Dziekana Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej,
- prof. dra hab. Adama Jezierskiego, Prorektora Uniwersytetu Wrocławskiego,
- prof. dra hab. Andrzeja Jeżowskiego, Dyrektora Instytutu Niskich Temperatur i Badań Strukturalnych PAN we Wrocławiu,
- prof. dra hab. Pawła Kuleszy, Dzekana Wydziału Chemiii Uniwersytetu Warszawskiego,
- prof. dra hab. Anny Trzeciak, Dziekan Wydziału Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego.

Jednocześnie apeluję do Dziekanów wydziałów chemicznych wyższych uczelni oraz Kierowników innych jednostek chemicznych o wsparcie finansowe naszego czasopisma.

prof. dr hab. Zdzisław Latajka
Redaktor Naczelny

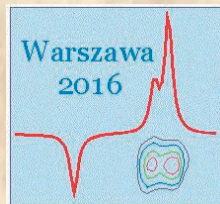


Instytut Chemii Organicznej
Polskiej Akademii Nauk

Autor zdjęcia: Arkadiusz Ziółek, Warszawa

28-30 września 2016, Warszawa

**IX Sympozjum:
NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE
IN CHEMISTRY, PHYSICS
AND BIOLOGICAL SCIENCES**



informacje: <http://www.icho.edu.pl/SympNMR2016/home.html>
kontakt: ichokmrj@icho.edu.pl

Zaproszenie do wygłoszenia wykładu plenarnego przyjęli dotychczas:

Prof. Gerd Buntkowsky (*Technical University of Darmstadt, Germany*)

Prof. Lorenzo Di Bari (*University of Pisa, Italy*)

Prof. Marco Geppi (*University of Pisa, Italy*)

Prof. Karol Jackowski (*University of Warsaw, Poland*)

Prof. Leszek Królicki (*Medical University of Warsaw, Poland*)

Prof. Zdzisław Lalowicz (*Institute of Nuclear Physics PAS, Kraków, Poland*)

Prof. Radek Marek (*Masaryk University, Brno, Czech Republic*)

Dr. Michal Repisky (*University of Tromsø, Norway*)

Ważne daty:

Rejestracja.....15.07.2016

Oplata.....30.07.2016

Abstrakty.....26.08.2016

Do udziału w Sympozjum zapraszamy nie tylko specjalistów z dziedziny magnetycznego rezonansu jądrowego, ale wszystkich naukowców wykorzystujących tę metodę w swoich badaniach.

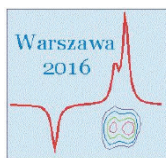


**IXth Symposium: „Nuclear Magnetic Resonance in
Chemistry, Physics and Biological Sciences”**

Warszawa, September 28th–30th, 2016

Organizer: Institute of Organic Chemistry, Polish Academy of Sciences, Warszawa

The aim of the Symposium is to provide a forum for discussion among NMR spectroscopists working in chemistry, physics, biology, medicine and related fields of research. The programme will cover all areas of nuclear magnetic resonance, including novel experimental applications as well as theoretical approaches to determine the structure, structure–function relationships and other properties of organic and bioorganic systems.



Info: dr Marta Bugaj-Zarebska (secretary)
Institute of Organic Chemistry PAS
Kasprzaka 44/52, 01-224 Warsaw, Poland
phone: +48 22 343 20 14
fax +48 22 632 66 81
e-mail: ichokmrj@icho.edu.pl
Home page: <http://www.icho.edu.pl/SympNMR2016/home.html>

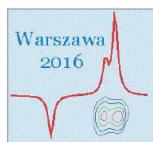


**IX Sympozjum: „Nuclear Magnetic Resonance
in Chemistry, Physics and Biological Sciences”**

Warszawa, 28–30 września 2016

Organizator: Instytut Chemii Organicznej Polskiej Akademii Nauk, Warszawa

Interdyscyplinarne Sympozjum o zasięgu międzynarodowym. Program naukowy konferencji obejmuje badania strukturalne związków chemicznych, badanie zależności struktury i funkcji układów o znaczeniu biologicznym, zastosowanie nowoczesnych technik eksperymentalnych MRJ w chemii, fizyce, naukach biologicznych i medycynie.



Info: dr Marta Bugaj-Zarębska (sekretarz)

Instytut Chemii Organicznej PAN

ul. Kasprzaka 44/52, 01-224 Warszawa

tel. (22) 343 20 14

fax (22) 632 66 81

e-mail: ichokmrj@icho.edu.pl

Strona domowa Sympozjum: <http://www.icho.edu.pl/SympNMR2016/home.html>



X Kopernikańskie Seminarium Doktoranckie

21 - 24 czerwca 2016, Bachotek k. Brodnicy



Serdecznie zapraszamy Doktorantów oraz Młodych Doktorów do wzięcia udziału w

X Kopernikańskim Seminarium Doktoranckim,

które odbędzie się w dniach 21–24 czerwca 2016 roku w Ośrodku Konferencyjno-Wypoczynkowy Bachotek k. Brodnicy. Organizatorem seminarium jest Wydział Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu.

Konferencja jest skierowana do doktorantów i młodych doktorów reprezentujących uczelnie wyższe z całej Polski, realizujących swoje badania w zakresie nauk chemicznych, biologicznych i medycznych, a także fizycznych i technicznych. Zamierzeniem Seminarium jest utworzenie platformy wymiany wiedzy i doświadczeń naukowych oraz nawiązanie kontaktów i zapoczątkowanie współpracy międzyuczelnianej już na początku kariery naukowej. Na najlepszych czekają nagrody. W programie oprócz sesji naukowych mamy do zaoferowania wiele atrakcyjnych imprez towarzyszących.

Zapraszamy do odwiedzenia strony internetowej konferencji www.ksd.umk.pl i kontaktu za pośrednictwem poczty elektronicznej: ksd@chem.umk.pl.

Zachęcamy do uczestnictwa i liczymy na Państwa obecność.

Łączymy pozdrowienia
Komitet Organizacyjny X KSD

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Chemia koordynacyjna w Polsce. Część I. Nakład wyczerpany, dostępna wersja elektroniczna.

Chemia koordynacyjna w Polsce. Część II. Nakład wyczerpany, dostępna wersja elektroniczna

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

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

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

REGULAMIN I INFORMACJE DLA AUTORÓW PUBLIKUJĄCYCH W CZASOPIŚMIE „WIADOMOŚCI CHEMICZNE”

1. Informacje ogólne

„Wiadomości Chemiczne” są recenzowanym czasopismem naukowym Polskiego Towarzystwa Chemicznego, które publikuje przede wszystkim artykuły przeglądowe. Ponadto publikowane są tutaj inne **wartościowe** materiały o charakterze edukacyjno-informacyjnym takie jak: artykuły oparte na pracach doktorskich lub habilitacyjnych, które zostały wyróżnione przez Rady Wydziałów, przed którymi toczyły się odpowiednie procesy; materiały informacyjne na temat uczonych oraz jednostek naukowych/firm chemicznych lub pokrewnych chemii; materiały o aktualnych osiągnięciach w szeroko pojętych naukach chemicznych.

Dodatkową ofertę Wydawnictwa stanowią dwie odrębne serie, „Biblioteka Wiadomości Chemicznych” oraz seria „Habilitacje”. W serii „Biblioteka Wiadomości Chemicznych” publikowane są dłuższe artykuły przeglądowe lub monografie poświęcone ważnym i aktualnym problemom współczesnej chemii, w ramach serii wydawniczej pod nazwą „Habilitacje” mogą być publikowane prace habilitacyjne z obszaru chemii. Zważywszy, że zgodnie z ustawą, dopuszczalne jest przedstawianie rozpraw habilitacyjnych albo w formie monografii, albo w formie pliku powiązanych publikacji, poprzedzonych omówieniem w języku polskim (tzw. autoreferatem), Redakcja przewiduje drukowanie obydwu tych wariantów. Autorzy, którzy chcieliby takie prace napisać, powinni wcześniej skontaktować się z Redakcją, a następnie przesłać wstępnie przygotowaną publikację (redagowaną na wzór artykułów w czasopiśmie „Wiadomości Chemicznych”) lub informację na temat przygotowywanej pracy – tytuł przygotowywanej publikacji, przybliżoną liczbę stron, tabel, rysunków. W chwili obecnej Redakcja nie posiada środków na finansowanie prac w serii „Biblioteka Wiadomości Chemicznych” oraz serii „Habilitacje”. W zależności od sytuacji finansowej Wydawnictwa, Redakcja zastrzega sobie prawo negocjacji kosztów druku z autorami lub Instytucjami zlecającymi druk.

„Wiadomości Chemiczne” wydawane są zarówno w wersji drukowanej jak i elektronicznej. Wersja elektroniczna udostępniana jest bezpłatnie w Internecie.

Czasopismo jest indeksowane/abstraktowane w kilku bazach danych: Chemical Abstracts, Polska Bibliografia Naukowa, BazTech, Polska Bibliografia Lekarska, Index Copernicus, Baza ARIANTA.

2. Informacje dla autorów na temat wymagań i zasad publikowania prac

- Prace nie były wcześniej publikowane, ani nie są złożone w redakcji innego czasopisma.
- Autorzy prac stosują się do wymagań praw autorskich tzn. w przypadku zamieszczania rysunków, tabel itp., pochodzących z opracowań opublikowanych w innych czasopismach lub publikacjach zwartych, posiadają pisemną zgodę na ich przedruk.
- Opublikowana raz praca bez zgody Redakcji, nie może być wydawana gdzie indziej.
- Autorzy przysyłający prace po raz pierwszy powinni podać swój numer telefonu oraz adresy poczty tradycyjnej i elektronicznej. Jest to niezbędny warunek sprawnego przebiegu opracowania redakcyjnego tekstu.
- Autorzy zobowiązani są do wykonania korekty tekstu. W pracach przyjętych do druku Redakcja ma prawo dokonywania niezbędnej korekty.
- Jeżeli autorzy nie zastrzegą inaczej w momencie zgłoszenia pracy, wydawca nabywa ogólnych praw autorskich do wydrukowanych prac (w tym prawo wydawania na nośnikach elektronicznych oraz w Internecie). Tytułem powyższego wykorzystania utworów autorom nie są wypłacane honoraria.
- Wszystkie nadsyłane prace są poddawane wstępnej ocenie, która określa czy odpowiadają randze i profilowi „Wiadomości Chemicznych” oraz czy zostały przygotowane zgodnie z formalnymi wymogami MNiSW oraz Redakcji.
- Po uzyskaniu pozytywnej wstępnej oceny wszystkie prace są recenzowane przez co najmniej dwóch niezależnych recenzentów, zgodnie ze wskazówkami zawartymi w broszurze informacyjnej Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego, http://www.nauka.gov.pl/fileadmin/user_upload/ministerstwo/Publikacje/201110216_MNISW_broszura_210x210.pdf.
- O przyjęciu pracy do druku decyduje Komitet Redakcyjny.
- Prace, które Komitet Redakcyjny na podstawie uzyskanych recenzji stwierdził, że nie należy przyjąć do druku w czasopiśmie, po uwzględnieniu sugestii recenzentów mogą być powtórnie przesłane do czasopisma. W takim przypadku praca traktowana jest jako nowy tekst i ponownie przechodzi pełną procedurę recenzowania.
- Ponadto Komitet Redakcyjny informuje, że tzw. „ghostwiting” (ktoś wniósł znaczący wkład w powstanie publikacji, a nie został przedstawiony jako współautor lub też nie został wymieniony w podziękowaniu zamieszczonym w publikacji) lub „guest authorship” (udział autora jest znikomy lub też w ogóle nie miał

miejsca, a mimo to jest współautorem publikacji) są przejawem nierzetelności naukowej. Wszelkie przejawy nierzetelności naukowej, łamanie i naruszanie zasad etyki obowiązującej w nauce będą ujawniane, włącznie z powiadomieniem jednostek zatrudniających autorów.

- Autorzy mają prawo do zaproponowania co najmniej trzech niezależnych recenzentów, jednak ostateczny wybór anonimowych recenzentów dokonuje Redakcja.

3. Koszty

Autorzy czasami mogą ponosić częściowe koszty wydania swoich artykułów. Tak jest w przypadku tzw. **stron nadliczbowych** tj. powyżej 25 stron. Za każdą rozpoczętą nadliczbową stroną jest naliczana opłata w wysokości około 50 zł. Najczęściej kwota ta pokrywana jest z funduszy pozyskiwanych przez Autorów lub przez Wydziały które wspomagają wydawanie „Wiadomości Chemicznych”. Niezależnie od rodzaju pracy opłata pobierana jest również **za strony drukowane w kolorze** (zgodnie z faktycznym kosztem druku).

Redakcja zastrzega sobie możliwość zmiany wysokości opłat, w zależności od wielkości dofinansowania z MNiSW oraz wypracowanych środków własnych. Faktura wystawiana jest po ukazaniu się pracy.

W przypadku prac w serii „Biblioteka Wiadomości Chemicznych” oraz „Habilitatione”, Redakcja nie posiada środków na finansowanie i zastrzega sobie prawo negocjacji kosztów druku z autorami lub Instytucjami zlecającymi druk.

4. Informacje szczegółowe dotyczące przygotowania maszynopisu do druku

4.1. Wymagania merytoryczne

Tekst należy napisać zwięźle, prostym stylem, według zasad pisowni polskiej, z zachowaniem poprawnego i obowiązującego nazewnictwa fachowego. Nie należy zamieszczać nadmiaru szczegółów odsyłając Czytelnika do piśmiennictwa oryginalnego, które to powinno uwzględniać najnowsze informacje, dotyczące napisanej pracy. Literaturę należy cytować ze źródeł oryginalnych.

4.2. Wymagania techniczne składu tekstu

- W przypadku prac współfinansowanych przez autorów, liczba stron oraz forma kolorystyczna manuskryptu nie jest ograniczona (wymagane jest wcześniejsze uzgodnienie z Redakcją).
- Maszynopisy prac autorów którzy nie chcą ponosić dodatkowych kosztów, nie powinny przekraczać 25 stron całej pracy (po wydruku w czasopiśmie) oraz drukowane będą w wersji czarno białej.
- Główny tekst nadsyłanych prac powinien być napisany w edytorze Word, czcionką Times New Roman, 12p z zachowaniem interlinii 1,5 oraz z 5 cm marginesem z prawej strony. Przy podziale tekstu należy stosować numerację cyfrową wielorzędową. Numerujemy tylko tytuły rozdziałów, **nie numerujemy działów**: Abstract, Wykaz stosowanych skrótów, Wprowadzenie, Uwagi końcowe, Podziękowanie, Piśmiennictwo cytowane. Jednolity sposób numeracji konsekwentnie stosuje się wewnątrz tekstu (w całym tekście tj. zarówno przy numerowaniu rozdziałów, przy przytaczaniu piśmiennictwa cytowanego oraz odwoływaniu się do tabel rysunków itp., **nie należy stosować odsyłaczy hipertekstowych**).
- Tekst powinien być napisany poprawnym językiem, wszystkie skróty muszą być wyjaśnione, oznaczenia i jednostki miar należy podawać według układu SI, pozycje cytowanej literatury należy oznaczać numerami umieszczonymi w nawiasach kwadratowych, w kolejności cytowania wg wzorów [1, 5, 7] (dla prac 1, 5 i 7) lub [1-5, 7] (dla prac od 1 do 5 oraz pracy 7).
- Jeśli w artykułach znajdują się przedruki rysunków, czy innych elementów prac cudzych, w opisach (polskich i angielskich) należy zamieścić stosowną informację.
- Zaleca się umieszczać w tekście pracy rysunki, tabele oraz podpisy (jeśli są przygotowane w edytorze Word), jednak w przypadku plików o bardzo dużych rozmiarach należy zaznaczyć miejsca na ich umieszczenie (zob. Pliki jakie należy przekazać do Redakcji).
- **Pierwsza strona pracy powinna zawierać kolejno:**
 - tytuł pracy w języku polskim (Times New Roman, 14 p, pogrubiony, WERSALIKI), i angielskim (Times New Roman, 14 p, WERSALIKI),
 - pełne imię i nazwisko autora (autorów) pracy (Times New Roman, 15p, pogrubione),
 - pełne nazwy ośrodków przypisane do autorów pracy (wraz z adresem ośrodka i adresem e-mail autora korespondującego (Times New Roman, 10,5, kursywa),
 - spis treści pracy z zastosowaniem następującego podziału:

Abstract

Wykaz stosowanych symboli i oznaczeń

Wprowadzenie

1. Tytuł rozdziału

1.1. Tytuł podrozdziału itp.

Uwagi końcowe

Podziękowanie

Piśmiennictwo cytowane

• **Kolejne strony pracy powinny zawierać:**

- **notki o autorach** pracy wraz z tytułami naukowymi (można dołączyć osobno pliki z fotografiami autorów (zob. **Pliki jakie należy przekazać do Redakcji**),
- **obszerne streszczenie pracy w języku angielskim** (od 1800 do 2700 znaków ze spacjami) z uwzględnieniem cytowanego piśmiennictwa oraz odsyłaczami do tabel, rysunków zamieszczonych w tekście (Rys. 1, Tab. 1-2, Schemat 1) oraz **słowa kluczowe** – nie więcej niż 6, uzyskane najlepiej z bazy haseł przedmiotowych podawane w języku angielskim i polskim,
- **wykaz stosowanych skrótów** – w przypadku niewielkiej liczby skrótów lub akronimów nie jest konieczne zamieszczanie tej pozycji, wówczas, skróty wyjaśniamy w tekście przy pierwszym użyciu. Angielskie skróty należy podać i wyjaśnić wg poniżej podanego wzoru lub w oparciu o inne prace zamieszczone w „Wiadomościach Chemicznych”. Przykład: dla skrótu SSRI – selektywne inhibitory zwrotnego wychwytu serotoniny (ang. *Selective Serotonin Reuptake Inhibitor*),
- **dalszy tekst pracy zgodny z podawanym wcześniej pisem treści.**

• **Tabele, rysunki, fotografie**

Tabele i rysunki **powinny być zamieszczone w przesyłanym tekście** oraz dodatkowo (po zatwierdzeniu pracy do druku, na etapie przygotowywania szczołki) dołączone w postaci osobnych plików zapisanych w formacie pdf, doc, jpg, tiff.

Tabele i rysunki powinny być przejrzyste, zawierać informacje niezbędne do zrozumienia treści, bez konieczności poszukiwania objaśnień w tekście pracy, należy je numerować cyframi arabskimi oraz podać tytuł (polski/angielski, nad tabelą, pod rysunkiem, Times New Roman, 10 p).

Wszystkie fotografie – należy przesłać w postaci plików zapisanych w formacie tif, jpg lub podobnym, **każdą zapisać w oddzielnym pliku o rozdzielczości co najmniej 300 dpi.**

• **Piśmiennictwo cytowane**

Piśmiennictwo należy zestawić numerycznie według kolejności cytowania w tekście, należy cytować wyłącznie pozycje istotne dla treści pracy w sposób precyzyjny.

W przypadku **artykułów z czasopism tradycyjnych**, opis powinien zawierać kolejno następujące elementy: inicjały imion i nazwisko autora (autorów), skrót tytułu czasopisma zgodny z przyjętymi normami, rok wydania, **numer wolumenu zaznaczony pogrubioną czcionką**, numer pierwszej strony cytowanej pracy, np.

[1] J. Kowalski, Wiad.Chem., 2007, **61**, 473.

[2] W. Kowalski, A. Nowak, Przem. Spoż. 2010, **51**, 3.

W przypadku **książek** najprostszy opis powinien zawierać: inicjały imion i nazwisko autora (autorów), tytuł książki, nazwę wydawcy, miejsce wydania, rok wydania, np.

[1] J. Malinowski, Tytuł książki, PWN, Warszawa, 2004.

[2] W. Kowalski, Tytuł książki, Volumed, Wrocław, 1999

W przypadku zasobów Internetowych najprostszy opis powinien zawierać: inicjały imion i nazwisko autora (autorów), tytuł (artykułu) dokumentu online, [dostęp], wydawca, [data dostępu]. Warunki dostępu, np.

[7] J. Kowalski, Tytuł artykułu. [online], wydawca, [dostęp: 2010-05-20]. Dostępny w Internecie: <http://www.....>

4.3. Materiały jakie należy przygotować w celu przesłania pracy do Redakcji

Przed podjęciem decyzji o zakwalifikowaniu pracy do druku w celu oceny merytorycznej należy przesłać **jeden** plik kompletnej pracy zredagowany zgodnie z wymaganiami Redakcji.

Po uzyskaniu pozytywnej recenzji i po ustosunkowaniu się do uwag Recenzenta oraz Redakcji należy przesłać ostateczną wersję pracy w następującej postaci:

- 1 plik tekstu zredagowany zgodnie z wymaganiami Redakcji;
- 1 plik zawierający krótkie notki biograficzne o autorach nadesłanej pracy (każda notka do 150 wyrazów powinna zawierać: tytuł naukowy, miejsce pracy oraz inne ważne informacje o autorze);
- pliki zawierające zdjęcia portretowe autorów, w nazwie powinny wskazywać autora, którego zdjęcie dotyczy (dobrowolne, przesłanie plików jest jednoznaczne ze zgodą na jego opublikowanie);
- 1 plik zawierający: stronę tytułową, streszczenie (abstrakt), słowa kluczowe, podpisy pod rysunki, tabele, schematy (wszystko w obu wersjach językowych); jeśli zachodzi potrzeba to również oddzielne pliki z rysunkami, schematami, tabelami (zob. Tabele, rysunki, fotografie).

Prace nie odpowiadające wyżej wymienionym wymaganiom nie będą przyjmowane do druku. Redakcja zastrzega sobie prawo dokonywania poprawek stylistycznych i skrótów. Autorzy są zobowiązani do wykonania korekty artykułu i jego zwrotu do Redakcji w ciągu kilku dni od otrzymania.

Na etapie przygotowania szczytki, w przypadku przesyłania prac z kolorowymi stronami prosimy o zaznaczenie stron, które w formie druku mają być kolorowe. Brak tej czynności będzie skutkowało **czarno-białym wydrukiem wersji papierowej**. W przypadku zmian w wersji drukowanej kolorowych rysunków na czarno-białe, prosimy o przesłanie dostosowanych do tego celu rysunków.

Prace prosimy przysyłać pocztą elektroniczną na adres: *beata.swiatek-tran@chem.uni.wroc.pl* lub *wchem@chem.uni.wroc.pl*, zaś dokumenty wymagające podpisów autorów (np. list intencyjny, oświadczenia autorów, kopie zgody na przedruk potwierdzone za zgodność z oryginałem) pocztą tradycyjną na adres Redakcji.

Redakcja „Wiadomości Chemicznych”

SPIS TREŚCI

Beata BUSIAK, Greta UTECHT, Marcin JASIŃSKI: Anion alkoksyalenowy w syntezie związków naturalnych i ich analogów	3
Adrian Krzysztof ANTOSIK, Zbigniew CZECH: Sieciowanie samoprzylepnych klejów silikonowych .	25
Paulina PŁOSZAJ, Agnieszka PRWOWAR, Stanisław RYNG: Najnowsze kierunki poszukiwań cząsteczek o aktywności przeciwprątkowej	35
Renata JASTRZĄB, Bartosz TYLKOWSKI: Aminy biogenne w aspekcie ich roli w organizmach żywych	57
Katarzyna KLIMASZ, Przemysław J. TOMASIK: Kamienie miłowe w chemii klinicznej	81
Karol BAŁ, Zbigniew MIELNICZUK: Spektrometria mas w badaniach skażeń mikrobiologicznych środowiska. część II. Kwasy 3-hydroksytluszczowe jako biomarkery lipopolisacharydów (endotoksyn) ścian komórkowych bakterii gramujemnych	95
Informacje	119

W NASTĘPNYCH ZESZYTACH UKAZĄ SIĘ:

- Mariusz ŁUKASZEWSKI, Michał GRDEŃ: Badanie elektrochemicznej absorpcji wodoru w palladzie i jego stopach przy użyciu elektrod o ograniczonej objętości
- Adrian Krzysztof ANTOSIK, Zbigniew CZECH: Sieciowanie samoprzylepnych klejów silikonowych