

WIADOMOŚCI *chemiczne*



2017

(71)

1-2

(835-836)



CZASOPISMO POLSKIEGO TOWARZYSTWA CHEMICZNEGO

Publikacja dotowana przez MNiSW

RADA REDAKCYJNA

RYSZARD ADAMIAK, IRENA BARANOWSKA, ANDRZEJ BARAŃSKI,
BOGUSŁAW BUSZEWSKI (PRZEWODNICZĄCY), TADEUSZ GORECKI,
MIĘTEK JARONIEC, ANATOL KOJŁO, TADEUSZ M. KRYGOWSKI,
JERZY LESZCZYNSKI, KRZYSZTOF MATYJASZEWSKI, PIOTR PANETH,
JANUSZ PAWLISZYN, K. MICHAŁ PIETRUSEWICZ, DARIUSZ POGOCKI,
MAREK POTRZEBOWSKI, SŁAWOMIR RUBINSZTAJN, GRZEGORZ SCHROEDER,
ANDRZEJ W. SOKALSKI, ARTUR P. TERZYK

KOMITET REDAKCYJNY

MARCIN DRĄG, ADAM JEZIERSKI, LESZEK KĘPIŃSKI,
LUDWIK KOMOROWSKI, WITOLD RYBA-ROMANOWSKI, SŁAWOMIR SZAFERT,
ANDRZEJ TROCHIMCZUK, KAZIMIERA WILK

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://wwwdbc.wroc.pl> (pełne teksty publikacji od roku 2006)

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

© Copyright by Redakcja „Wiadomości Chemicznych”, Wrocław 2017
pISSN 0043-5104
eISSN 2300-0295

Maszynopis niniejszego numeru przekazano Wydawcy w lutym 2017

Przygotowanie do druku i druk:
Firma Wydawnicza K2, e-mail: k2@druk-k2.pl

70-LECIE „WIADOMOŚCI CHEMICZNYCH”

Rok 2017 jest niezwykle ważny dla naszego czasopisma. Pierwszy zeszyt „Wiadomości Chemicznych” ukazał się 8 lutego 1947 roku, jako czasopismo naukowe Studenckich Kół Naukowych. Od 1950 roku jest czasopismem Polskiego Towarzystwa Chemicznego. Oznacza to, że w 2017 roku „Wiadomości Chemiczne” obchodzi jubileusz 70-lecia.

Z tej okazji chcemy wydać specjalny, jubileuszowy zeszyt naszego czasopisma. Dlatego zwracam się do naszych czytelników, sympatyków, przyjaciół o przesyłanie na nasz adres wspomnień oraz zdjęć związanych z historią czasopisma. Preferujemy wersje elektroniczne, ale będziemy również wdzięczni za przesłanie wersji papierowych, które po przeniesieniu na nośniki elektroniczne zostaną odesłane Autorom.

*prof. dr hab. Zdzisław Latajka
(Redaktor Naczelny Wiadomości Chemicznych)*

ANTYOKSYDACYJNE WŁAŚCIWOŚCI I PRZECIWMIĘDŻYCOWE DZIAŁANIE PARAOXONAZY 1

ANTIOXIDANT AND ANTIATHEROSCLEROTIC PROPERTIES OF PARAOXONASE 1

Daria Kupczyk^{*1}, Aleksandra Karczmarska-Wódzka^{*2},
Renata Studzińska³, Joanna Sikora²

¹ Katedra i Zakład Biochemii
Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Collegium Medicum,
ul. Karłowicza 24, 85-092 Bydgoszcz

*e-mail: dariak@cm.umk.pl

² Katedra Farmakologii i Terapii,
Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Collegium Medicum,
ul. M. Curie Skłodowskiej 9, 85-094 Bydgoszcz

*e-mail: akar@cm.umk.pl

³ Katedra i Zakład Chemii Organicznej
Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Collegium Medicum Bydgoszcz

* Daria Kupczyk i Aleksandra Karczmarska-Wódzka w jednakowym stopniu
przyczyniły się do niniejszego opracowania i powinny być uważane
za pierwszych autorów

Abstract

Wprowadzenie

1. Równowaga oksydacyjno-redukcyjna
2. Przeciwmiędżycowe działanie paraoksonazy 1
3. Rola paraoksonazy 1 w organizmie człowieka

Uwagi końcowe

Piśmiennictwo cytowane

Dr Daria Kupczyk, asystent Katedry i Zakładu Biochemii Collegium Medicum w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. Zainteresowania naukowe Autorki obejmują badania nad problematyką stresu oksydacyjnego w patofizjologii wybranych jednostek chorobowych.

Dr Aleksandra Karczmarska-Wódzka, adiunkt w Pracowni Biotechnologii Katedry Farmakologii i Terapii Collegium Medicum w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. Zainteresowania naukowe Autorki obejmują badania w obrębie oceny funkcji płytek krwi i stresu oksydacyjnego w chorobach układu sercowo-naczyniowego.

Dr Renata Studzińska, pracownik Katedry i Zakładu Chemii Organicznej Collegium Medicum w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. Zainteresowania naukowe Autorki związane są z badaniami nad syntezą zmodyfikowanych analogów nukleozydów pirymidynowych.

Dr Joanna Sikora, Kierownik Pracowni Biotechnologii w Katedrze Farmakologii i Terapii Collegium Medicum w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. Zainteresowania naukowe Autorki obejmują badania nad hemostazą i układem krzepnięcia w chorobach układu sercowo-naczyniowego.

ABSTRACT

This overview will discuss the Paraoxonase 1 (PON1) in arteriosclerosis diseases. Atherosclerosis is one of lifestyle diseases and affects greater number of people. Ischemic heart disease, acute coronary syndromes or stroke are the clinical symptoms of atherosclerosis and are the most common cause of morbidity especially in middle and old age people. In atherosclerosis, in the space between the endothelium and the muscular layer in the wall of a blood vessel, accumulates deposits consisting of macrophages, lipoprotein, low density foam cells and extracellular concentrations of cholesterol. In this way fatty streaks are formed which are early stage atherosclerotic lesions. With the passage of time they are joined by elements of fibrous connective tissue that undergo hypertrophy. They begin to surround primarily created the fireplace of inflammation and separate them from the rest of the blood vessel [1].

Further research if needed to better understanding the mechanisms related to atherosclerosis development and plaque instability because it may have important clinical implications for the identification of high-risk patients. The present review tries to summarize the current knowledge on the role of PON1 in the formation of atherosclerotic plaque is the goal of current research [2].

Keywords: paraoxonase 1, oxidative stress, atherosclerosis

Słowa kluczowe: paraoksonaza 1, stres oksydacyjny, miażdżyca

WPROWADZENIE

Miażdzyca tętnic jest obecnie jedną z chorób cywilizacyjnych i dotyczy coraz większą liczbę osób. Prowadzi ona do znaczących komplikacji. Choroba wieńcowa, zawał czy udar należą do klinicznych objawów procesu miażdżycowego i stanowią najczęstszą przyczynę zachorowalności i śmiertelności w krajach cywilizacji zachodniej, zwłaszcza u osób w średnim i starszym wieku. W miażdżycy, w przestrzeni pomiędzy śródblekiem i warstwą mięśniową naczynia, dochodzi do gromadzenia złogów składających się z makrofagów, lipoprotein o małej gęstości, komórek piankowatych oraz pozakomórkowych skupisk cholesterolu. W ten sposób powstają pasma tłuszczowe, będące wczesną postacią zmian miażdżycowych. Z upływem czasu dołączają do nich elementy włókniste tkanki łącznej, które łączą się z resztą naczynia. Tak zaawansowana zmiana jest określana terminem „blaszka miażdżycowa” (Schemat 1).



Schemat 1. Rozwój blaszki miażdżycowej
Scheme 1. Atherosclerosis plaque formation

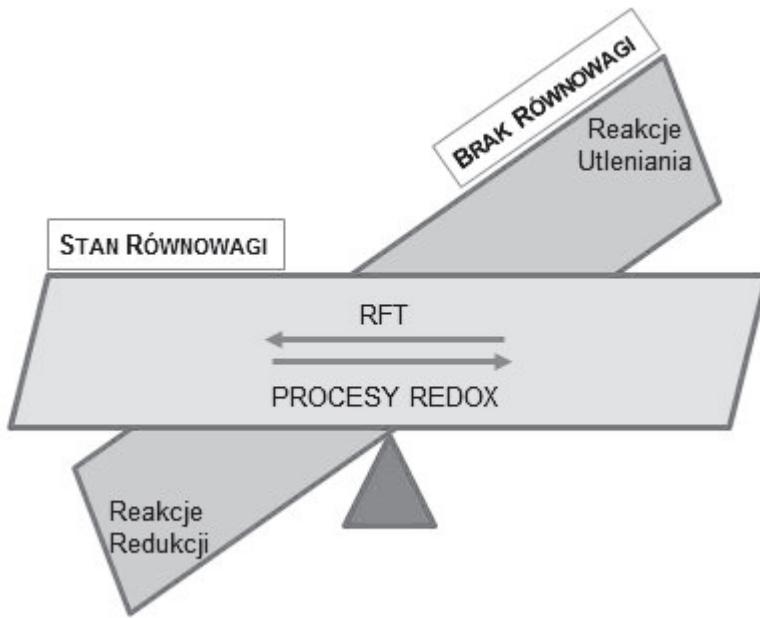
Dlatego ważne jest rozpoznanie wszystkich czynników wpływających na rozwój tej choroby w celu ustalenia możliwie najszybszej diagnostyki oraz wdrożenia odpowiedniej terapii w chorobach układu sercowo-naczyniowego [1]. Udowodniona zależność pomiędzy stężeniem reaktywnych form tlenu (RFT) a aktywnością paraoksonazy 1 (PON1) oraz wykazanie roli tego enzymu w powstawaniu blaszki miażdżycowej jest przedmiotem badań w ostatnich latach. [2].

1. RÓWNOWAGA OKSYDACYJNO-REDUKCYJNA

Analizując mechanizm powstawania miażdżycy oraz działanie PON1 dochodzimy do wniosku, że obniżenie stężenia PON1 wiąże się ściśle ze zwiększoną ryzykiem szybkiego rozwoju miażdżycy, a w konsekwencji może doprowadzić do wystąpienia zawału serca czy innych incydentów kardiologicznych.

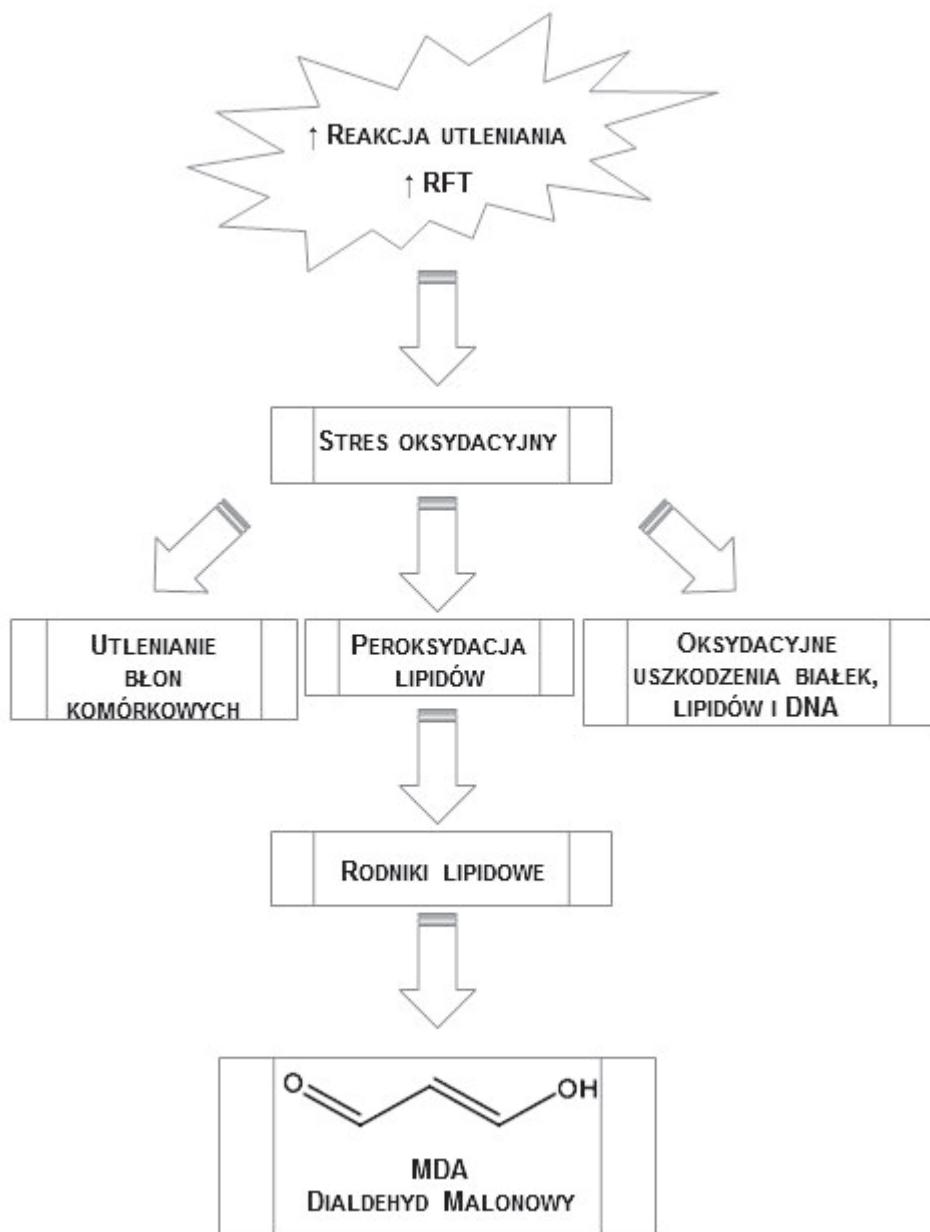
Równowaga oksydacyjno-antyoksydacyjna zapewnia prawidłową homeostazę organizmu (Schemat 2). Wówczas szybkość oraz ilość powstających reaktywnych form tlenu pozostaje w równowadze z ich usuwaniem czy neutralizowaniem przez

systemy i mechanizmy antyoksydacyjne. Jednak zaburzenie tej równowagi skutkuje nadprodukcją reaktywnych form tlenu, przewagą reakcji utleniania i rozwojem stanu określonego mianem stresu oksydacyjnego [3].



Schemat 2. Równowaga redox
Scheme 2. Redox equilibrium

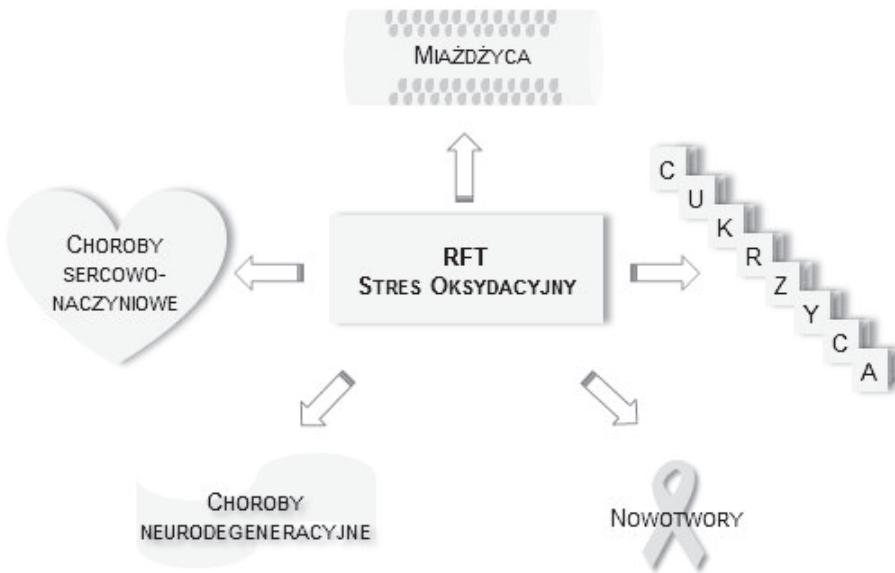
Skutkiem działania stresu oksydacyjnego jest utlenianie błon komórkowych, zmiana struktury i funkcji białek oraz uszkadzanie DNA [4]. W wyniku stresu oksydacyjnego dochodzi także do peroksydacji lipidów. Jest to proces utleniania nienasyconych kwasów tłuszczywych, które wchodzą w skład fosfolipidów, co w konsekwencji prowadzi do powstania nadtlenków tych związków. Głównym produktem peroksydacji lipidów jest dialdehyd malonowy (ang. malondialdehyde, MDA) (Schemat 3). W warunkach zwiększonego wytwarzania RFT stężenie tego związku wzrasta, powodując zmianę przepuszczalności błony komórkowej [5].



Schemat 3. Skutki działania stresu oksydacyjnego

Scheme 3. Effects of oxidative stress

Działanie RFT oraz przewlekły stres oksydacyjny mogą być przyczyną rozwoju nie tylko miażdżycy, ale także m.in. chorób układu krążenia, cukrzycy, chorób neurodegeneracyjnych czy nowotworowych (Schemat 4) [6].



Schemat 4. RFT - przykłady jednostek chorobowych

Scheme 4. ROS - the common diseases

2. PRZECIWMAJDŻYCOWE DZIAŁANIE PARAOKSONAZY 1

Kluczową rolę w patogenezie chorób układu krążenia odgrywa proces miażdżycowy, a jednym z najważniejszych mechanizmów odpowiedzialnych za jego rozwój jest oksydacyjna przemiana lipoprotein. W wyniku tego procesu dochodzi do powstawania nadtlenków lipidów. Następnie w procesie fagocytozy utlenionych cząsteczek lipoprotein powstają komórki piankowe, prowadząc do rozwoju zmian miażdżycowych [7]. Zgodnie z oksydacyjną teorią miażdżycy zakłada się, że modyfikacje lipoprotein o małej gęstości, zwłaszcza LDL (ang. *low-density lipoproteins*), istotnie wpływają na proces aterogenezы [8]. LDL powstają w krążeniu z lipoprotein o bardzo małej gęstości – VLDL (ang. *very low-density lipoproteins*) a ich głównym zadaniem jest dostarczanie cholesterolu do komórek. W wyniku utleniania LDL dochodzi do powstawania różnorakich fragmentów lipidowych oraz białkowych lipoprotein. Powstałe w ten sposób produkty peroksydacji lipidów mogą tworzyć związki typu zasady Schiffa i modyfikować cząsteczki lipoprotein. W sytuacji, kiedy nie będą one rozpoznawane przez receptor dla LDL, jakim jest apolipoproteina B/E (apoB/E), będzie dochodziło do ciągłego napływu cząsteczek lipoprotein obładowanych lipidami do ściany naczyń. W warunkach prawidłowych apoB/E podlega regulacji na zasadzie „sprzężenia zwrotnego”. Kiedy nie jest on rozpoznawany dochodzi do uruchomienia szlaku „scavenger receptor” i wówczas produkty peroksydacji lipidów modyfikują białkową część LDL

– apolipoproteinę B-100 (apoB-100) w wyniku czego w pierwszym etapie tego procesu dochodzi do powstania utlenionych cząsteczek LDL- oxLDL (ang. *oxidized low-density lipoproteins*). Do produktów peroksydacji lipidów należą dialdehyd malonowy czy 4-hydroksynonenal, które reagują z grupami aminowymi apoB-100 obecnymi w cząsteczkach LDL, prowadząc do powstania wspomnianych wcześniej zasad Schiffa. W kolejnym etapie monocyty ulegają przekształceniu w makrofagi, które po pochłonięciu ogromnych ilości lipidów zamieniane są w komórki piankowe [9]. W ten sposób zostaje zapoczątkowana kaskada procesów prowadzących do powstania blaszki miażdżycowej. Ponadto powstałe komórki piankowe przyczyniają się do aktywacji oksydazy NADPH i nasilenia stresu oksydacyjnego [10]. Natomiast oksydaza NADPH katalizuje przeniesienie elektronów z NADPH na tlen, co prowadzi do powstania anionorodnika ponadtlenkowego i nadtlenku wodoru. Dodatkowo przyczyną nasilenia stresu oksydacyjnego w miażdżycy jest duża koncentracja komórek o charakterze zapalnym.

W zapobieganiu uszkodzeniom wolnorodnikowym ważną rolę pełnią enzymy antyoksydacyjne. Wśród najważniejszych układów antyoksydacyjnych wymieniane są: dysmutazy ponadtlenkowe (SOD), katalaza (CAT), reduktaza (GR), peroksydazy (GPx) i S-transferazy glutationowe (GST). Tworzą one spójny system ochrony antyoksydacyjnej organizmu. Biologiczna rola SOD polega na katalizowaniu reakcji dysmutacji anionorodnika ponadtlenkowego, natomiast GPx bierze udział w redukcji nadtlenku wodoru. Z kolei GR pełni funkcje pomocnicze w stosunku do podstawowych elementów bariery ochronnej. Poprzez redukcję utlenionego glutationu (GSSG) przywraca mu właściwości antyoksydacyjne oraz umożliwia jego ponowny udział w reakcjach, które są katalizowane przez GPx i GST. Biologiczna rola tego ostatniego polega na uczestniczeniu w drugiej fazie detoksykacji ksenobiotyków [11].

Wskazuje się także na udział enzymów, które nie są bezpośrednio zaangażowane w procesy unieszkodliwiania wolnych rodników, ale mogą być pomocne w utrzymywaniu równowagi pomiędzy wytwarzaniem reaktywnych form tlenu a ich unieczynnianiem.

Obecnie podkreśla się coraz większą rolę enzymu- paraoksonazy w organizmie człowieka. Występuje on w trzech izoformach: PON1, PON2 i PON3 [12]. U ludzi są one zlokalizowane obok siebie na chromosomie 7. Geny PON wykazują strukturalną homologię. Różnice w aktywności enzymatycznej oraz lokalizacji w organizmie powodują, że te trzy paraoksonazy pełnią różne funkcje [13]. PON2 jest zlokalizowana w monocytech. PON3, podobnie jak PON1 występuje w strukturze HDL, ale cechuje się niewielką aktywnością. Ostatecznie to sprawia, że najlepiej poznanym dotychczas izoenzymem jest PON1.

W latach 90. po raz pierwszy opisano, że paraoksonaza 1 (PON1) jest enzymem o właściwościach antyoksydacyjnych [14]. Wysunięto wówczas hipotezę, że może być ona odpowiedzialna za ochronę i ograniczenie procesów utleniania LDL, co ma kluczowe znaczenie w patogenezie miażdżycy[1].

Obecnie wiadomo, że PON1 jest glikoproteiną o masie 43–47 kDa, utworzoną z 354 cząsteczek aminokwasów, z których podczas sekrecji i dojrzewania usuwana jest N-terminalna metionina, a pozostała sekwencja sygnałowa jest niezbędna do związania się paraoksonazy 1 z cząstką HDL [15]. W budowie paraoksonazy 1 wyróżnia się 6 walcowatych struktur β -śmigłowych, zaś każdy walec składa się z czterech pasm, które są wzmacnione mostkiem disiarczkowym. W centrum PON1 znajdują się dwa jony wapnia, z których jeden posiada rolę stabilizującą, drugi zaś pełni funkcję jonu katalitycznego [16]. Aktywność PON1 jest uzależniona od polimorfizmu jej genu [12]. Uznaje się, że polimorfizm genu paraoksonazy jest niezależnym czynnikiem miażdżycy. Obecność glutaminy w pozycji 191, tzw. allele Q, zapewnia skutecną ochronę cząsteczkom cholesterolu LDL przed utlenieniem. Tym samym zapewnia funkcję protekcyjną w rozwoju miażdżycy. Dowiedziono, że genotyp PON1 192QQ ma udział w zapobieganiu zmian miażdżycowych. Jest to związane ze znacznym potencjałem hydrolizy utlenionych fosfolipidów. Z kolei obecność w pozycji 191 argininy, tzw. allele R, zwiększa ryzyko rozwoju choroby niedokrwiennej serca i warunkuje słabą detoksyfikację wodoronadtlenków fosfolipidowych [17, 18].

3. ROLA PARAOKSONAZY 1 W ORGANIZMIE CZŁOWIEKA

Paraoksonaza 1 pełni ważną rolę fizjologiczną w organizmie. Bierze udział w hydrolizie tlenowych pochodnych insektycydów fosforoorganicznych, wykazując aktywność paraoksonazową, a także wiązań estrowych w nadtlenkach fosfolipidowych i wodoronadtlenkach estrów cholesterolu. Ponadto rozkłada nadtlenki wodoru, działając wówczas jak peroksydaza [19]. Chroni także białka krwi przed uszkodzeniami jakie powoduje stres oksydacyjny. Paraoksonaza 1 hydroluje także estry aromatycznych kwasów karboksylowych, wykazując aktywność aryloesterazową, cykliczne węglany czy karbaminiany [20].

Obecnie wskazuje się na jej działanie kardioprotekcyjne z uwagi na zdolność do hydrolizy utlenionych lipidów [2, 14, 21, 22]. Właściwości ochronne paraoksonazy 1 zależą od zdolności do hydrolizy utlenionych fosfolipidów i/lub wodorotlenków linoleinianu cholesterolu, które są obecne w oxLDL. W ten sposób paraoksonaza 1 pośrednio hamuje procesy miażdżycorodnego działania oxLDL [2, 21]. PON1 działa ochronnie na błony erytroцитów. Prawdopodobnie hydrolizuje nadtlenki lipidowe do mało reaktywnych alkoholi i kwasu karboksylowego i w ten sposób zapobiega tworzeniu się toksycznych aldehydów [22–24]. Na podstawie przeprowadzonych badań wnioskuje się, że jej niska aktywność w surowicy sprzyja generowaniu reaktywnych form tlenu [23, 25]. Obniżoną aktywność PON1 obserwowano m.in. u palaczy tytoniu, u pacjentów z rodzinną hipercholesterolemią, cukrzycą typu 1 i 2, chorobami sercowo-naczyniowymi czy schorzeniami wątroby i nerek [20, 26]. PON1 jest syntetyzowana przede wszystkim w wątrobie, gdzie ulega sekrecji. Następnie przedostaje się do surowicy i ulega związaniu z HDL (ang.

high-density lipoproteins) za pomocą hydrofobowego końca –N [27]. Lipoproteiny HDL stanowią nośnik dla PON1, która bierze udział w hydrolizie produktów peroksydacji lipidów oraz zapobiega oksydacji cząsteczek LDL. Paraoksonaza 1 umożliwia cząsteczkom HDL zwrotny transport cholesterolu, zapobiegając powstawaniu oxLDL. Przypuszcza się, że duże cząstki HDL charakteryzują się większym działaniem antyaterogennym. Ale to małe cząstki HDL mogą przyjąć większe ilości cholesterolu i wykazują większe działanie antyoksydacyjne. Dodatkowo, w przeprowadzonych badaniach stwierdzono, że aktywność PON1 jest większa na mniejszych cząstках HDL, co zwiększa ich właściwości antyoksydacyjne [16]. W stanach patologii PON1 ulega przeniesieniu z HDL do surowicy ubogiej w lipoproteiny. Postuluje się, że wykazuje ona wówczas słabsze właściwości antyaterogenne. Wykazano, że cząstki HDL pozbawione paraoksonazy 1, czy to w sposób naturalny czy też w wyniku „nokautu genu”, nie są zdolne do hamowania oksydacji cząstek LDL [28]. Natomiast przywrócenie cząstkom HDL paraoksonazy 1 powoduje, że ponownie wykazują one zdolność do ochrony LDL przed procesami utleniania. Na tej podstawie sugeruje się, że aktywność PON1 może być silnie związana z chorobą niedokrwienią serca niż sam polimorfizm tego enzymu. Ochronne działanie PON1 uwarunkowane jest obecnością cysteiny w pozycji 284.

oxLDL biorą udział w tworzeniu komórek piankowatych, destabilizując blaszkę miażdżycową, wykazują działanie prokoagulacyjne i cytotoksyczne, zwiększają ekspresję cząstek adhezyjnych w komórkach śródblonka [29–31]. Dlatego też wskazuje się na dużą rolę PON1 w hamowaniu ich powstawania. W czasie tworzenia i kumulacji oxLDL paraoksonaza 1 ulega inaktywacji. Jest to spowodowane zmniejszeniem liczby wolnych grup sulfhydrylowych cysteiny, będącej w pozycji 284 oraz wypieraniem jonów wapnia przez jony miedzi. Inaktywację PON1 przyspieszają także wolne rodniki, głównie nadtlenek wodoru, który jest główną reaktywną formą tlenu powstającą podczas stresu oksydacyjnego na skutek zmian o charakterze miażdżycowym [22]. Inaktywacja PON1 powoduje, że traci ona zdolność do hydrolizowania tiolaktonu homocysteiny, będącego potencjalnym czynnikiem miażdżycorodnym. Tiolakton homocysteiny jest pochodną homocysteiny, która stanowi niezależny czynnik ryzyka choroby niedokrwiennej serca. Modyfikuje on frakcję HDL i w ten sposób pozbawia ją aktywności antyoksydacyjnej przez tiolację paraoksonazy. Oprócz tego pobudza proces oksydacji LDL, czyniąc te cząsteczki bardziej przyswajalnymi przez monocyty i makrofagi [32, 33]. Warto dodać, że homocysteinylacja reszt lizynowych białek może prowadzić do ich inaktywacji, ale także do zwiększenia agregacji cząstek LDL i wzmożonej aktywacji makrofagów [34].

UWAGI KOŃCOWE

Enzymy antyoksydacyjne zarówno bezpośrednio, jak i pośrednio biorą udział w reakcjach wolnorodnikowych, tworząc zintegrowany system obronny organizmu

[35]. Oznaczanie ich aktywności może dostarczać wielu cennych informacji o stanie bariery antyoksydacyjnej organizmu. Może być również wykorzystywane zarówno w celach diagnostyczno-rokowniczych, jak i profilaktycznych. Pomimo, iż paraoksonazy nie unieszkodliwiają bezpośrednio reaktywnych form tlenu, to jednak ocena ich aktywności oraz badanie polimorfizmów genetycznych może stanowić ważne źródło informacji na temat zagrożenia rozwojem chorób, u podłoża których leżą wolne rodniki i stres oksydacyjny, w tym miażdżycy. Może to okazać się niezwykle przydatne w szacowaniu ryzyka ww. jednostki chorobowej.

Aktywność oraz stężenie paraksonazy 1 u ludzi charakteryzuje się dużą zmiennością. Niemniej ocena ilości tego enzymu w surowicy może okazać się ważna w szacowaniu indywidualnego ryzyka rozwoju choroby niedokrwiennej serca. Aktywność PON1 może być także modyfikowana, niezależnie od genotypu, przez takie czynniki jak styl życia, dieta czy choroby.

Jak wspomniano wcześniej, PON1 chroni cząstki LDL i HDL przed oksydacją. Ponadto niszczy utlenione lipidy w lipoproteinach i naczyniach krewionośnych, a tym samym opóźnia rozwój miażdżycy. Shih i współautorzy [36] w swoich badaniach opisali ochronne działanie paraoksonazy 1 w stosunku do miażdżycy. Badaniu poddano myszy karmione dietą aterogenną, które były podatne na rozwój miażdżycy i wykazano zmniejszenie i wykazano zmniejszenie aktywności PON1 o 52% u myszy, które były podatne na rozwój miażdżycy. Odnotowano także pozytywną korelację poziomu wątrobowego mRNA PON1 ze stopniem rozwoju blaszek miażdżycowych. Natomiast po iniekcji oxLDL do krążenia myszy podatnych na miażdżycę zaobserwowano zmniejszenie aktywności PON1 o 59%.

Dochodzące przeprowadzone badania nad paraoksonazą 1 wskazują na jej działanie przeciwmajdżycowe. Wykazano, że niska aktywność tego enzymu jest niezależnym czynnikiem ryzyka rozwoju choroby niedokrwiennej serca. Pozwala także lepiej ocenić zagrożenie rozwojem tej choroby niż jej genotyp. Natomiast wyższa aktywność PON1 stanowi ochronę dla cząstek LDL przed procesami utleniania, opóźniając w ten sposób rozwój miażdżycy.

PIŚMIENIETWO CYTOWANE

- [1] A. Otocka-Kmiecik, M. Orłowska-Majdak, Post. Hig. Med. Dosw., 2009, **63**, 668.
- [2] L.G. Costa, T.B. Cole, C.E. Furlong, Acta Biomed. Atenei Parmens, 2005, **76** (supl. 2), 50.
- [3] M. Knapik-Kordecka, A. Piwowar, M. Warwas, Wiad. Lek., 2007, **60** (7-8), 329.
- [4] A. Łuszczewski, E. Matyska-Piekarska, J. Trefler, I. Wawer, J. Łącki, P. Śliwińska-Stańczyk, Reumatologia, 2007, **45** (5), 284.
- [5] J. Kulbacka, J. Saczko, A. Chwilkowska, Pol. Merk. Lek., 2009, **27** (157), 44.
- [6] O. Kalisz, T. Wolski, M. Gerkowicz, M. Smorawski, Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska. Sectio DD: Medicina Veterinaria, 2007, **62** (1), 87.
- [7] E. Zawadzka-Bartczak, L. Kopka, R. Wójcik: Przegl. Med. Lotniczej, 2001, **3** (7), 235.
- [8] G.M. Chisolm, D. Steinberg D, Free Radic. Biol. Med., 2000, **28** (12), 1815.
- [9] K. Strzyżewski, M. Pioruńska-Stolzman, W. Majewski, Nowiny Lekarskie, 2008, **77** (1), 8.

- [10] P. Libby, M. DiCarli, R. Weissleder, *J. Nucl. Med.*, 2010, **51** (Suppl. 1), 33.
- [11] T. Wielkoszyński, M. Zawadzki, A. Lebek-Ordon, I. Szlacheta-Korzonek, *Diagn. Lab.*, 2007, **43**, 283.
- [12] P. Gajewski, M. Tomaniak, K.J. Filipiak, *Folia Cardiologica*, 2015, **10** (3), 183.
- [13] A. Banszewska, A. Baszczuk, Z. Kopczyński, A. Banaszewska, A. Baszczuk, Z. Kopczyński, A. Thielemann, P. Kopczyński, *Postępy biologii komórki*, 2014, **41** (3), 429.
- [14] M.I. Mackness, S. Arrol, P.N. Durrington, *FEBS Lett.*, 1991, **286**, 152.
- [15] K.N. Gan, A. Smolen, H.W. Eckerson, B.N. La Du, *Drug. Metab. Dispos.*, 1991, **19**, 100.
- [16] Z. Senderowska, J. Sein Anand, I. Rybakowska, *Ann. Acad. Med. Gedan.*, 2015, **45**, 71.
- [17] A. Wojtczak, J. Skretowicz, *Pol. Merk. Lek.*, 2007, **23** (133), 5.
- [18] H.H. Wittrup, A. Tyjoberk-Hansen, S. Abildgaard, R. Steffensen, P. Schnohr, B.G. Nordestgaard, *J. Clin. Invest.*, 1997, **99**, 1606.
- [19] J. Zielaskowska, D. Olszewska-Słonina, *Adv. Clin. Exp. Med.*, 2006, **15**, 1073.
- [20] Z. Suchocka, *Czynniki Ryzyka*, 2006, **2** (48), 11.
- [21] O. Rozenberg, M. Rosenblat, R. Coleman, D.M. Shih, M. Aviram, *Free Radic. Biol. Med.*, 2003, **34**, 774.
- [22] M. Aviram, S. Billecke, R. Sorenson, Ch. Bisgaier, R. Newton, M. Rosenblat, J. Erogul, C. Hsu, C. Dunlop, B. La Du, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 1998, **18**, 1617.
- [23] M. Aviram, M. Rosenblat, C.L. Bisgaier, R.S. Newton, S.L. Primo-Parmo, B.N. La Du, *J. Clin. Invest.*, 1998, **101**, 1581.
- [24] B. Mackness, M.I. Mackness, S. Arrol, W. Turkie, K. Julier, B. Abuasha, J.E. Miller, A.J. Boulton, P.N. Durrington, *Atherosclerosis*, 1998, **139**, 341.
- [25] M. Aviram, M. Rosenblat, S. Billecke, J. Erogul, R. Sorenson, C.L. Bisgaier, *Free Radic. Biol. Med.*, 1999, **26**, 892.
- [26] M.I. Mackness, D. Harty, D. Bhatnager, P.H. Winocour, S. Arrol, M. Ishola, P.N. Durrington, *Atherosclerosis*, 1991, **86**, 193.
- [27] A. Gugliucci, T. Menin, *Clin. Chim. Acta*, 2015, **439**, 5.
- [28] D.M. Shih, L. Gu, Y.R. Xia, M. Navab, W.F. Li, S. Hama, L.W. Castellani, C.E. Furlong, L.G. Costa, A.M. Fogelman, A.J. Lusis, *Nature*, 1998, **394**, 284.
- [29] P.N. Durrington, B. Mackness, M.I. Mackness, *Thromb. Vasc. Biol.*, 2001, **21**, 473.
- [30] D.K. Sanghera, N. Saha, M.I. Kamboh, *Atherosclerosis*, 1998, **136**, 217.
- [31] B.N. La Du, S. Billecke, C. Hsu R.W. Haley, C.A. Broomfield, *Drug Metab. Dispos.*, 2001, **29**, 566.
- [32] B. Mackness, D.K. Davies, W. Turkie, E. Lee, D.H. Roberts, E. Hill, C. Roberts, P.N. Durrington, M.I. Mackness, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2001, **21**, 1451.
- [33] S.D. Nguyen, D.E. Sok, *Free Radic. Res.*, 2004, **38**, 969.
- [34] A. Baszczuk, Z. Kopczyński, A. Theleman, *Postępy Hig. Med. Dosw.*, 2014, **68**, 91.
- [35] H. Sies, *Eur. J. Biochem.*, 1993, **215**, 213.
- [36] D.M. Shih, L. Gu, S. Hama, Y.R. Xia, M. Navab, A.M. Fogelman, A.J. Lusis, *J. Clin. Invest.*, 1996, **97**, 1630.

WYBRANE ANTYBIOTYKI NUKLEOZYDOWE

SELECTED NUCLEOSIDE ANTIBIOTICS

**Justyna Samaszko-Fiertek*, Barbara Dmochowska,
Rafał Ślusarz, Janusz Madaj**

Uniwersytet Gdańskiego, Wydział Chemii, Pracownia Chemii Cukrów

ul. Wita Stwosza 63, 80-308 Gdańsk

**e-mail: j.samaszko-fiertek@ug.edu.pl*

Abstract

Wykaz stosowanych skrótów

Wprowadzenie

1. Biosynteza antybiotyków urydynonukleozydowych

2. Wybrane antybiotyki nukleozydowe

 2.1. Tunikamycyna

 2.2. Mureidomycyna

 2.3. Muramycyna

 2.4. Kapuramycyna

Uwagi końcowe

Podziękowania

Piśmiennictwo cytowane

Dr hab. Janusz Madaj, prof. nadzw. UG, ukończył studia chemiczne na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego w roku 1989. W tym samym roku podjął pracę w Zakładzie Chemii Cukrów UG. Stopień doktora nauk chemicznych uzyskał w roku 1995. W latach 1997-8 odbył staż naukowy w Case Western Reserved University w Cleveland, Ohio USA w grupie profesora Vincenta M. Monnier. W roku 2004 uzyskał stopień doktora habilitowanego nauk chemicznych po przedstawieniu rozprawy na temat: „Badania dróg tworzenia i przemian wybranych związków cukrowych”. Jego aktualne zainteresowania naukowe skupiają się na chemii organicznej ze szczególnym uwzględnieniem chemii węglowodanów. Ostatnio swoje prace koncentruje na badaniach mechanizmu oddziaływania wankomycyny ze ścianą komórkową bakterii Gram-dodatnich oraz wpływem na to oddziaływanie fragmentów cukrowych.

Dr Barbara Dmochowska w roku 1994 ukończyła Wydział Chemii Uniwersytetu Gdańskiego w Gdańsku. Jest adiunktem w Pracowni Chemii Cukrów na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego. Tematyka badawcza: tworzenie czwartorzędowych soli N-D-glikoamoniowych i alditololoamoniowych z udziałem amin o potencjalnych właściwościach biologicznych.

Dr Justyna Samaszko-Fiertek w roku 2004 ukończyła Wydział Chemii Uniwersytetu Gdańskiego w Gdańsku. Stopień doktora nauk chemicznych uzyskała w roku 2010. Jest adiunktem w Pracowni Chemii Cukrów na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego. Tematyka badawcza: badaniach mechanizmu oddziaływania wankomycyny ze ścianą komórkową bakterii Gram-dodatnich, opracowanie metod syntezy nowych pochodnych antybiotyków glikopeptydowych.

Dr Rafał Ślusarz ukończył studia chemiczne na Uniwersytecie Gdańskim. Także na Wydziale Chemii UG, w 2004 roku uzyskał stopień doktora nauk chemicznych, po obronie rozprawy pt. „Symulowanie dynamiką molekularną blokowania i aktywacji receptorów sprężonych z białkiem G”. Obecnie zajmuje się badaniem zmian konformacyjnych układów cukrowych i glikoproteinowych podczas swoistego oddziaływania z fragmentami konstrukcyjnymi komórek bakteryjnych oraz enzymami organizmów wyższych metodami modelowania molekularnego. Jego warsztat pracy obejmuje dynamikę molekularną, analizę statystyczną, optymalizacje, dokowania oraz badanie oddziaływań międzymolekularnych.

ABSTRACT

Every year there has been a growing increase in infections caused by strains of bacteria resistant to multiple drugs. This prompts scientists to search for new antibiotics that would be able to fight these infections.

New therapeutics used in medicine, which offer greater hopes are nucleoside antibiotics. They represent a large family of natural compounds exhibiting a variety of biological functions [1]. These include antifungal, antiviral, antibacterial, insecticides, immunosuppressants or anticancer properties. These broad-spectrum antibiotics can be divided into three main groups:

- antibacterial nucleoside antibiotics, responsible for the inhibition of bacterial translocation of phospho-*N*-acetylpentapeptides, involved in the biosynthesis of peptidoglycan cell wall of bacteria;
- antifungal nucleoside antibiotics, which role is to inhibit chitin synthase, or stopping construction of the cell wall of fungi;
- antiviral antibiotics nucleoside, their mechanism of action is mainly based on blocking the biosynthesis of proteins by peptide inhibition transferase.

In recent years much attention has been focused on the construction, mechanism of action and biosynthesis of antibiotics [1–3]. The development of genetic engineering has opened the way for combinatorial biosynthesis and obtaining new or hybrid compounds. In this work we would like to discuss some of bioactive naturally occurring nucleoside antibiotics, such as tunicamycin (Fig. 6) [19–22], mureidomycin (Fig. 8) [31–34], muramycin (Fig. 9) [36] or capuramycin (Fig. 10) [38].

Keywords: nucleoside antibiotics, tunicamycin, mureidomycin, muramycin, capuramycin

Słowa kluczowe: antybiotyki nukleozydowe, tunikamycyna, mureidomycyna, muramycyna, kapuramycyna

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

- ATP – ang. *adenosine triphosphate*
- CapP – ang. *ATP-dependent capuramycin phosphotransferase*
- CapS – ang. *S-adenosylmethionine-dependent carboxyl methyltransferase*
- CapW – ang. *ATP-independent transacylase*
- GalNAc – ang. *N-acetylgalactosamine*
- GlcNAc-1-P – ang. *N-acetylglucosamine-1-phosphate*
- GlyU – ang. *5'-C-glycyluridine*
- LipK – ang. *PLP-dependent L-threonine:uridine-5'-aldehyde transaldolase*
- LipL – ang. *non-heme iron(II)-dependent dioxygenase*
- LipM – ang. *UTP:5-amino-5-deoxy- α -D-ribose-1-phosphate uridylyltransferase*
- LipN – ang. *5-amino-5-deoxyribosyltransferase*
- LipO – ang. *L-methionine:UA aminotransferase*
- LipP – ang. *5'-amino-5'-deoxyuridine phosphorylase*
- MIC – ang. *minimal Inhibitory Concentration*
- MRDs – ang. *mureidomycins*
- Mtb – ang. *mycobacterium tuberculosis*
- SAM – ang. *S-adenosylmethionine*
- TB – ang. *tuberculosis*
- TunA – ang. *tunicamycin dehydratase*
- TunF – ang. *tunicamycin epimerase*
- UA – ang. *uridine-5'-aldehyde*
- UDP-GlcNAc – ang. *uridine diphosphate N-acetylglucosamine*
- UMP – ang. *uridine-5'-monophosphate*
- WHO – ang. *World Health Organization*

WPROWADZENIE

Rok roczny wzrost zachorowań wywołanych zarówno przez bakterie Gram-dodatnie, jak i Gram-ujemne zmusza do poszukiwań coraz to nowszych terapii w walce z tymi drobnoustrojami. Nowymi terapeutykami wykorzystywany w lecznictwie, w których pokłada się coraz większą nadzieję są antybiotyki nukleozydowe. Stanowią one bardzo dużą rodzinę związków naturalnych wykazującymi się różnorodnymi funkcjami biologicznymi [1]. Zalicza się do nich między innymi właściwości antygrzybicze, antywirusowe, antybakterjalne, owadobójcze, immunosupresywne czy działanie przeciwnowotworowe. Dzięki tak szerokiemu spektrum działania możemy antybiotyki nukleozydowe podzielić na trzy główne grupy:

- antybiotyki nukleozydowe antibakterialne, które odpowiedzialne za inhibicję translokacji bakteryjnej fosfo-N-acetylmuramyl-pentapeptydowej, biorącej udział w biosyntezie peptydoglikanu ściany komórkowej bakterii;
- antybiotyki nukleozydowe o właściwościach antygrzybiczych, których rola polega na inhibicji syntazy chityny, czyli powstrzymania budowy ściany grzybów;
- antybiotyki nukleozydowe o właściwościach antywirusowych, ich mechanizm działania opiera się głównie na blokowaniu biosyntezy białek, poprzez inhibicję peptydowej transferazy.

W ostatnich latach bardzo dużo uwagi skupiono na budowie, mechanizmie działania czy biosyntezie antybiotyków [1–3]. Rozwój inżynierii genetycznej otworzył drogę do biosyntezy kombinatorycznej i otrzymywania nowych lub hybrydowych związków.

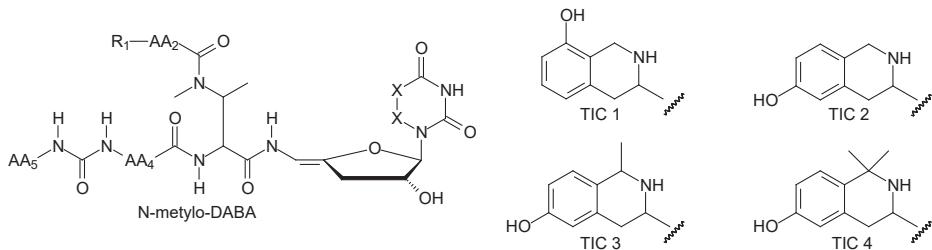
Można by również dokonać innego podziału antybiotyków nukleozydowych niż ten oparty na ich właściwościach. Móglby być on uzależniony od budowy, w tym w szczególności od różnorodności zasad nukleinowych w strukturze związku. W tej pracy pragniemy omówić kilka bioaktywnych, naturalnie występujących antybiotyków nukleozydowych, takich jak mureidomycyna, muramycyna, tunikamycyna czy kapuramycyna.

1. BIOSYNTESA ANTYBIOTYKÓW URYDYNONUKLEOZYDOWYCH

Budowa antybiotyków nukleozydowych jest bardzo złożona. W swej strukturze zawierają dużą liczbę istotnych grup funkcyjnych – niezbędnych w mechanizmie ich działania. Wskazuje to również na bardzo nietypowy proces ich biosyntezy. Z uwagi na szybki rozwój inżynierii genetycznej oraz dostępności coraz to nowych klastrów genów – badania nad biosyntezą antybiotyków nukleozydowych stały się przedmiotem zainteresowania wielu ośrodków badawczych. Wprowadziło to na gwałtowny rozwój i przyrost wiedzy zarówno na poziomie genetycznym, jak również biochemicznym [1].

Biosynteza antybiotyków nukleozydowych jest procesem wieloetapowym. Grupa antybiotyków takich, jak mureidomycyna, lipozydomycyna (ang. *liposidomycin*), tunikamycyna (ang. *tunicamycin*) czy kapuramycyna (ang. *capuraycin*) określane są niekiedy jako związki urydyno-nukleozydowe. Do tej grupy zaliczyć możemy cztery podgrupy antybiotyków: urydylopeptydowe, urydylolipopeptydowe, urydylolipodisacharydowe oraz urydyloglikozylopeptydowe.

Wśród pochodnych urydylopeptydowych ważne miejsce zajmuje pacydamycyna (ang. *pacidamycin*), napsamycyna (ang. *napsamycin*), mureidomycyna (ang. *mureidomycin*), sansanmycyna (ang. *sansanmycin*). Ich struktura opiera się na pseudotetrapentapeptydowym rdzeniu, do którego przyłączony jest bardzo rzadko spotykany nukleozyd 3', 4',5'-enaminourydyn (Rys. 1) [1].

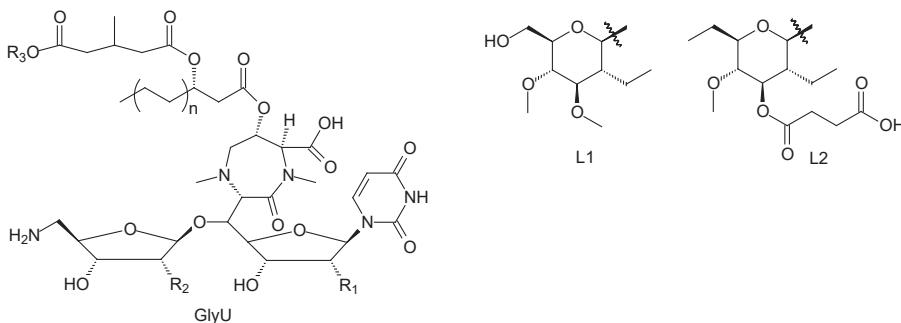


	R1	AA3	AA4	AA5	X-X
Pacidamycyna 1/2/3	Ala	<i>m</i> -Tyr	Ala	Trp/Phe/ <i>m</i> -Tyr	HC=CH
Pacidamycyna 1/5/5T	-	<i>m</i> -Tyr	Ala	Trp/Phe/ <i>m</i> -Tyr	HC=CH
Pacidamycyna 6/7	Gly	<i>m</i> -Tyr	Ala	Trp/Phe	HC=CH
Pacidamycyna D/4N	-	Ala/TIC 1	Ala	Trp	HC=CH
Napsamycyna A/B	-	TIC 2/TIC 3	Met	<i>m</i> -Tyr	HC=CH
Napsamycyna C/D	-	TIC 2/TIC 3	Met	<i>m</i> -Tyr	H ₂ C-CH ₂
Mureidomycyna A/C	-/Gly	<i>m</i> -Tyr	Met	<i>m</i> -Tyr	HC=CH
Mureidomycyna B/D	-/Gly	<i>m</i> -Tyr	Met	<i>m</i> -Tyr	H ₂ C-CH ₂
Sansanmycyna A/B/C	-	<i>m</i> -Tyr	Met/Leu/Met	Trp	HC=CH
Sansanmycyna D/E	-	<i>m</i> -Tyr	Met/ Met	Trp	HC=CH
Sansanmycyna F/G	-	TIC 4	Met/Leu	<i>m</i> -Tyr	HC=CH
Sansanmycyna H	-	<i>m</i> -Tyr	Met	Tyr	HC=CH

Rysunek 1. Struktura chemiczna wybranych urydylopeptydowych antybiotyków [1]

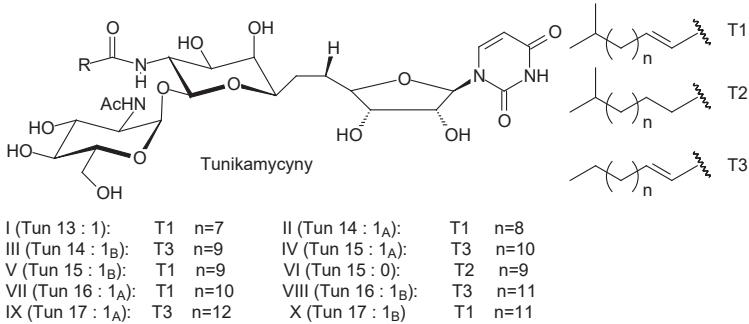
Figure 1. Chemical structures of representative uridyl-peptide antibiotics [1]

Lipozydomycyna, kaprazamycyna czy muraminomycyna są głównymi przedstawicielami antybiotyków urydylolipopeptydowych. Trzon strukturalny tych związków oparty jest na 5'-glicylourydynie (GlyU), w ich budowie obecne są również aminorybofuranozyd, diazepanon oraz kwasy tłuszczone o zmiennej długości łańcucha (Rys. 2).



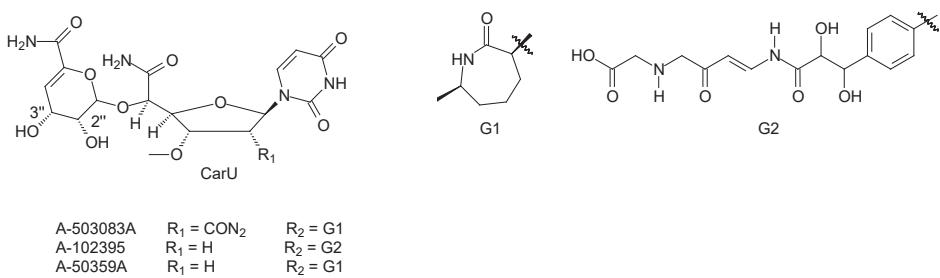
Rysunek 2. Struktura chemiczna wybranych urydylolipopeptydowych antybiotyków [1]
 Figure 2. Chemical structures of representative uridyl lipopeptide antibiotics [1]

Przedstawicielem kolejnej grupy leków nukleozydowych jest tunikamycyna (Rys. 3). Zaliczana jest ona do klasy antybiotyków urydylolipodisacharydowych. Jej struktura opiera się w głównej mierze na występującym bardzo rzadko rdzeniu 11 węglowej aminodialdozy, uracylu, N-acetylo-D-glukozaminy (GlcNAc) oraz kwasów tłuszczowych [1].



Rysunek 3. Struktura chemiczna wybranych urydylolipodisacharydowych antybiotyków [1]
 Figure 3. Chemical structures of representative uridyl lipodisaccharide antibiotics [1]

Wśród urydyloglikosylopeptydowych antybiotyków wyróżniamy m.in. kapuramycynę oraz związkę A-503083, A-102395 i A-500359. Główny ich trzon strukturalny stanowi 5'-karbamoilourydyna (CarU), do którego podstawiony jest nienasycony kwas heksauronowy oraz pierścień aminokaprolaktamu (Rys. 4).



Rysunek 4. Struktura chemiczna wybranych urydyloglikosylopeptydowych antybiotyków [1]

Figure 4. Chemical structures of representative uridyl glycosylpeptide antibiotics [1]

Duży wkład w rozwój nauki i poznanie procesu biosyntezy antybiotyków nukleozydowych włożył Ch. Walsh wraz ze współpracownikami [4–8]. Wykazali oni, że w wyniku porównania klasterów genów białka biorącego udział w biosyntezie pacydamycyny, mureidomycyny czy sansamycyna wykazują się one bardzo dużym podobieństwem sekwencyjnym.

Wszystkie niezbędne aminokwasy biorące udział w procesie biosyntezy pochodzą z metabolizmu pierwotnego, oprócz *m*-tyrozyny (*m*-Tyr) oraz kwasu 2,3-diaminomasłowego (Daba) [6]. Podstawione są one do dziewięciu białek wchodzących w skład nierybosomalnej peptydowej syntetazy (NRPS) [9].

Cechą charakterystyczną tego typu syntetazy jest inicjacja reszty aminokwasowej Daba, a dopiero potem nadbudowywany jest łańcuch peptydowy w obu kierunkach [4].

Na Rysunku 5 zaprezentowana jest biosynteza fragmentów urydyny i jej pochodnych z antybiotyku. Goss wraz ze współpracownikami wykazali, że biogeneza 3'-deoksy-4',5'-enaminourydyny opiera się na trzech etapach (Rys. 5 a) [10].

W przypadku antybiotyków typu urydylopeptydowych, np. mureidomycyny w pierwszym etapie przy udziale dehydrogenazy Pac11/Pack urydyna jest utleniana do urydyno-5'-aldehydu (UA). Poddawany jest on następnie reakcji 3',4'-dehydracji i 5'-transaminacji przy udziale enzymów z rodziny Cupin (Pac13/PacM) oraz pyridoksal-5'-fosforano (PLP) zależnej aminotransferazy (Pac5/PacE).

Odkryto, że w antybiotyku lipopeptydowym (np. kaprazamycynie czy mureidomycynie) aż sześć genów (LipK, LipL, LipO, LipP, LipM i LipN) jest niezbędnych do utworzenia ugrupowania aminorybozylowego (Rys 5 b). W pierwszym etapie przy udziale LipL następuje oksydacyjna defosforylacja 5'-monofofosforylowej urydyny UMP do UA [11]. Po czym w wyniku działania aminotransferazy UA (LipO) UA przekształcana jest w 5'-amino-5'-deoksyurydynę. Związek ten stanowi substrat w reakcji z fosforylą LipP prowadzącej do otrzymania 5'-amino-5'-deoksy- α -D-rybozo-1-fosforanu. W kolejnym etapie pochodna ta przekształcana jest w 5'-amino-5'-deoxy- α -D-rybozo-1-fosforan przy udziale dwóch enzymów wykorzystywanych w reakcjach glikozylacji. Cukier ten przekształcany jest następnie w UDP-5'-amino-5'-deoksy- α -D-rybozę. Aktywatorem tej reakcji jest nukle-

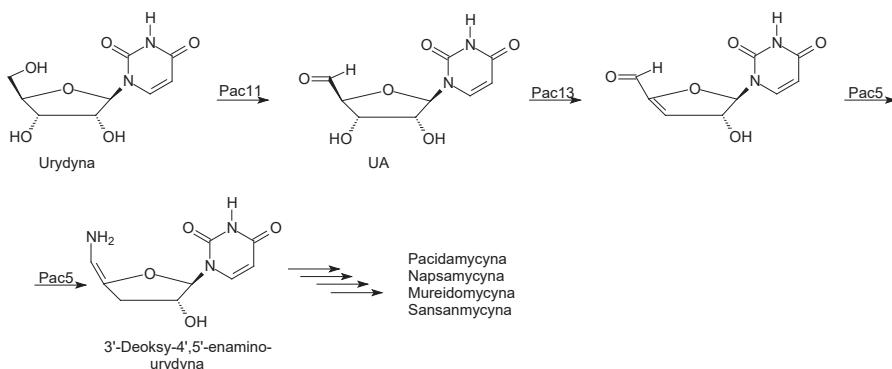
otydylotransferaza – LipM. Przy udziale glikozylotransferazy LipN pochodna UDP przenoszona jest do akceptora w celu zsyntetyzowania fragmentu disacharydowego. [12] Potencjalnym akceptorem w tego typu reakcji jest 5'-C-glycolurydyna [13].

Klaster genów niezbędny do biosyntezy tunikamycyny został już dobrze poznany [14, 15]. TunA oraz TunF oznaczają odpowiednio dehydratazę oraz epimerazę, enzymy konieczne do utworzenia unikalnego pośredniego eteru enolowego – UDP-6-deoksy-5,6-eno-N-acetylo-D-galaktozaminy (GalNAc), gdy substratami reakcji był UDP-GlcNAc oraz urydyna [16].

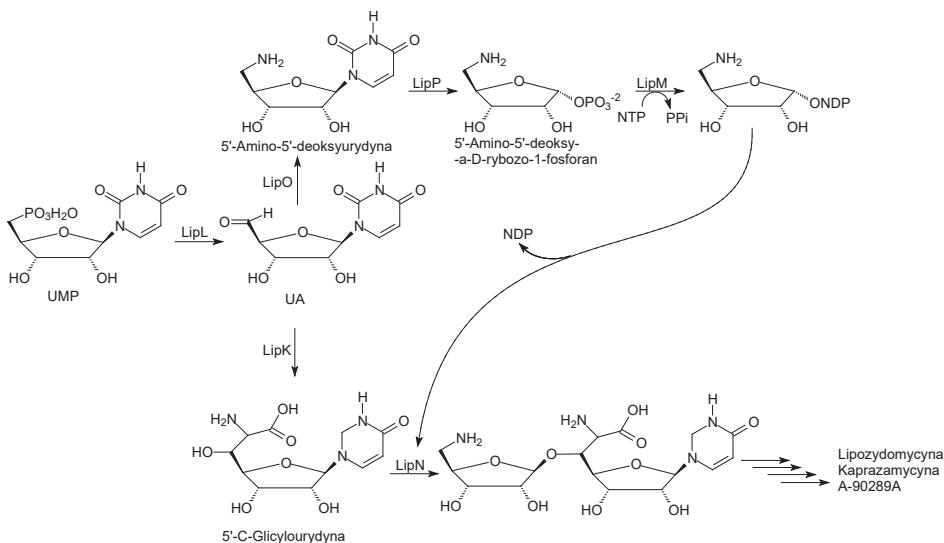
Na Rysunku 5b przedstawiona została również biosynteza kolejnego antybiotyku jakim jest kapuramycyna. Zakłada się CapP jest ATP- kapuramycyno zależną transferazą odpowiedzialną za przeniesienie reszty γ -fosforanowej z ATP na grupę 3'-hydroksylową reszty nienasyconego kwasu heksuronowego w przypadku A-503083 B [16].

CapS zaliczana jest do S-adenozylometioninowej (SAM) zależnej karboksylometylowej transferazy i odpowiedzialna jest za aktywację ugrupowania kwasu karboksylowego i przekształcenia go w ester metylowy. W obecność wolnej reszty L-aminokaprolaktamu, gen CapW przekształca wiązanie estrowe w nowe wiązanie amidowe (Rys. 5c). CapS oraz CapW pełnią bardzo ważną rolę w biosyntezie antybiotyku. Reakcje przez nią katalizowane stanowią ATP-niezależną strategię aktywacji grupy karboksylowej i tworzenie międzymiasteczkowego wiązania amidowego [17, 18].

a)



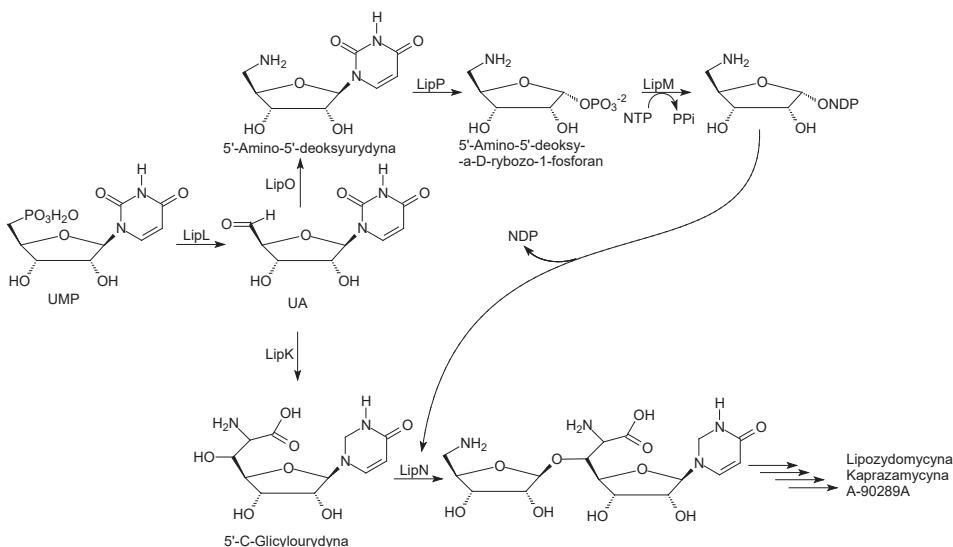
b)



Rysunek 5. Biosynteza antybiotyków nukleozydowych [10, 12, 18]

Figure 5. Biosynthesis pathways of nucleoside antibiotics [10, 12, 18]

c)

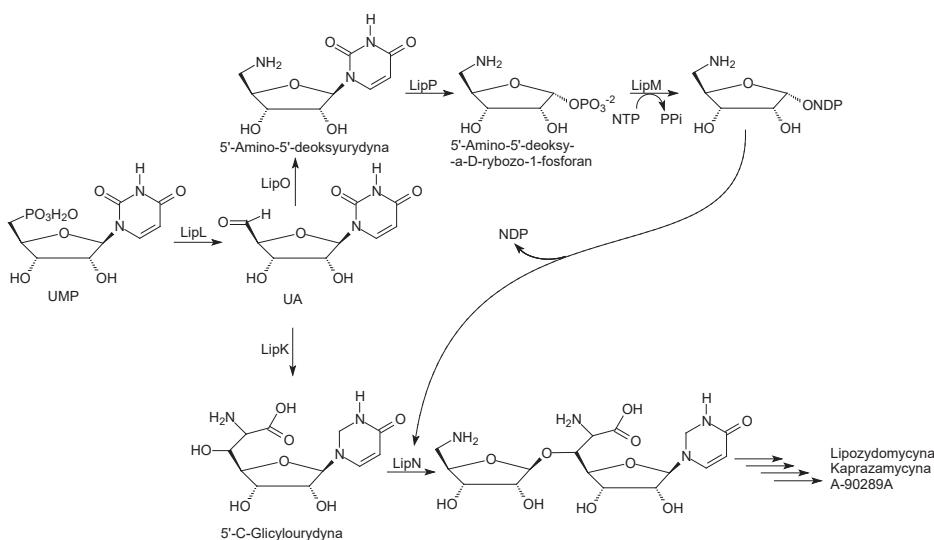


Rysunek 5. Ciąg dalszy
Figure 5. Continuation

2. WYBRANE ANTYBIOTYKI NUKLEOZYDOWE

2.1. TUNIKAMYCyna

Jednym z pierwszych odkrytych antybiotyków nukleozydowych była tunikamycyna. W 1971 r. grupa badawcza pod kierunkiem Takatsuki oraz Tamura wyizolowała ją ze szczepu *Streptomyces lysosuperficus nov. sp.* [19–21]. Odkrycie tego inhibitora okazało się niebywale pomocne w badaniach nad zależnością struktury a funkcją glikoprotein. Tunikamycyna okazała się skutecznym inhibitorem w badaniach nad reakcją *N*-glykoryzacji wielu protein. Powstrzymuje ona przyłączenie fragmentu cukrowego do bardziej złożonej struktury (Rys. 6) [22].

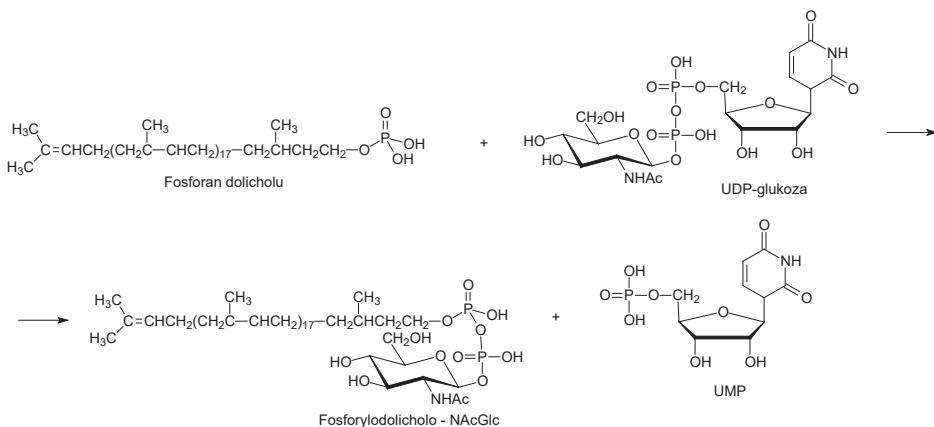


Rysunek 6. Struktura tunikamycyny i jej analogów [22]
Figure 6. Structures of the various tunicamycin analogs [22]

Struktura tunikamycyny zawiera ugrupowanie urydyny, do którego przyłączone są dwa O-glikozydowo połączone cukry wraz z ugrupowaniem kwasu tłuszczywego (Rys. 6) [22, 23]. Istnieje wiele homologów tego antybiotyku nukleozydowego różniących się między sobą przede wszystkim wielkością oraz strukturą przyłączonych kwasów tłuszczywych.

Jednym z najważniejszych homologów jest tunikamycyna V. Syntezę chemiczną tego związku zaprezentował w swojej pracy Goussalt [24].

Wiele glikoprotein zawiera wspólny rdzeń mannozy i GlcNAc w obrębie łańcucha oligosacharydowego, który poprzez wiązanie N-glikozydowe podstawiony jest do reszty L-asparaginy.[25] Główny rdzeń łańcucha oligosacharydowego – w strukturze $(\text{Man})_n \alpha \rightarrow \text{Man} \beta \rightarrow (\text{GlcNAc})_2$ – zakotwiczony jest do nośnika lipidowego dolicholu przed przyłączeniem/transferem sacharydu do białka.

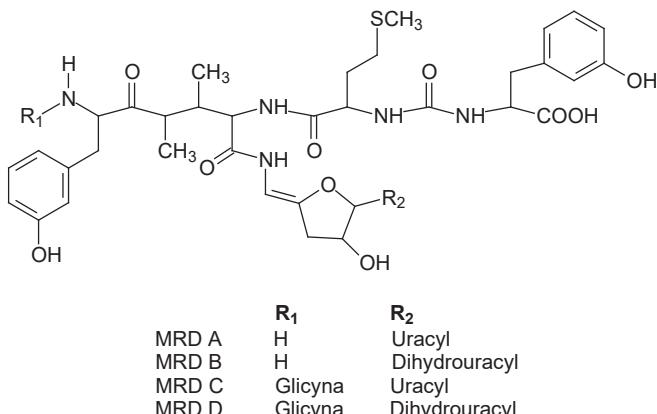


Rysunek 7. Synteza pirofosforyl Dolichol-GlcNAc [26–28]
Figure 7. Reaction of the synthesis of dolicholpyrophosphoryl-GlcNAc [26–28]

Istotną funkcją tunikamycyny jest inhibicja enzymu – transferazy GlcNAc-^{-1-P} - odpowiedzialnego za syntezę lipidopołączonych oligosacharydów. Już w pierwszym etapie biosyntezy lipidopołączonego oligosacharydu uniemożliwia on tworzenie się pirofosforyl Dolichol-GlcNAc (Rys. 7) [26–28]. Odkryto również, że uniemożliwia tworzenie się GlcNAc-pirofosforylopopoliprenolu w tkankach roślin oraz grzybów [29, 30].

2.2. MUREIDOMYCyna

Mureidomycyny (MRDs) klasy A, B, C i D to nowe antybiotyki peptydylonukleozydowe, które zostały wyizolowane z *Streptomyces flavidovirens* SANK 60486, (Rys. 8) [31–34].



Rysunek 8. Struktura mureidomycyn typu A, B, C oraz D [31–34]
Figure 8. Structures of MRDs, A, B, C and D [31–34]

Badania nad aktywnością biologiczną tych związków wykazały, że hamują one syntezę peptydoglikanu *Pseudomonas aeruginosa* [35].

2.3. MURAMYCYNA

Nową klasą związków naturalnych o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych są muramycyny. W 2002 roku McDonald wraz ze współpracownikami wyizolował je po raz pierwszy z bulionu *Streptomyces sp.* Wówczas udało im się scharakteryzować 19 naturalnie występujących muramycin (Rys. 9) [36].

	R ¹	R ²	R ³		R ¹	R ²	R ³
A1		Arib	-OMe	B6		Arib	-OMe
A2		Arib	-OMe	B7	Tak jak B6	Arib	-OH
A3		Arib	-OMe	C1	-OH	Arib	-OMe
A4	Tak jak A1	Arib	-OH	C2	-OH	Arib	-OH
A5	Tak jak A1	-OH		C3	-OH	Arib	-H
B1		Arib	-OMe	C4	-OH	-OH	
B2		Arib	-OMe	D1	-H	Arib	-OMe
B3		Arib	-OMe	D2	-H	Arib	-OH
B4		Arib	-OMe	D3	-H	Arib	-H
B5	Tak jak B4	Arib	-OH				

Rysunek 9. Struktury muramycin wyizolowanych przez grupę McDonalds [36]

Figure 9. Muramycin structures isolated by McDonalds [36]

Antybiotyki te są pochodnymi urydyny, a aktywność ich w głównej mierze opiera się na inhibicji MraY, kluczowego enzymu biorącego udział w wewnętrzkomórkowej biosyntezie peptydoglikanu ściany komórkowej [37]. Budowa muramycin scharakteryzowana została z wykorzystaniem jedno- i dwu-wymiarowego widma NMR oraz spektrometrii mas FT [36].

Głównym trzonem wchodząącym skład budowy muramycyn jest motyw glicylourydynowy. Poprzez mostek aminopropylowy połączony jest on z ugrupowaniem peptydowym zbudowanym z reszt L-leucyny (lub L-hydroksyleucyny), L-epikapreomycydyny (nonproteinogenicznej pochodnej reszty L-argininy) oraz L-waliny. Reszta urydyny w pozycji 5' glikozylowana jest resztą aminorybozy, a w niektórych przypadkach do łańcucha bocznego reszty L-hydroksyleucyny przytwierdzony jest łańcuch lipofilowy.

Wśród 19 związków wyróżniono 4 klasy (A-D). Struktura ich różni się przede wszystkim resztą L-leucyny oraz obecnością lipofilowego łańcucha bocznego oraz grupą aminową w cząsteczce cukru (Rys. 9).

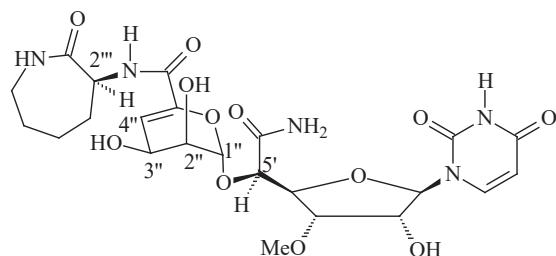
Na przykład w przypadku muramycyn typu A5 oraz C4 nieobecna jest reszta aminorybozy. Związki te są produktami hydrolizy muramycin. Pozostałe różnice w budowie w serii A i B wynikają z różnej długości lipofilowego łańcucha bocznego, który dodatkowo w przypadku klasy A jest funkcjonalizowany resztą guanidynową lub hydroksyguanidynową w pozycji ω . Natomiast w serii B jest rozgałęziony.

Muramycyny klasy C posiadają niesfunkcjonalizowaną resztę L-hydroksyleucyny, a w przypadku serii D reszta L-leucyny nie występuje.

Wśród wszystkich muramycynn największą aktywnością biologiczną przypisuje się muramycynie A1. Wykazuje się ona wysoką aktywnością głównie przeciwko bakteriom Gram-dodatnim (*Staphylococcus* MIC: 2–16 ng/ml *Enterococcus* MIC: 16–64 ug/ml), ale również kilka bakterii Gram-ujemnych (*E. coli* MIC: do 0,03 g/ml) [36].

2.4. KAPURAMYCyna

Kapuramycyna stanowi kolejny przykład antybiotyku nukleozydowego. Wyizolowana został po raz pierwszy w 1986 roku ze szczeputu *Streptomyces griseus* 446-S3. Już w 1988 roku Seto, Clardy wraz ze swoimi współpracownikami opublikowali strukturę tego antybiotyku bazując na wynikach otrzymanych z analizy widm NMR, analizy X-Ray oraz chemicznej degradacji (Rys. 10) [38].



Rysunek 10. Struktura kapuramycyny [38]

Figure 10. Capuramycin structure [38]

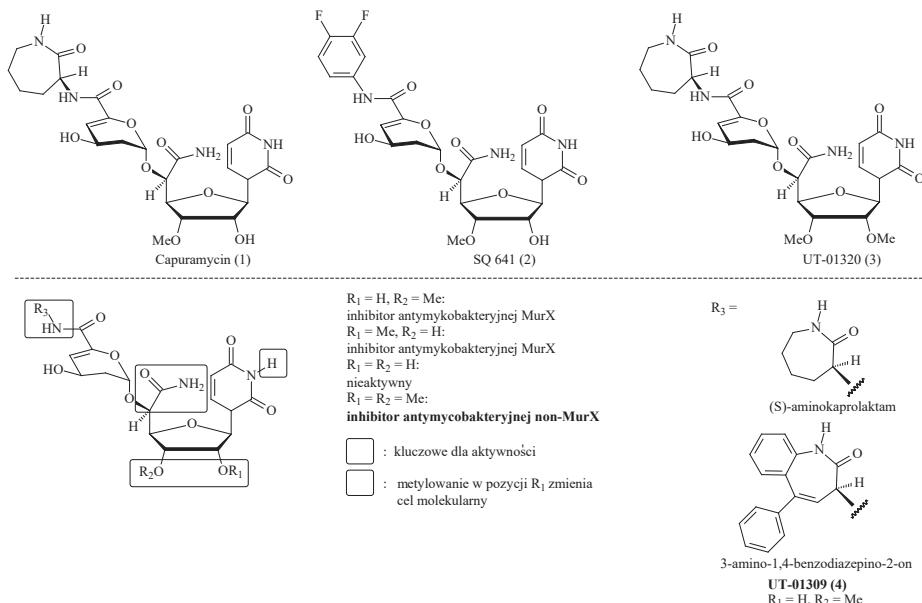
Główny rdzeń struktury kapuramycyny stanowi nukleozyd L-taluronoamidowy, do którego przyłączony jest kwas 4-deoksy-4-heksenowuronowy. Dodatkowo do reszty kwasu za pomocą wiązania peptydowego podstawiony jest 2(S)-aminokaprolikam [38].

Antybiotykom nukleozydowym typu kapuramycyn przypisuje się szczególną rolę w inhibicji bakteryjnej translokazy typu I. Enzym ten odgrywa szczególnie ważną rolę w biosyntezie fragmentu peptydoglikanu ściany komórkowej bakterii *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb).

Właściwości i efektywność działania tego leku daje nadzieję dla wielu osób zakażonych Mtb. Z doniesień Światowej Organizacji Zdrowia (WHO), wynika że na całym świecie z 42 mln osób zakażonych HIV/AIDS około jednej trzeciej jest zakażonych Mtb, z czego niestety w znacznej części nowych przypadków wykryto szczepy wielolekowej oporności-Mtb. Szczepy te odpowiedzialne są za wzrost zachorowania na gruźlicę (TB), której czas leczenia sięga nawet do 20–28 miesięcy. Dlatego tak ważne jest opracowanie nowej skutecznej terapii w walce ze szczepami opornymi-Mtb [39].

W kapuramycynie i jej analogach pokłada się nadzieję w skutecznej terapii schorzeń wywołanych również szczepami *Mycobacterium*.

W literaturze pojawiły się doniesienia o nowych analogach kapuramycyny (Rys. 11), których niewielkie stężenie antybiotyku rzędu 2,58 µg/ml (dla UT-01320) wystarczy do skutecznego zwalczania infekcji, a dodatkowo wykazuje się bardzo szerokim spektrum działania przeciwko szczepom Mtb [38].



Rysunek 11. Kapuramycyna i przykładowe jej analogi [38]
Figure 11. Structures of capuramycin and its analogs [38]

UWAGI KOŃCOWE

Pojawienie się szczepów opornych bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych wymusza poszukiwanie coraz to nowszych kuracji. Wykorzystywanie antybiotyków nukleozydowych w lecznictwie zwiększa skuteczność leczenia złożonych infekcji. A niewątpliwy rozwój biotechnologii i inżynierii genetycznej pozwala na pozyskiwanie nowych analogów i modelowanie nowych, bardziej aktywnych leków.

PODZIĘKOWANIA

Praca finansowana z DS 530-8455-D 501-16.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] G. Niu, H. Tan, Trends in Microbiology, 2015, **23**, 110.
- [2] M. Winn, R.J. Goss, K. Kimura, T.D. Bugg, Nat. Prod. Rep., 2010, **27**, 279.
- [3] K. Kimura, T.D. Bugg, Nat. Prod. Rep., 2003, **20**, 252.
- [4] C.T. Walsh, W. Zhang, ACS Chem. Biol., 2011, **6**, 1000.
- [5] E.J. Rackham, S. Grüschen, A.E. Ragab, S. Dickens, R.J.M. Goss, Chembiochem., 2010, **11**, 1700.
- [6] W. Zhang, B. Ostash, C.T. Walsh, Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A, 2010, **107**, 16828.
- [7] L. Kaysser, X. Tang, E. Wemakor, K. Sedding, S. Hennig, S. Siebenberg, B. Gust, Chembiochem. 2011, **12**, 477.

- [8] Q. Li, L. Wang, Y. Xie, S. Wang, R. Chen, B. Hong, *J. Bacteriol.*, 2013, **195**, 2232.
- [9] W. Zhang, I. Ntai, M.L. Bolla, S.J. Malcolmson, D. Kahne, N.L. Kelleher, C.T. Walsh, *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, **133**, 5240.
- [10] A.E. Ragab, S. Grüschorw, D.R. Tromans, R.J. Goss, *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, **133**, 15288.
- [11] Z. Yang, X. Chi, M. Funabashi, S. Baba, K. Nonaka, P. Pahari, J. Unrine, J.M. Jacobsen, G.I. Elliott, J. Rohr, S.G. Van Lanen, *J. Biol. Chem.*, 2011, **286**, 7885.
- [12] X. Chi, P. Pahari, K. Nonaka, S.G. Van Lanen, *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, **133**, 14452.
- [13] S. Barnard-Britson, X. Chi, K. Nonaka, A.P. Spork, N. Tibrewal, A. Goswami, P. Pahari, C. Ducho, J. Rohr, S.G. Van Lanen, *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, **134**, 18514.
- [14] F.J. Wyszynski, A.R. Hesketh, M.J. Bibb, B.G. Davis, *Chem. Sci.*, 2010, **1**, 581.
- [15] W. Chen, D. Qu, L. Zhai, M. Tao, Y. Wang, S. Lin, N.P. Price, Z. Deng, *Protein Cell*, 1, 1093.
- [16] F.J. Wyszynski, S.S. Lee, T. Yabe, H. Wang, J.P. Gomez-Escribano, M.J. Bibb, S.J. Lee, G.J. Davies, B.G. Davis, *Nat. Chem.*, 2012, **4**, 539.
- [17] Z. Yang, M. Funabashi, K. Nonaka, M. Hosobuchi, T. Shibata, P. Pahari, S.G. Van Lanen, *J. Biol. Chem.*, 2010, **285**, 12899.
- [18] M. Funabashi, Z. Yang, K. Nonaka, M. Hosobuchi, Y. Fujita, T. Shibata, X. Chi, S.G. Van Lanen, *Nat. Chem. Biol.*, 2010, **6**, 581.
- [19] A. Takatsuki, K. Arima, G. Tamura, *J. Antibiot.*, 1971, **24**, 215.
- [20] A. Takatsuki, G. Tamura, *J. Antibiot.*, 1971, **24**, 224.
- [21] A. Takatsuki, G. Tamura, *J. Antibiot.*, 1971, **24**, 785.
- [22] A. Sturm, A.A. Bergwerff, J.F.G. Vliegenthart, *Eur. J. Biochem.*, 1992, **204**, 313.
- [23] H. Debray, J.-M. Wieruszewski, G. Strecker, H. Franz, *Carbohydr. Res.*, 1992, **236**, 135.
- [24] J. Wantyghem, N. Platzer, M. Giner, C. Derappe, Y. Goussault, *carbohydr. Res.*, 1992, **236**, 181.
- [25] A. Sturm, *eur. J. Biochem.*, 1991, **199**, 169.
- [26] N. Takahashi, T. Hotta, H. Ishihara, M. Mori, S. Tejima, R. Bligny, T. Akazawa, S. Endo, Y. Arata, *Biochem.*, 1986, **25**, 388.
- [27] G. D'Andrea, J.B. Bouwstra, J.P. Kamerling, J.F.G. Vliegenthart, *Glycoconjugate J.*, 1988, **5**, 151.
- [28] S. Takayama, A. isogai, C. tsukamoto, H. Shiozawa, Y. Ueda, K. Hinata, K. Okazaki, K. koseki, A. Suzuki, *Agric. Biol. Chem.*, 1989, **53**, 713.
- [29] M. Hayashi, A. Tsuru, T. Mitsui, N. Takahashi,, H. Hanzawa, Y. Arata, T. Akazawa, *Eur. J. Biochem.*, 1990, **191**, 287.
- [30] N. takahashi, H. Hitotsuya, H. Hanzawa, Y. Arata, Y. kurihara, *J. biol. Chem.*, 1990, **265**, 7793.
- [31] M. Inukai, F. Isono, S. Takahashi, R. Enokita, Y. Sakaida, T. Haneishi, *J. Antibiot. (Tokyo)*, 1989 **42**(5), 662.
- [32] F. Isono, M. Inukai, S. Takahashi, T. Haneishi, T. Kinoshita, H. Kuwano, *J. Antibiot. (Tokyo)*, 1989 **42**(5), 667.
- [33] M. Inukai, F. Isono, S. Takahashi, R. Enokita, Y. Sakaida, T. Haneishi, *J. Antibiotics*, 1989, **42**, 662.
- [34] F. Isono, T. Katayama, M. Inukai, T. Haneishi, *J. Antibiotics*, 1989, **42**, 674.
- [35] M. Inukai, F. Isono, A. Takatsuki, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1993, **37**(5), 980.
- [36] L.A. McDonald, L.R. Barbieri, G.T. Carter, E. Lenoy, J. Lotvin, P.J. Petersen, M.M. Siegel, G. Singh, R.T. Williamson, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, **124**, 10260.
- [37] D. Wiegmann, S. Koppermann, M. Wirth, G. Niro, K. Leyerer, Ch. Ducho, Beilstein *J. Org. Chem.*, 2016, **12**, 769.
- [38] H. Yamaguchi, S. Sato, S. Yoshida, K. Takada, M. Itoh, H. Seto, N. Otake, *J. Antibiot. (Tokyo)*, 1986, **39**(8), 1047.
- [39] H. Seto, N. Otake, S. Sato, H. Yamaguchi, K. Takada, M. Itoh,H.S.M. Lu, J. Clardy, *Tetrahedron Lett.*, 1988, **29**, 2343.

POTENCJALNE ZASTOSOWANIE ENKEFALIN W DIAGNOSTYCE I TERAPII RÓŻNYCH CHORÓB

POTENTIAL APPLICATION ENKEPHALINS IN DIAGNOSTICS AND TREATMENT OF VARIOUS DISEASES

Małgorzata Sobocińska*, **Elżbieta Kamysz**

*Katedra Biotechnologii Molekularnej,
Pracownia Chemii Makromolekuł Biologicznych,
Wydział Chemiczny, Uniwersytet Gdańskiego
ul. Wita Stwosza 63, 80-308 Gdańsk*

*e-mail: malgorzata.sobocinska@phdstud.ug.edu.pl

Abstract

Wprowadzenie

1. Budowa i występowanie enkefalin

2. Funkcje enkefalin

2.1. Działanie przeciwbólowe enkefalin

2.2. Enkefaliny w chorobach serca

2.3. Wpływ enkefalin na zmiany behawioralne

2.4. Wpływ enkefalin na choroby zapalne jelit

2.5. Enkefaliny jako neuromediatory i neuromodulatory oraz ich funkcja w chorobie Parkinsona

2.6. Wpływ enkefalin na układ immunologiczny – właściwości przeciwnowotworowe enkefalin

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane

mgr Małgorzata Sobocińska – w latach 2007–2012 studiowała na Wydziale Chemiczno-Metaleurgicznym Uniwersytetu Gdańskiego – uzyskując w 2012 roku tytuł magistra. Obecnie służąca Stacjonarnych Studiów Doktoranckich Chemii i Biochemii na Wydziale Chemiczno-Metaleurgicznym Uniwersytetu Gdańskiego, gdzie wykonuje pracę doktorską pod kierunkiem dr hab. Elżbiety Kamysz, prof. UG pod tytułem: „Projektowanie, synteza i badania endogennych inhibitorów enkefalinaz oraz ich analogów”.

dr hab. n. farm. Elżbieta Kamysz, prof. UG – W latach 1990–1995 studiowała na Wydziale Chemiczno-Metaleurgicznym Uniwersytetu Gdańskiego na kierunku Chemia. W roku 1995 obroniła pracę magisterską pt. „Synteza analogów fragmentu 144–152 proteiny p24(gag) wirusa HIV-1 wiążących się z białkami głównego układu zgodności tkankowej MHC”. W tym samym roku rozpoczęła naukę na Studium Doktoranckim na Wydziale Chemiczno-Metaleurgicznym Uniwersytetu Gdańskiego. W 2000 roku obroniła pracę doktorską pt. „Wpływ wybranych modyfikacji cząsteczek hormonów neuroprzysadkowych na ich czynność biologiczną”. Stopień doktora habilitowanego nauk farmaceutycznych (specjalność chemia leków) otrzymała na Uniwersytecie Medycznym w Łodzi w 2013 roku. Ponadto ukończyła studia podyplomowe „Farmacja przemysłowa” (diplom uzyskany w 2011 roku). Obecnie pracuje w Pracowni Chemicznej Makromolekułów Biologicznych w Katedrze Biotechnologii Molekularnej Wydziału Chemiczno-Metaleurgicznym Uniwersytetu Gdańskiego, gdzie zajmuje się syntezą i badaniem peptydów występujących w jamie ustnej, peptydów przeciwdrobnoustrojowych oraz endogennych inhibitorów enkefalinaz.

ABSTRACT

For the past few years enkephalins have been a center of appreciation and interest. Enkephalins were discovered in 1975 by Hughes, Kosterlitz and coworkers [1]. They can be described as short sequences of amino acids that are naturally produced in the central nervous system (CNS) in various glands throughout the body, such as the pituitary and adrenal glands [7, 9]. There were revealed two forms of enkephalins, one containing leucine, and the other containing methionine. Enkephalins are produced by the cleavage of a precursor protein called proenkephalin. From proenkephalin originate Met- and Leu-enkephalin, Met-enkephalin-Arg⁶-Gly⁷-Leu⁸, Met-enkephalin-Arg⁶-Phe⁷ [1–3]. Enkephalins are involved in phenomena associated with modulated pain perception [13], regulation of memory and emotional conditions [21] and regulation of immunological system [29]. They also have an impact on the cardiovascular system [17], motility of the digestive system and metabolism of carbohydrates [8].

This article is a review of the current knowledge about enkephalins and their usage in the diagnostics and treatment of a variety of diseases: diseases/disorders of the central nervous system [21, 22], Parkinson's disease [27], disease of the immune system [29], chronic pain [12], tumor diseases/cancer [33], heart and cardiovascular diseases [19] and inflammatory bowel disease [23].

Keywords: endogenous opioid peptides, enkephalins, Met-enkephalin, Leu-enkephalin

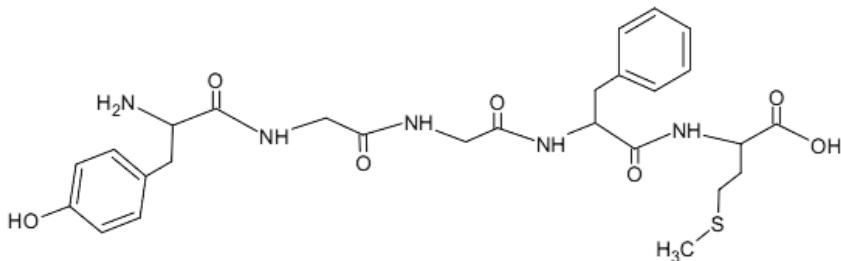
Słowa kluczowe: endogenne peptydy opioidowe, enkefaliny, Leu-enkefalina, Met-enkefalina

WPROWADZENIE

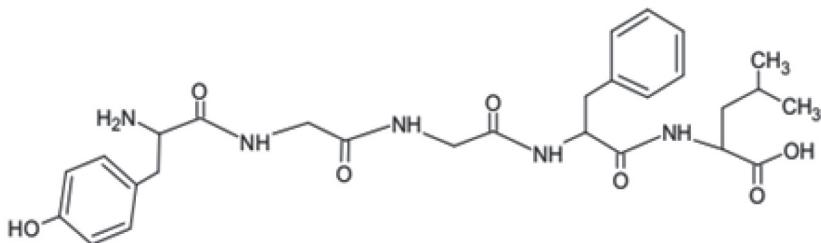
Na początku lat 70. XX wieku prowadzono liczne badania nad działaniem morfiny i jej pochodnych (opiatów) na organizm człowieka. W toku tych badań naukowcy uzyskali liczne wyniki wskazujące, że opiaty wiążą się w mózgu w miejscach wyróżniających się wysoką specyficznością. Simon i współpracownicy w 1973 roku potwierdzili istnienie w mózgu zwierząt, następnie w mózgu ludzkim specyficznych miejsc wiążących opiaty, czyli receptorów opioidowych [1, 2]. Wraz z odkryciem receptorów opioidowych badacze doszli do konkluzji, że mózg musi mieć swoje własne substancje opioidopodobne. Przyczyniło się to do wykrycia w 1975 roku przez Kosterlitz i współpracowników w ekstraktach z tkanki mózgowej świń, a następnie w mózgach innych kręgowców, oraz w ludzkim płynie mózgowo-rydzeniowym enkefalin wykazujących opioidopodobną aktywność [3]. Odkryto 2 pentapeptydy o prawie identycznej sekwencji aminokwasowej, różniące się jedynie jedną resztą aminokwasową na C-końcu. Pierwszy z nich nazwano Met-enkefaliną, a drugi Leu-enkefaliną (Rys. 1 i 2) [4].

1. BUDOWA I WYSTĘPOWANIE ENKEFALIN

Prekursorem enkefalin jest białko proenkefalina A (PENK), która jest kodowana przez gen PPE (gen prepro-enkefaliny), tworzący białko składające się z 267 reszt aminokwasowych. PENK jest konserwatywnym białkiem podatnym na działanie konwertaz CP1 i CP2. Proteolityczne cięcie PENK prowadzi do powstania 4 cząsteczek Met-enkefalin (Rys. 1), 1 cząsteczki Leu-enkefalin (Rys. 2), heptapeptydu zbudowanego z Met-enkefalin i dwóch reszt aminokwasowych (reszty arginin i fenyloalaniny), oktapeptydu, w którym do Met-enkefalin dołączone są 3 reszty aminokwasowe (reszty argininy, glicyny i leucyny) będących ligandami receptora δ [5, 6].



Rysunek 1. Wzór strukturalny Met-enkefalin (wykonała M. Sobocińska w programie ChemSketch)
 Figure 1. Structural formula Met-enkephalin (created by M. Sobocińska in ChemSketch application)



Rysunek 2. Wzór strukturalny Leu-enkefaliny (wykonała M. Sobocińska w programie ChemSketch)
 Figure 2. Structural formula Leu-enkephalin (created by M. Sobocińska in ChemSketch application)

Enkefaliny w największym stężeniu występują w tych strukturach mózgowia, w których znajdują się receptory opioidowe [7]. Obecne są we wszystkich odcinkach przewodu pokarmowego, przede wszystkim w zwojach Auerbacha [8]. Enkefaliny jak i matrycowe RNA kodujące ich prekursora są szeroko rozpowszechnione w neuronach wstępujących ośrodkowego układu nerwowego, szczególnie w substancji szarej śródmiędzgówia otaczającej wodociąg mózgu, rogach tylnych rdzenia kręgowego, wzgórzu, prążkowiu, podwzgórzu, śródmiędzgowiu, w układzie limbicznym, korze mózgowej, przysadce [9], fibroblastach, keratynocytach [5]. Ponadto gen pro-enkefaliny ulega ekspresji w tkankach gruczołów dokrewnych, komórkach układu odpornościowego i mezanchylnych komórkach macierzystych skóry [7]. Enkefalin powstają także w sercu, głównie w miocytach, a poziom mRNA jest wyższy niż w mózgu, jednak ilość peptydów pochodzących z tego prekursora w sercu jest mniejsza. Prawdopodobnie dzieje się tak, ponieważ enkefaliny nie są przechowywane w tkance serca i są szybko z niej usuwane lub degradowane [10].

2. FUNKCJE ENKEFALIN

Enkefaliny działają jako endogene ligandy receptorów opioidowych. Charakteryzują się największym powinowactwem do receptora δ i μ oraz niewielkim powinowactwem do receptora κ [4, 11]. Zaangażowane są w szereg fizjologicznych procesów zachodzących w organizmie począwszy od układu krwionośnego przez immunologiczny, aż do nerwowego.

2.1. DZIAŁANIE PRZECIWBOŁOWE ENKEFALIN

Wkrótce po odkryciu enkefalin okazało się, że ostry ból bądź stymulacja substancji szarej śródmiędzgówia otaczającej wodociąg mózgu powoduje zmniejszenie wrażliwości na ból, spowodowane wzrostem poziomu enkefalin w mózgu. Działanie przeciwbólowe enkefalin jest przede wszystkim konsekwencją wiązania się z receptorami δ -opioidowymi w mózgu. Mimo, iż enkefaliny pod względem chemicznym

nie są podobne do morfiny, oddziałują na te same receptory. Związane jest to z obecnością w strukturze enkefalin i morfiny ugrupowania tyraminowego, które odpowiada za oddziaływanie z receptorem δ -opioidowym [12].

Enkefaliny odgrywają istotne znaczenie w reakcji stresowej [13]. Działają one bowiem przeciwnie, regulując czynność hormonalną w czasie stresu. Wywołanie sytuacji stresowej m.in. czynnikami środowiskowymi powoduje pobudzenie endogennego systemu opioidowego, co przekłada się na aktywację neuronów produkujących enkefalinę [14]. Jednocześnie wykazano, że Leu-enkefalinę wykazuje znacznie słabsze właściwości przeciwbólowe niż Met-enkefalinę [15]. Mizoguchi wraz z współpracownikami z Medical College w Wisconsin przeprowadził eksperyment polegający na obserwacji odczucia zimna przez pływające myszy w zimnej wodzie, o temperaturze 4°C przez 3 minuty [16]. Badanie to wykazało, że spośród endogennych peptydów opioidowych tylko Met-enkefalinę oddziałując z receptorami opioidowymi typu δ_2 w rdzeniu kręgowym, wywołuje efekt przeciwbólowy. Pobudzenie receptora δ skutkuje również rozwojem tolerancji oraz hamowaniem czynności układu oddechowego [16].

2.2. ENKEFALINY W CHOROBACH SERCA

Enkefaliny wpływają na stan układu sercowo-naczyniowego, mogą obniżać ciśnienie tętnicze krwi oraz temperaturę ciała [17, 18]. Ouellette i Brakier-Gingras z Université de Montréal w Kanadzie zbadali poziom mRNA proenkefalin w modelu zwierzęcym jakim był chomik z przeróżnym mięśniem sercowym oraz kardiopatią. Przeprowadzone badanie wykazało 4-krotnie podwyższoną ilość mRNA proenkefalin w porównaniu do zdrowego osobnika. Wyniki te potwierdziły hipotezę, że podwyższenie poziomu mRNA preproenkefalin jest związane z rozwojem przerostu mięśnia sercowego, oraz niewydolnością serca. Hao i Rabkin z University of British Columbia w Kanadzie na szczurach cierpiących na nadciśnienie tętnicze i przerost mięśnia sercowego wykonali badanie zależności poziomu mRNA proenkefalin od diety bogatej w sól. Okazało się, że dieta bogata w sól powoduje wyraźny wzrost ilości mRNA proenkefalin w lewej komorze serca [19].

Zmiany w systemie opioidowym mają związek z rozwojem nadciśnienia. Enkefaliny hamują stymulację serca przez katecholaminy, co prowadzi do pogorszenia czynności serca. Poziom Met-enkefalinę wzrasta w mięśniu sercowym wraz z nasileniem przewlekłej niewydolności serca. Zwiększoną aktywność endogennych peptydów opioidowych związana z zastoinową niewydolnością serca przyczynia się do zmniejszenia aktywacji współczulnej i wydajności serca [10].

2.3. WPŁYW ENKEFALIN NA ZMIANY BEHAWIORALNE

Enkefaliny mogą powodować pobudzenie ruchowe, drgawki, wpływać na regulację pamięci, warunki emocjonalne oraz konsumpcję żywności płynnej [7, 21]. Zbadano wpływ enkefalin na zmiany behawioralne zwierząt. Pentapeptydy podawane do komory bocznej szczura powodowały szereg zmian tego typu: pobudzenie ruchowe całego ciała, żucie i węszenie [21, 22]. Po podaniu Leu-enkefalinę po pewnym czasie można było zaobserwować wysadzenie gałek ocznych ku przodowi oraz stan kataleptyczny, a podaniu Met-enkefalinę towarzyszył brak odruchów rogówkowych, oraz sztywność mięśni [22]. Pomimo, że związki te nie przechodzą łatwo przez barierę krew-mózg, wykazano, że ich regularne podawanie w niewielkich ilościach wpływa pozytywnie na pamięć i zdolność uczenia się [21].

2.4. WPŁYW ENKEFALIN NA CHOROBY ZAPALNE JELIT

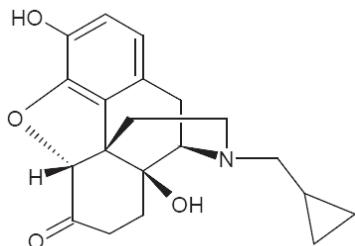
Met- i Leu-enkefaliny wywierają wpływ na motorykę układu trawiennego, trzustki oraz metabolizm węglowodanów. Wzmagają motorykę jelit poprzez pobudzanie receptorów δ i μ , umiejscowionych na mięśniach gładkich przewodu pokarmowego. Także hamują motorykę przewodu pokarmowego oddziałyując na receptory κ umiejscowione na nerwach cholinergicznych [8].

Wykazano, że zaburzenia związane ze zmniejszonym wydzielaniem peptydów opioidowych przez przewód pokarmowy i leukocyty występują u osób z zaburzeniami uwalniania hormonów jelitowych oraz u chorych na zapalenie jelita. Dowieziono również, że u diabetyków zmniejszenie zdolności mięśniówki jelit do prawidłowej reakcji na neurostimulację może być wynikiem względnego niedoboru m.in. neuropeptydów Met- i Leu-enkefalinę [23, 24]. Naukowcy zaobserwowali zwiększoną śmiertelność u myszy pozbawionych genu kodującego receptor opioidowy μ . Endogenne peptydy opioidowe wiążące się z tym receptorem, mają wpływ na wytwarzanie cytokin i proliferację leukocytów [23].

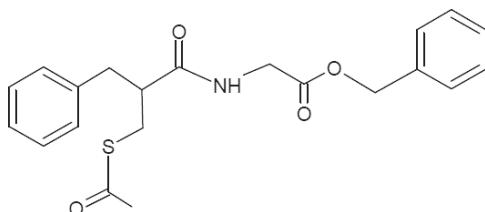
Owczarek wraz z współpracownikami z Wydziału Gastroenterologii Jagiellońskiego Uniwersytetu Medycznego dokonali analizy porównawczej stężenia Met-enkefalinę w surowicy krwi oraz w tkance błony śluzowej jelita grubego u pacjentów z nieswoistym zapaleniem jelit (ang. *inflammatory bowel disease*, IBD). W próbkach surowicy i fragmentach tkanki błony śluzowej okrężnicy stężenie Met-enkefalinę oznaczono u 43 pacjentów z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (ang. *ulcerative colitis*, UC) i u 38 pacjentów z chorobą Leśniewskiego-Crohna (ang. *crohn's disease*, CD). Grupę kontrolną stanowiło 45 zdrowych ochotników. Wykazano, że stężenie Met-enkefalinę w surowicy krwi jest znacznie niższe u pacjentów z CD (85,4 pg/ml) i UC (101,5 pg/ml) w porównaniu z grupą kontrolną (119,5 pg/ml). Poziom Met-enkefalinę w fragmentach tkanki okrężnicy pobranych od pacjentów z IBD był znacznie wyższy w porównaniu ze zdrową tkanką i wynosił odpowiednio (6,59 pg/mg i 2,89 pg/mg, $p < 0,01$ w grupie CD i 6,12 pg/mg vs 3,47 pg/mg,

$p < 0,05$ w grupie UC). Okazało się również, że poziom Met-enkefaliny koreluje z aktywnością choroby. Owczarek i współpracownicy przeprowadzili pierwsze takie badanie, ukazujące zmiany poziomu Met-enkefaliny w IBD, które mogą odgrywać istotną rolę w patogenezie i przebiegu choroby IBD [23].

U osób cierpiących na CD obniżenie poziomu markerów stanu zapalnego i poprawę jakości życia powoduje antagonista receptorów opioidowych naltrekson (Rys. 3) oraz racekadotryl (Rys. 4), prolek przeciwpiegieunkowy. Przypuszcza się, że jest to spowodowane krótkotrwałą blokadą receptorów opioidowych, która powoduje wzrost produkcji endogennych peptydów opioidowych. Co przekłada się na poprawę stanu zdrowia pacjenta [23].



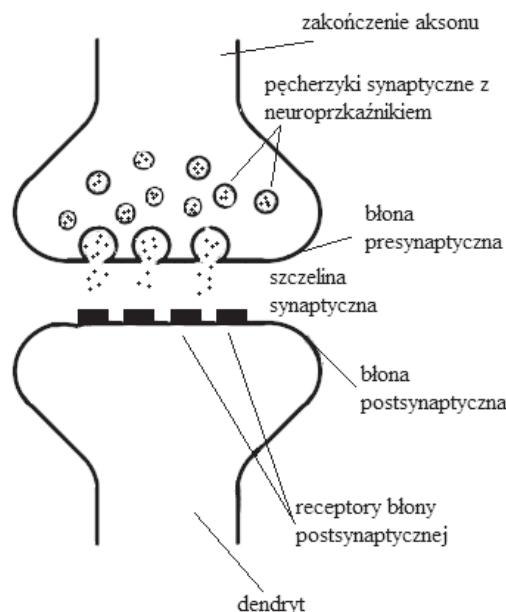
Rysunek 3. Wzór strukturalny naltreksonu (wykonała M. Sobocińska w programie ChemSketch)
 Figure 3. Structural formula naltrexone (created by M. Sobocińska in ChemSketch application)



Rysunek 4. Wzór strukturalny racekadotrylu (wykonała M. Sobocińska w programie ChemSketch)
 Figure 4. Structural formula racecadotril (created by M. Sobocińska in ChemSketch application)

2.5. ENKEFALINY JAKO NEUROMEDIATORY I NEUROMODULATORY ORAZ ICH FUNKCJA W CHOROBIE PARKINSONA

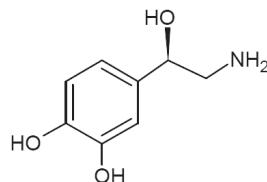
Enkefaliny pełnią funkcje neuromediatorów i neuromodulatorów, ze względu na swoją obecność w zakończeniach presynaptycznych i postsynaptycznych neuronów (Rys. 5) [7].



Rysunek 5. Struktura synapsy chemicznej (wykonała M. Sobocińska)

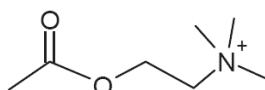
Figure 5. Structure of chemical synapse (created by M. Sobocińska)

Ich oddziaływanie z zakończeniami presynaptycznymi skutkuje hiperpolaryzacją błony postsynaptycznej. Met-enkefalina hamuje wydzielanie neuroprzekaźnika z błony presynaptycznej powodując hiperpolaryzację komórek nerwów zwojowych. Enkefaliny hamują wydzielanie neuroprzekaźników takich jak: noradrenalina (Rys. 6) poprzez aktywację receptorów μ w skrawkach kory mózgu, acetylocholiny (Rys. 7) poprzez aktywację receptorów δ w skrawkach prążkowia [7].



Rysunek 6. Wzór strukturalny noradrenalinu (wykonała M. Sobocińska w programie ChemSketch)

Figure 6. Structural formula noradrenaline (created by M. Sobocińska in ChemSketch application)



Rysunek 7. Wzór strukturalny acetylocholiny (wykonała M. Sobocińska w programie ChemSketch)

Figure 7. Structural formula acetylcholine (created by M. Sobocińska in ChemSketch application)

Regulują uwalnianie dopaminy w prążkowiu oraz w jądrze półleżącym poprzez aktywację receptorów κ [7, 25]. Dopamina odpowiada za prawidłowe przewodzenie impulsów nerwowych, w szczególności związanych z napięciem mięśni i regulacją ruchów. Przyczyną choroby Parkinsona jest stopniowe zmniejszanie się ilości dopaminy w mózgu, wskutek obumierania komórek wytwarzających dopaminę [26].

Neuroaktywne peptydy takie jak enkefaliny pomagają w prawidłowej neurotransmitacji w jądrze podstawowym. Prawdopodobnie duża ilość enkefalin znajdująca się w zwojach podstawy mózgu decyduje o selektywności procesów degradacyjnych. Met- i Leu-enkefalina mogą być swojego rodzaju markerami choroby Parkinsona. U osób z chorobą Parkinsona obserwuje się znaczny niedobór Met- i Leu-enkefaliny w prążkowiu na poziomie 50% oraz Met-enkefaliny w istocie szarej na poziomie aż 90%, co przekłada się na niedobór dopaminy w tych obszarach mózgu [27].

Postuluje się również, że układ dopaminergiczny reguluje wydzielanie neuroprzekaźników o udowodnionym działaniu immunomodulacyjnym. Stwierdzono, że obniżenie stężenia dopaminy w układzie nigrostriatalnym powoduje znaczące podwyższenie ilości mRNA Met-enkefaliny i pro-enkefaliny w prążkowiu [28].

2.6. WPŁYW ENKEFALIN NA UKŁAD IMMUNOLOGICZNY - WŁAŚCIWOŚCI PRZECIWNOWOTWOROWE ENKEFALIN

Met-enkefalina bierze udział w regulacji systemu immunologicznego [29]. Często nazywana jest opioidowym czynnikiem wzrostu (ang. *opioid growth factor*, OGF), ponieważ pełni ważną rolę w regulacji układu odpornościowego, stymuluje wzrost komórek odpornościowych (kontrolując przyrost limfocytów T i B), wpływa na migrację monocytów, limfocytów, neutrofilów, odpowiada za regenerację tkanek oraz aktywuje receptor OGF [29, 30]. Kompleks OGF-receptor przemieszcza się do jądra komórkowego, gdzie bierze udział w regulacji wzrostu komórek, podziały komórkowym, gojeniu ran [31]. Zwiększenie aktywności receptora OGF stymuluje oddziaływanie opioidowego czynnika wzrostu z receptorem. Powoduje to hamowanie podziałów komórek nowotworowych. Wykazano, że podawanie OGF hamuje wzrost komórek nowotworowych umożliwiając jednocześnie zachodzenie mechanizmów odpornościowych z udziałem makrofagów oraz limfocytów [31, 32].

Badania przeprowadzone w latach 80. wykazały, że podanie enkefalin hamuje rozwój nowotworu pierwotnego oraz hamuje proces przerzutowania komórek czerniaka linii B16-BL6 do płuc po podskórnej implementacji u myszy [33]. Dodatkowo zaobserwowano zwiększenie aktywności komórek typu NK (ang. *natural killer*) pełniących ważną rolę w procesach przeciwnowotworowych [34]. Jak dotąd potwierdzono hamujący wpływ OGF na rozwój raka: piersi, jajników, jelita grubego, trzustki, płuc oraz hepatoblastomy. Obserwowany efekt przeciwnowotworowy okazał się w wielu badaniach odwracalny w obecności antagonistów receptorów opioidowych jakim jest nalokson [33]. Jak również dowiedziono, że Met-enkefalina

produkowana przez komórki rakowe jelita grubego może tłumić odpowiedź immunologiczną organizmu sprzyjając w ten sposób dalszemu namnażaniu komórek nowotworu [32].

PODSUMOWANIE

Doniesienia literaturowe potwierdzone w badaniach na zwierzętach i ludziach wskazują na wszechstronną użyteczność enkefalin w leczeniu różnego pochodzenia chronicznego bólu, zmian behawioralnych, stanów zapalnych, infekcji bakteryjnych czy wirusowych. Enkefaliny mogą być markerami w diagnostyce m.in. nieswoistych chorób zapalnych jelit (IBD), przewlekłej niewydolności serca oraz chorobie Parkinsona. Udokumentowane zostało działanie przeciwnowotworowe enkefalin zarówno cytotoksyczne jak i antyproliferacyjne. Natomiast odwracalny efekt przeciwnowotworowy enkefalin stanowi podstawę do podjęcia badań zmierzających ku określeniu potencjału przeciwnowotworowego analogów endogennych enkefalin odpornych na działanie antagonistów receptorów opioidowych.

PODZIĘKOWANIA

Praca finansowana z BMN 2016: 538-8646-B086-15, 538-8646-B086-16.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] E.J. Simon, M.J. Hiller, I. Edelman, Proc. Natl. Acad. Sci., 1973, **70**, 1947.
- [2] B.L. Kieffer, Prog. Neurobiol., 2002, **66**, 5.
- [3] J. Hughes, Brain Res., 1975, **88**, 295.
- [4] A. Koneru, S. Satyanarayana, S. Rizwan, Global J. Pharmacol., 200, **3**, 149.
- [5] A.T. Slominski, M.A. Zmijewski, B. Zbytek, A.A. Brozyna, J. Granese, A. Pisarchik, A. Szczesniewski, D.J. Tobin, J. Invest Dermatol., 2011, **131**, 613.
- [6] K. Brogden, J. Guthmiller, M. Salzet, M. Zasloff, Nat. Immunol., 2005, **6**, 558.
- [7] C. Janice, P.D. Froehlich, Res. Health, 1997, **2**, 132.
- [8] G. Klupińska, E. Walecka-Kapica, A. Moskwa, Terapia, 2005, **6**, 45.
- [9] B.D. Shivers, R.E. Harlan, G.J. Romano, R.D. Howells, D.W. Pfaff, Proc. Natl. Acad. Sci., 1986, **83**, 6221.
- [10] O.W.V. van den Brink, L.M. Delbridge, F.L. Rosenfeldt, D. Penny, D.S. Esmore, D. Quick, D.M. Kaye S. Pepe, Heart Lung Circ., 2003, **12**, 178.
- [11] A. Janecka, J. Fichna, T. Janecki, Curr Top Med. Chem., 2004, **4**, 1.
- [12] A.M. Konecka, Postęp Biochemii, PWN, Z. Zielińska (Red.), 1980, **26**, 443.
- [13] B. Antkowiak, M. Kowalczyk, Neur. Neurochir. Pol., 1998, **3**, 81.
- [14] S. Tordjman, M. Carlier, D. Cohen, F. Cesselin, S. Bourgoign, N. Colas-Linhart, A. Petiet, F. Perez-Diaz, M. Hamon, P.L. Roubertoux, Behav. Genet., 2003, **33**, 529.
- [15] J.D. Belluzzi, N. Grant, V. Garsky, D. Sarantakis, D.C. Wise, L. Stein, Nature, 1976, **260**, 625.

- [16] H. Mizoguchi, M. Nariti, J.P. Kampine, L.F. Tseng, *Life Sci.*, 1997, **61**, 81.
- [17] G. Feuerstein, A.L. Siren, *Isi Atlas Sci. Pharmacol.*, 1987, 280.
- [18] W. Simon, K. Schaz, U. Ganzen, G. Stock, K.H. Schlorandd, D. Ganzen, *Clin. Sci. Mol. Med.*, 1978, **55**, 237.
- [19] M. Ouellette, L. Brakier-Gingras, *Biochem Biophys. Res. Commun.*, 1988, **155**, 449.
- [20] J.M. Hao, S.W. Rabkin, *Am. J. Physiol.*, 1997, **272**, 885.
- [21] J.L. Martinez, S.B. Weinberger, G. Schultheis, *Behav. Neurol. Biol.*, 1988, **49**, 192.
- [22] L. Finkiewicz-Murawiejska, *Postepy Hig. Med. Dosw.*, 1998, **42**, 543.
- [23] D. Owczarek, D. Cibor, T. Mach, A. Cieśla, K. Pierzchała-Koziec, K. Sałapa, B. Kuśnierz-Cabała, *Adv. Med. Sci.*, 2011, **56**, 158.
- [24] A. Czech, *Przew Lek*, 2003, **6**, 155.
- [25] C.P. Weingarten, M.H. Sundman, P. Hivkey, N. Chen, *Neurosci Biobehav. Rev.*, 2015, **59**, 16.
- [26] P. Huot, S.H. Fox, J.M. Brotchie, *Prog. Neuro.*, 2011, **95**, 163.
- [27] A. Fernandez, M.L. de Ceballos, S. Rose, P. Jenner, C.D. Marsden, *Brain*, 1996, **119**, 823.
- [28] D.B. Jankovic, D. Maric, *Int. J. Neurosci.*, 1990, **51**, 167.
- [29] T. Isayama, P.J. McLaughlin, I.S. Zagon, *Brain Res.*, 1991, **544**, 79.
- [30] M. Salzet, A. Tasiemski, *Dev. Comp.*, 2001, **25**, 177.
- [31] Y. Guo, L. Wang, Z. Zhou, M. Wang, R. Liu, L. Wang, Q. Jiang, L. Song, *Fish Shellfish Immunol.*, 2013; **34**: 1228.
- [32] H. Ohmori, K. Fujii, T. Ssahira, *Cancer Sci.*, 2009, **100**, 497.
- [33] A.J. Murgo, *J. Natl. Cancer Inst.*, 1985, **75**, 341.
- [34] R.E. Faith, A.J. Murgo, *Brain Behav. Immun.*, 1988, **2**, 114.

Praca wpłynęła do Redakcji 12 stycznia 2017

**NOWOCZESNE METODY POZYSKIWANIA
SUBSTACJI BIOLOGICZNIE AKTYWNYCH
PRZY ZASTOSOWANIU REAKCJI
WIELOSKŁADNIKOWYCH ZE SZCZEGÓLNYM
UWZGLĘDNIENIEM REAKCJI UGI**

**NEW METHODS OF RECEIVE BIOLOGICALLY ACTIVE
SUBSTANCES IN MULTICOMPONENT REACTIONS
WITH PARTICULAR FOCUS ON UGI REACTION**

Stanisław Ryng, Izabela Jęskowiak

*Katedra i Zakład Chemii Organicznej, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich
ul. Borowska 211 A, 50-556 Wrocław
e-mail: izabela.jeskowiak@student.umed.wroc.pl*

Abstract

Wykaz stosowanych skrótów

Wprowadzenie

1. Charakterystyka reakcji wieloskładnikowych
2. Metody otrzymywania bibliotek substancji leczniczych
3. Reakcja Ugi
 - 3.1. Substraty i mechanizm przebiegu reakcji
 - 3.2. Środowisko prowadzenia reakcji
 - 3.3. Wybrane przykłady syntezy Ugi

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane



Prof. dr hab. Stanisław Ryng jest kierownikiem Katedry i Zakładu Chemii Organicznej Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu. Absolwentem Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu. Zajmuje się prowadzeniem syntezy nowych związków o potencjalnej aktywności immunosupresyjnej, immunomodulującej, przeciwnowotworowej, przeciwzapalnej i przeciwvirusowej. Autor licznych publikacji i patentów. Organizator Sympozjum „Szkoła Chemii Medycznej”.



Mgr farm. Izabela Jęśkowiak jest doktorantką w Katedrze i Zakładzie Chemii Organicznej Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu. Absolwentką Wydziału Farmaceutycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu. Ukończyła również studia magisterskie na Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego, specjalność Biotechnologia medyczna. W pracy badawczej zajmuje się reakcjami wieloskładnikowymi.

ABSTRACT

In the last decade a change of thought has taken place in the pharmaceutical industry which has led to a renaissance of the Multicomponent reactions (MCRs) [1]. Under the inspiration of diversity-oriented-synthesis (DOS), numerous efforts have been devoted to find powerful synthetic tools for rapidly accessing maximum molecular diversity with minimum cost. In the toolbox enabling DOS for generating molecular libraries, MCRs are now recognized as one of the most useful and powerful strategies [2], which provide the highest number of compounds for the least synthetic effort [3]. Following the rapid progress in the research area of MCRs, widespread application has been found in many different areas such as chemical biology, natural product synthesis, pharmaceuticals as well as agrochemistry [2].

The overall aim of a DOS is to generate a small-molecule collection with a high degree of structural, and thus functional, diversity that interrogates large areas of chemical space simultaneously [4]. In Targed-Oriented Synthesis (TOS) a complex target is transformed into a sequence of progressively simpler structures by formally performing chemical reactions in the reverse-synthetic direction [3].

Special subclasses are isocyanide based MCRs (IMCRs). They are particularly interesting because they are more versatile and diverse than the remaining MCRs. Today most MCRs chemistry performed with isocyanides relates to the classical reactions of Passerini and Ugi (Scheme 1)[5].

In Ugi four-component reaction (U-4CR), carboxylic acids, primary amines and oxo components (aldehydes or ketones) react with isocyanides in polar solvents to obtain α -amino carboxamides (Schemes 2 and 3). Occasionally however, selective conversion of amide groups into other functional groups is desirable for an increase of diversity of the IMCR-derived compounds [6].

In this reaction two substituted amide groups are formed under release of one equivalent of water. Thus, the U-4CR is an atom-economic and environmentally friendly reaction. It was also shown that water can be used as the solvent. This reaction is typically performed by stirring the components for approximately 1 day in small quantities of a protic solvent (e.g. methanol or trifluoroethanol) [7]. The examples of Ugi reactions are described in the Schemes 4–10.

Multicomponent reactions have become attractive tools in modern synthetic organic chemistry. Among their many advantages, they allow the creation of large chemical libraries of diverse, complex molecular structures, starting from simple materials within a short time frame. Not surprisingly, these particular features have made MCRs especially appealing to medicinal chemists [8].

Keywords: multicomponent reactions, Ugi reaction, diversity-oriented synthesis

Słowa kluczowe: reakcje wieloskładnikowe, reakcja Ugi, synteza ukierunkowana na różnorodność

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

DOS	– synteza ukierunkowana na różnorodność (ang. <i>diversity-oriented synthesis</i>)
DCM	– chlorek metylenu
HDAC	– deacetylazy histonowe (ang. <i>histone deacetylase</i>)
HTS	– wysoko wydajny skrining (ang. <i>high-throughput screening</i>)
IMCRs	– reakcje na bazie izocyjanku (ang. <i>isocyanide-based multicomponent reactions</i>)
MCR	– wieloskładnikowa reakcja (ang. <i>multicomponent reaction</i>)
MCRs	– wieloskładnikowe reakcje (ang. <i>multicomponent reactions</i>)
PAs	– poliaminy (ang. <i>polyamines</i>)
P-3CR	– trzyskładnikowa reakcja Passerini (ang. <i>Passerini three-component reaction</i>)
RCM	– reakcja cyklizacji metatetycznej (ang. <i>ring closing metathesis</i>)
TFA	– kwas trifluorooctowy
TFE	– trifluoroetanol
TLC	– cienkowarstwowa chromatografia cieczowa (ang. <i>thin layer chromatography</i>)
TNF	– tetrahydrofuran
TOS	– synteza ukierunkowana na cel (ang. <i>target-oriented synthesis</i>)
U-3CR	– trzyskładnikowa reakcja Ugi (ang. <i>Ugi three-component reaction</i>)
U-4CR	– czteroskładnikowa reakcja Ugi (ang. <i>Ugi four-component reaction</i>)
U-5CR	– pięcioskładnikowa reakcja Ugi (ang. <i>Ugi five-component reaction</i>)

WPROWADZENIE

W ostatniej dekadzie zmiany przebiegające w przemyśle farmaceutycznym doprowadziły do odrodzenia zainteresowania reakcjami wieloskładnikowymi (ang. *multicomponent reactions*, MCRs) zmieniając obszar odkryć nowych leków przy zastosowaniu chemii kombinatorycznej, wysoko wydajnego skriningu (ang. *high-throughput screening*, HTS) oraz analiz genomu i proteomu. Kilka lat temu wydajność otrzymywania substancji w chemii medycznej była stosunkowo niska. Dzisiaj tysiące związków chemicznych może być produkowanych i charakteryzowanych każdego dnia [1].

W 1961 roku została wykazana przydatność MCRs dla tworzenia ogromnych bibliotek związków chemicznych w szczególności z powodu ich efektywności, łatwości automatyzacji, możliwości otrzymywania różnorodnych produktów, a także odkrywania nowych, aktywnych substancji w krótkim czasie [1, 8]. W wielu MCRs kolejność dodawania reagentów nie odgrywa żadnej roli w przeciwieństwie do reakcji dwuskładnikowych [9]. MCRs są jednym z najlepszych dostępnych narzędzi służących do przygotowania ogromnych bibliotek związków chemicznych [3], lecz ograniczonych przez uzyskanie jedno rdzeniowej struktury w kolekcji [5, 10]. Możliwość wprowadzenia wielu atomów reagentów do końcowego produktu oraz jednoczesny dodatek wszystkich składników, a także łatwa procedura oczyszczania sprawia, że ten rodzaj reakcji zasługuje na poświęcenie jemu szczególnej uwagi [3].

Ogólna zasada MCRs jest przedstawiona przez α -aminoalkilację, w której składnik karbonylowy oraz pierwszo- lub drugorzędowa amina zostają poddane addycji elektrofilowej do pozycji bogatej w elektryny. Za pierwszą reakcję wieloskładnikową jest uznana opublikowana w 1850 roku synteza Strecker'a α -aminokwasów z α -aminocyjanków. Jednakże, dwanaście lat wcześniej w reakcji oleju z gorzkich migdałów i amoniaku Laurent oraz Gerhardt wyizolowali słabo rozpuszczalny produkt, który powstał w wyniku MCR. W przeprowadzonej syntezie Strecker'a otrzymano cyjanek amino benzylowy. Jest to metoda uzyskiwania α -aminokwasów oparta na reakcji aldehydów z roztworem cyjanku amonu. W przedstawionej syntezie zastosowano kwas cyjanowodorowy, benzaldehyd oraz amoniak. Natomiast pierwszym istotnym przykładem wykorzystania MCRs w otrzymywaniu substancji naturalnych jest synteza Robisona alkaloidów tropanowych z dialdehydu bursztynowego, metylaminy i dimetyloacetonodikarboksylanu wykonana w 1917 roku [1]. MCRs znalazły również szerokie zastosowanie w syntezie produktów naturalnych [11] i innych ciekawych substancji [12, 13]. Jednakże, pomimo to, nie obserwuje się odpowiednio proporcjonalnego powiększenia rynku farmaceutycznego o nowe leki [14].

Pierwsze MCRs oparte na izocyjankach zostały przeprowadzone przez Passeinięgo (P-3CR) i Ugięgo (U-4CR) odpowiednio w 1921 i 1959. Później opisano wiele wariantów tych reakcji wykorzystujących wyjątkową reaktywność izonitryli [5]. W niniejszej pracy skupiono się głównie na opracowaniu wybranych przykładów.

dów wieloskładnikowej reakcji Ugi, aby przedstawić tendencje w zakresie metodyki przeprowadzania tego typu syntezy.

1. CHARAKTERYSTYKA REAKCJI WIELOSŁADNIKOWYCH

Reakcje wieloskładnikowe to jednoetapowe syntezy, w których stosuje się więcej niż dwa substraty, np. 3,4,7, gdzie większość atomów z początkowych substancji zostaje włączona do końcowego produktu. Wyróżnia się wiele podstawowych reakcji MCRs noszących nazwy ich twórców m.in. Ugi, Passerini, van Reusen, Strecker, Hantzsch, Biginelli i inne [15].

Dömling i Ugi dzielą reakcje MCRs na 3 typy według liczby odwracalnych etapów. W związku z tym, typ I MCRs jest charakteryzowany przez złożoną równowagę pomiędzy wszystkimi reagentami i produktami pośrednimi [3]. W większości przypadków produkty występują jako mieszanina zawierająca półprodukty i/lub początkowe substancje trudne do izolacji. Często, jeśli reakcja jest niepełna mogą wystąpić produkty uboczne prowadzące do dalszych zanieczyszczeń [1]. II wariant syntezy MCRs posiada jeden nieodwracalny etap prowadzący do powstania produktu [3]. Reakcje tego typu są najbardziej korzystne preparatywnie, ponieważ całkowita równowaga jest przesunięta w kierunku produktów w ostatnim etapie nieodwracalnym. Taki typ procesu ma miejsce na przykład w wyniku silnie egzotermicznej reakcji takiej jak $C^{II} \rightarrow C^{IV}$ przebiegającej podczas konwersji izocyjanków oraz w reakcji zamknięcia pierścienia lub aromatyzacji [1]. W syntezie organicznej najbardziej wskazany jest II rodzaj MCRs, do którego należą reakcje Ugi, Passerini i Biginelli. MCRs typu III są sekwencją nieodwracalnych etapów tworzących zazwyczaj reakcje domino lub kaskady [3]. Rzadko występują w chemii preparatywnej. Głównie są to reakcje biochemiczne spowodowane zjawiskami termodynamicznymi lub połączeniem reakcji endotermicznej z egzotermiczną np. sprzężenie ATP. [1].

Za pomocą metody syntezy MCRs otrzymuje się proteazy m.in. serynowe/treoninowe, aspartylowe, cysteinowe i metaloproteazy, a także kinazy, fosfatazy, inhibitory fosfataz, inne enzymy (np. inhibitory cyklooksygenazy, 3'5' fosfodiesterazy nukleotydowe), receptory sprzężone z białkiem G, kanały jonowe (transportery) [15].

2. METODY OTRZYMYWANIA BIBLIOTEK SUBSTANCJI LECZNICZYCH

Reakcje wieloskładnikowe nadały kierunek syntezie bibliotek związków organicznych przez wskazanie początkowych punktów odniesienia dla syntezy ukierunkowanej na różnorodność (ang. *diversity-oriented synthesis*, DOS) [3]. Plan strategii DOS znacznie się różni od tej stosowanej w tradycyjnych syntezach kombinatorycznych. Proste substraty początkowe ulegają przemianie, w nie więcej niż pięciu etapach syntezy, w kolekcję różniących się strukturalnie związków [16–20].

Biblioteki DOS są zazwyczaj mniejszych rozmiarów w porównaniu z komercyjnie dostępnymi bibliotekami. Otrzymane związki są zazwyczaj bardziej skomplikowane strukturalnie i posiadają większy zakres rdzeni szkieletów oraz bogatszą zmienność stereochemiczną [17, 21, 22]. Zatem rozmiar biblioteki to nie wszystko. Decydującym czynnikiem jest różnorodność biblioteki pod względem struktury cząsteczkowej oraz aktywności biologicznej związków [2, 23].

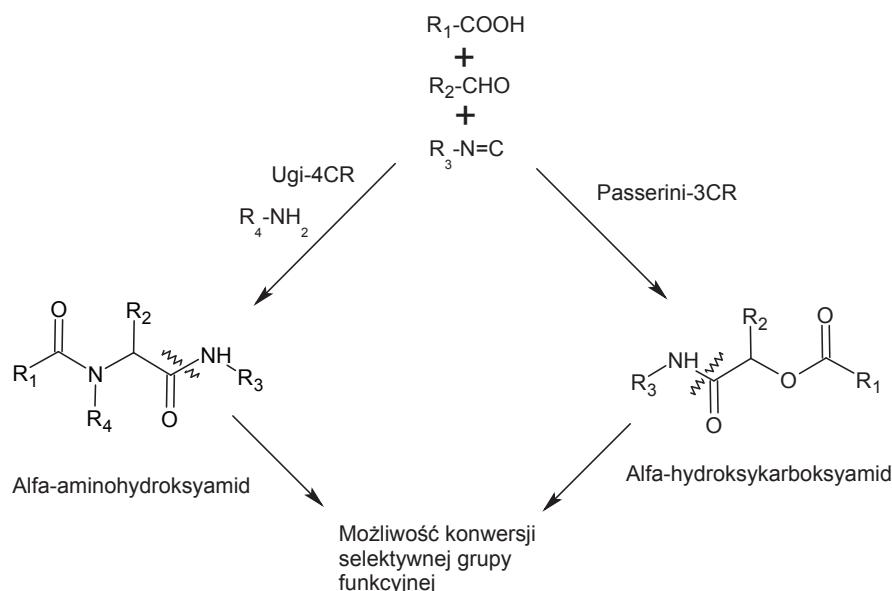
Różnorodność jest bezpośrednio związana z trójwymiarową przestrzenią chemiczną zajmowaną przez składniki kolekcji. Strukturalna różnorodność jest podzielona na cztery główne składowe: (1) uzupełniająca różnorodność – zmienność elementów strukturalnych otaczających główny szkielet (2) różnorodność grup funkcyjnych – zmienność w obecności grup funkcyjnych (3) stereochemiczna różnorodność – zmienność w orientacji potencjalnych makrocząsteczek odpowiadających za interakcje (4) różnorodność szkieletu – obecność wielu różnych szkieletów molekularnych [23, 24].

Wyróżnia się dwie metody tworzenia różnorodności szkieletów w DOS. Pierwsza z nich polega na użyciu powszechnie dostępnych substratów początkowych i różnych reagentów [16, 17], a w drugiej stosuje się różne substancje początkowe oraz uniwersalne warunki reakcji [16–18, 25, 26]. W DOS szczególnie przydatne są pary reakcji, w których produkt jednej reakcji jest substratem dla drugiego procesu [27, 28].

Synteza ukierunkowana na cel (ang. *target oriented synthesis*, TOS) umożliwia dostęp do precyzyjnego obszaru przestrzeni chemicznej, której granice są określane przez naturalną substancję o znany zastosowaniu [29]. TOS posiada długą historię w chemii organicznej. Naturalne produkty są częstym celem syntezy na uniwersytach, podczas gdy w firmach farmaceutycznych są to leki lub kandydaci na leki [27].

3. REAKCJA UGI

Wieloskładnikowe reakcje na bazie izocjanku (ang. *isocyanide-based multi-component reactions*, IMCRs) odgrywają istotną rolę w chemii medycznej i kombinatorycznej. Najlepiej poznanymi IMCRs są 4-składnikowa reakcja Ugi (ang. *Ugi four-component reaction*, U-4CR) i 3-składnikowa reakcja Passerini (ang. *Passerini three-component reaction*, P-3CR). W U-4CR kwasy karboksylowe, pierwszorzędowe aminy i składniki karbonylowe (aldehydy lub ketony) reagują z izocjankami w polarnych rozpuszczalnikach. W wyniku reakcji otrzymywane są α -aminokarboksyamidy jak prezentuje Schemat 1. Odmiennie, P-3CR preferuje rozpuszczalniki niepolarne, a w wyniku tej reakcji uzyskuje się α -hydroksykarboksyamidy. Podczas tworzenia dwóch stabilnych wiązań amidowych w trakcie U-4CR wybiórcze modyfikacje zachodzą tylko w łańcuchach bocznych (R_1-R_4). Natomiast selektywna konwersja grup amidowych w inne grupy funkcyjne przebiega sporadycznie, chociaż jest wskazana ze względu na zwiększoną różnorodność otrzymywanych pochodnych w IMCRs [6].



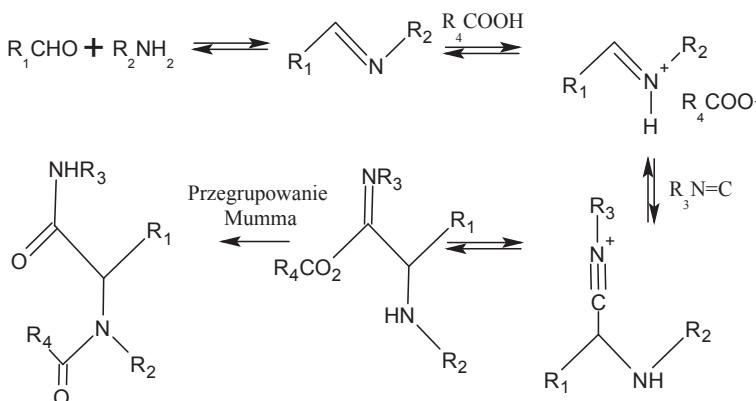
Schemat 1. Porównanie reakcji Ugi i Passerini [6]
Scheme 1. A comparision of the Ugi and Passerini reactions [6]

3.1. SUBSTRATY I MECHANIZM PRZEBIEGU REAKCJI

Przebieg reakcji Ugi jest w większości determinowany przez typ kwasu, a w mniejszym stopniu przez składnik aminowy. Czynnikami decydującymi o różnorodności powstających związków chemicznych w tego typu reakcjach są kwasy z jedną bądź większą ilością grup karboksylowych, kwas węglowy, kwas tiowęglowy, NH_3 , H_2S , HNCO , HNCS i fenol, które prowadzą do powstania α -acyloaminokarboksyamidów, karbaminianów, α -acyloaminotiokarbaminianów, tetrazoli, α -aminoamidów, α -aminoamidów, hydantoin, tiohydantoin i α -aminoaryloamidów [15].

W 1959 roku Ugi i współpracownicy opisali najważniejszy wariant kondensacji czteroskładnikowej, czyli U-4CR. Kwasy karboksylowe, kwas azotowodorowy, cyjaniany, tiocyjaniany, monoestry kwasu węglowego, sole drugorzędowych amin, woda, siarkowodór, jako $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ i selenowodór mogą być składnikiem kwasowym w reakcji U-4CR z ketonami lub aldehydami, a także pierwszo- i drugorzędowymi aminami, hydrazynami albo hydroksyloaminą będącymi składnikami aminowymi oraz C-izocyjankami [1, 30]. Bardzo uproszczony mechanizm reakcji U-4CR z kwasem karboksylowym i składnikiem aminowym w pierwszym etapie polega na kondensacji składnika karbonylowego i aminy z iminą będącą zasadą Schiffa przez utworzenie hydroksyloaminy. Istnieje możliwość transformacji hydroksyloaminy bezpośrednio w przebiegu reakcji bez powstania zasady Schiffa. Iminy mogą być również traktowane, jako reagenty karbonylowe. Jak większość reakcji imin, podob-

nie U-4CR zachodzi lepiej podczas aktywacji w zasadę Schiffa, ponieważ składnik kwasowy protonuje atom azotu zasady Schiffa przez zwiększenie elektrofilowości wiązania C=N. Innym sposobem zwiększenia elektrofilowości imin jest dodatek kwasów Lewisa takich jak TiCl_4 lub $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$. W zależności od rozpuszczalnika jony mogą występować oddziennie lub w postaci soli. Elektrofilowy jon iminy i nukleofilowy anion kwasowy przyłączają się do atomu węgla izocyjanku. Utworzony produkt α -addycji może być odbierany jako heteroanalog bezwodnika kwasowego, w którym zewnętrzny atom tlenu jest podstawiony przez grupę -NR. Bezwodnik kwasowy stanowi czynnik silnie acylującą, a najbliższym atomem ulegającym acylacji jest azot wyjściowej aminy. Po wewnętrzczasteczkowej acylacji i podstawieniu hydroksyiminy następuje przegrupowanie amidu w stabilny produkt Ugi. Ten typ wewnętrzczasteczkowej acylacji po raz pierwszy opisano 1910 roku nadając nazwę przegrupowania Mumma [1]. Mechanizm reakcji Ugi przedstawia Schemat 2 [31]. Wszystkie podstawowe etapy tej sekwencji reakcji są w równowadze, jednakże ostatni etap przegrupowania do stabilnego α -acyloaminoamidu jest przesunięty w dużym stopniu w kierunku produktów. Z tego względu ten typ II MCR znacznie różni się od pozostałych MCRs. Głównym etapem w sekwencji reakcji jest oksydacja atomu C^{II} izocyjanku do atomu C^{IV} amidu [1].

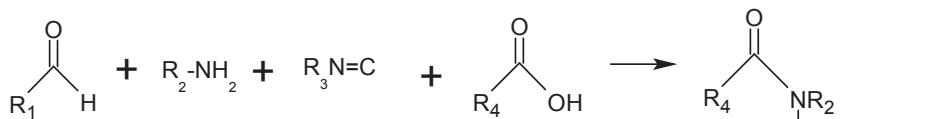


Schemat 2. Mechanizm reakcji Ugi [31]
Scheme 2. Mechanism of the Ugi reaction [31]

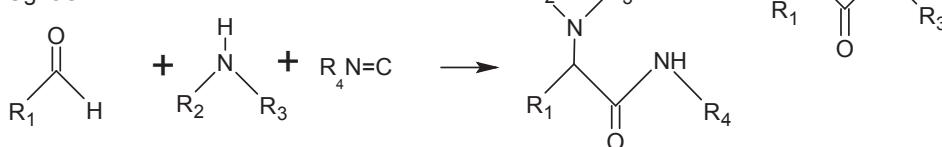
Podczas U-4CR można zaobserwować zmiany w nukleofilowości i elektrofilowości produktów pośrednich. W przebiegu poszczególnych etapów dochodzi kilkukrotnie do zmiany ładunku w centrum składnika kwasowego i imin. Po pierwsze, wiązanie C=N w iminie zachowuje się jak zasada w stosunku do składnika kwasowego. Następnie uprononowana zasada Schiffa funkcjonuje jako elektrofil, a anion kwasu jako nukleofilowy komponent α -addycji. W reakcji α -addycji do izocyjanku, atom azotu aminy staje się nukleofilowym składnikiem w układzie amidu kwasu O-acylokarboksylowego. Podczas cykloaddycji i eliminacji dochodzi do zmiany znaku reaktywności [1].

Reakcja Ugi może być również prowadzona przy braku składnika kwasowego w modelu trzyskładnikowym jak obrazuje Schemat 3 [30]. Ponadto, wyróżnia się też U-5CR będące modyfikacją U-4CR, na której mieszaninę reakcyjną składają się: dwutlenek węgla, alkohol (zazwyczaj metanol), izocyjanek, aldehyd lub keton oraz pierwszorzędowa amina. Sehlinger i współpracownicy dzięki temu typowi reakcji uzyskali pochodne *N*-(alkoksykarbonylo)aminoamidów [32].

Ugi-4CR



Ugi-3CR



Schemat 3. U-4CR i U-3CR [30]

Scheme 3. U-4CR and U-3CR [30]

W konkurencyjnych eksperymentach dotyczących reakcji Ugi wykazano, iż głównie wpływ na reaktywność izocyjanków wywierają efekty indukcyjne i mezomeryczne, a w mniejszym stopniu steryczne. Ponadto, stężenie składników reakcji jest dużo bardziej istotne dla reaktywności niż właściwości zastosowanego rozpuszczalnika [1].

3.2. ŚRODOWISKO PROWADZENIA REAKCJI

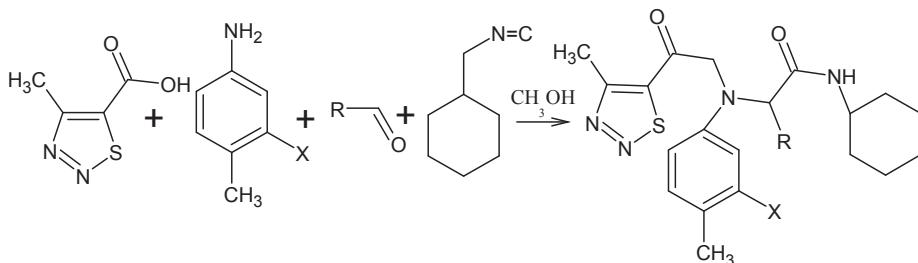
Różnorodność podstawowych struktur U-4CR jest przede wszystkim zależna od składników kwasowych oraz możliwości ich przegrupowań, ale także od struktury amin jak również ogromnej zmienności wewnętrzczasteczkowej. Klasyczna U-4CR może być prowadzona w roztworze oraz w fazie stałej. Jako rozpuszczalnik mogą być stosowane alkohole niskoczasteczkowe takie jak metanol, etanol lub trifluoroetanol (TFE), ale także polarne rozpuszczalniki aprotyczne, do których należą dimetyloformamid (DMF), chloroform, dichlorometan, tetrahydrofuran (THF) bądź dioksan [1]. W dodatku, U-4CR może być wykonana w dwufazowej mieszaninie wodnego rozpuszczalnika [1, 7]. Zazwyczaj reakcja Ugi jest prowadzona przez jeden dzień w małych ilościach protycznego rozpuszczalnika (metanolu lub TFE). Oczekiwany produkt jest najczęściej otrzymywany ze średnią bądź wysoką wydajnością (40–90%) [7]. Egzotermiczna U-4CR zazwyczaj przebiega szybko, w czasie dwóch lub kilku minut w temperaturze pokojowej lub poniżej. Na ogół reakcja zachodzi lepiej, jeżeli reagenty występują w wysokich stężeniach od 0,5 do 2 molo-

wych. Prekondensacja aminy i składnika karbonylowego pozytywnie wpływa na wydajność. Korzystny wpływ na przebieg reakcji może wywierać dodatek kwasów Lewisa. Szczególnie dotyczy to przypadku bogatych w elektryny, słabo elektrofilowych zasad Schiffa [1]. Z powodu wysokiej tolerancji dla innych grup funkcyjnych w reakcji Ugi i spokrewnionych MCRs można stosować szerokie spektrum składników [7].

TiCl_4 służy, jako efektywny katalizator podczas reakcji prowadzonej w metanolu [33]. U-3CR może być katalizowana przez kwas fosfoniowy, podczas gdy nie są efektywne kwasy protonowe lub Lewisa [3], aczkolwiek reakcja Ugi może być katalizowana przez kwasy Brönsteda i Lewisa [30].

3.3. WYBRANE PRZYKŁADY SYNTEZ UGI

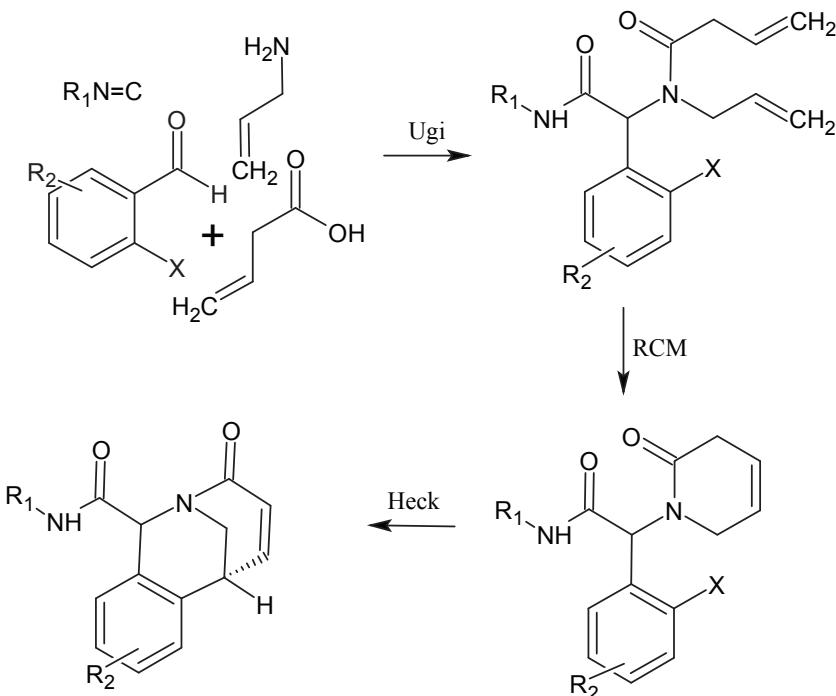
W tym eksperymencie Xiang Zuo i współpracownicy za pomocą reakcji Ugi syntetyzowali pochodne 4-metylo-1,2,3-tiadiazolo-5-karboksyamidowe o potencjalnych właściwościach grzybobójczych oraz przeciwwirusowych. Benzaldehyd został dodany do roztworu 3-chloro-4-metyloaminy w metanolu na łaźni lodowej-wodnej, po czym mieszano 6 godzin w temperaturze pokojowej. Następnie wprowadzono kwas 4-metylo-1,2,3-tiadiazolo-5-karboksylowy, a po 5 minutach dodano na łaźni lodowej izocyjanek cykloheksylowy (Schemat 4). Naukowcy zauważycyli, iż bardzo istotna w przypadku tego typu reakcji Ugi, jest kolejność dodawania poszczególnych składników mieszaniny reakcyjnej. Najpierw dodawano amine i aldehydy, aby otrzymać pośrednią iminę. Potem wprowadzono kwas w określonym odstępie czasu przed izocyjankiem, który zazwyczaj jest niestabilny w kwaśnym środowisku, dlatego należy dodać go, jako ostatniego składnika do mieszaniny reakcyjnej. Niektóre produkty zawierające silnie polarne grupy takie jak nitrowa bądź hydroksylowa nie wytrącają się łatwo w temperaturze pokojowej. Taki proces wymaga kilku dni. Czasami wytrącenie produktu w postaci osadu występuje tylko po usunięciu większości rozpuszczalnika. Ponadto, zaobserwowano również, że reakcja Ugi na wybranych substratach przebiega najwydajniej w wysokich stężeniach substratów, więc stosowano możliwe najmniejsze ilości metanolu [34].



Schemat 4. Schemat syntezy związków uzyskanych przez Xang Zuo i współpracowników z zastosowaniem reakcji Ugi [34]

Scheme 4. Scheme of synthesis compound, which has been obtained by Xang Zuo et al. in the Ugi reaction [34]

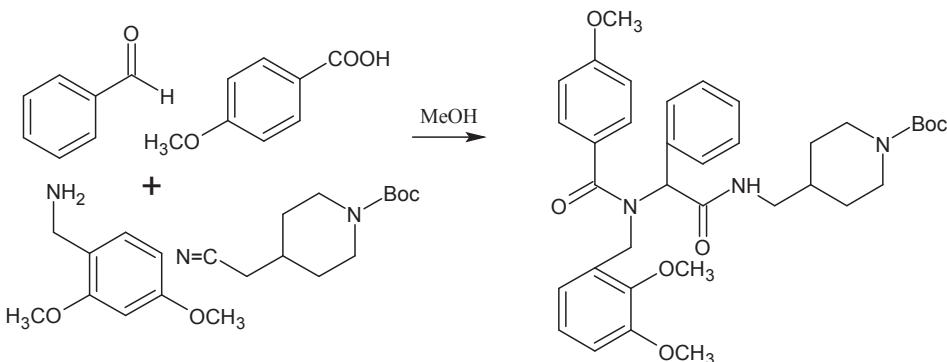
Przykładem chemicznej transformacji MCR w kierunku rzadkich typów szkieletów z niezwykłymi właściwościami fizykochemicznymi jest tworzenie biblioteki związków przez bicykliczne laktamy w sekwencyjnej syntezie Ugi/RCM/Heck. Uzyskane produkty trudno otrzymuje się innymi metodami chemicznymi, a także w znacznie mniejszej ilości oraz różnorodności [16]. Zespół Ribelin'a wykorzystał 4-składnikową reakcję Ugi, po której następuje metataza (w wyniku tej reakcji fragmenty reagujących cząsteczek „zamieniają się miejscami” w skoordynowany sposób inaczej reakcja podwójnej wymiany) zamknięcia pierścienia dla uzyskania nienasyconego laktamu posiadającego zdolność enzymatycznej hydrolizy peptydów. Przy pomocy wysoce diastereosektywnej sekwencji reakcji Ugi/RCM/Heck otrzymano bicykliczne laktamy mostkowe (Schemat 5) [9]. Zazwyczaj reakcje Ugi i RCM czyli reakcja cyklizacji metatyetycznej (ang. *ring closing metathesis*, RCM), zapewniają tworzenie dienów [35, 36] i nienasyconych laktamów [37] odpowiednio od dobrej do znakomitej wydajności [9].



Schemat 5. Sekwencja reakcji Ugi/RCM/Heck prowadząca do otrzymania bicyklicznych laktamów [9]
Scheme 5. Sequence of the Ugi/RCM/Heck reactions leading to receive bicyclic lactams [9]

Sheehan i współpracownicy uzyskali izonitryl z *N*-tert-butoksykarbonylo-4-metyloaminopiperdyny, a następnie przeprowadzili 4-składnikową reakcję Ugi z aldehydami aromatycznymi, kwasem *p*-metoksybenzoëowym oraz 2,4-dimetoksybenzyloaminą (Schemat 6). Otrzymano odwracalne inhibitory czynnika Xa

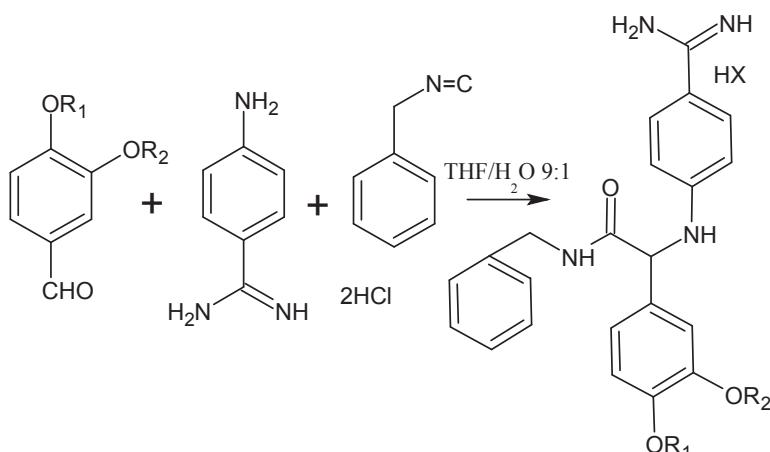
hamujące proces krzepnięcia krwi. Zauważono, że podstawienie w pozycji *ortho* pierścienia fenylowego jedną z grup wyciągających bądź dostarczających elektrony zapewnia znaczne zwiększenie powinowactwa do wiązania [39].



Schemat 6. Uzyskanie inhibitorów czynnika Xa w reakcji Ugi [39]

Scheme 6. Obtainment of Factor Xa inhibitors in the Ugi reaction [39]

Inhibitory czynnika krzepnięcia VIIa w postaci amidów fenyloglicyny zostały zsyntetyzowane przez Groebkego, Zbindenego i współpracowników [40]. Bibliotekę tych związków utworzono w oparciu o 3-składnikową reakcję Ugi przez użycie równomolowych ilości izonitrylu, benzaldehydu i aminy w metanolu jak obrazuje Schemat 7. Na przykład kondensację między benzyloizonitrylem, podstawionym benzaldehydem i amidyną prowadzono w THF/H₂O. Natomiast ester fenyloglicynowy potrzebny do dalszej syntezy pochodnej otrzymano przez kondensację 4-benzyloksy-3-metoksybenzaldehydu, 4-aminobenzonitrylu i benzyloizonitrylu katalizowaną przez kwas Lewisa. Następnie pośredni iminoester poddano hydrolizie przy nadmiarze wody do odpowiedniego estru fenyloglicynowego. Rozdzielenie chromatograficzne diastereoizomerów i konwersja nitrylu do amidyny doprowadziła do pożąданiej pochodnej [40]. W środowisku wodnym bez zastosowania katalizatora przeprowadzono U-3CR. Mieszanina reakcyjna składała się z kwasu 6-aminoheksanowego, aromatycznych aldehydów i pochodnych izocyjanków. W wyniku syntezy w tych warunkach otrzymano *N*-alkilo-2-(2-oksazepan-1-yl)-2-arylooctanoamid [41].



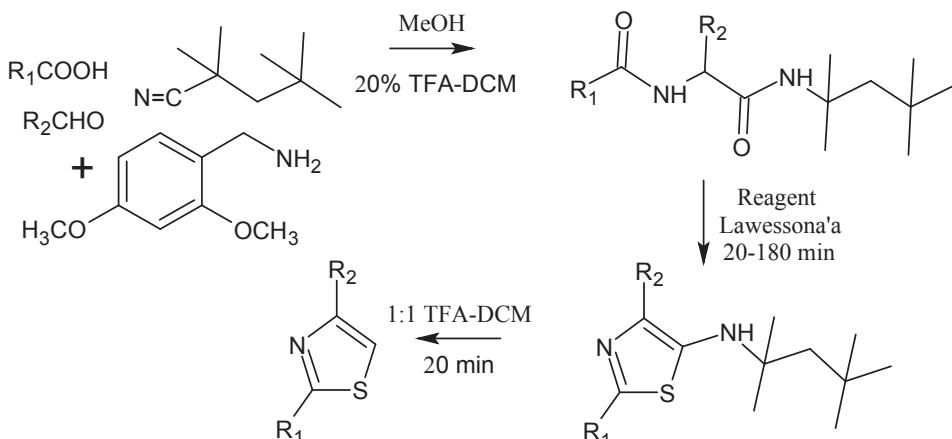
Schemat 7. Otrzymanie fenyloglycyanoamidów o aktywności przeciwwzakrzepowej [40]

Scheme 7. Preparation of phenylglycine amides about antithrombotic activity [40]

Filantotoksyna-12 została uzyskana przez Liu'ego i współpracowników za pomocą syntezy szkieletu α -acyloaminoamidu w U-4CR prowadzonej bez rozpuszczalnika z usunięciem grup ochraniających po użyciu kwasu trifluorooctowego (TFA). Generalnie, U-4CR jest przeprowadzane w rozpuszczalnikach organicznych takich jak metanol czy tetrahydrofuran w temperaturze pokojowej przez 1 do 2 dni. Według klasycznych procedur, metanol jest najlepszym rozpuszczalnikiem dla U-4CR. W tym eksperymencie U-4CR z kwasem karboksylowym, aminą, aldehydem i izocyjankiem prowadzono w różnych warunkach. Podczas reakcji U-4CR w temperaturze pokojowej w metanolu ze względu na zbyt długi czas oraz zastosowany rozpuszczalnik dochodzi do powstania produktów ubocznych. Ponadto, optymalną temperaturą dla prowadzenia tej reakcji było 60°C , a przy niższej temperaturze, na przykład 50°C występowała konieczność wydłużenia czasu reakcji. Kiedy temperatura mieszaniny reakcyjnej osiągnęła wartość powyżej 60°C to obserwowano niską wydajność reakcji [42].

Za pomocą reakcji Ugi mogą być również syntetyzowane α -aminoacyloamidy będące inhibitorami deacetylaz histonowych (ang. *histone deacetylase*, HDAC), które wydają się być obiecujące w leczeniu nowotworów. Reakcję Ugi prowadzono w metanolu w stężeniu 2 M przez 48 godzin pod chłodnicą zwrotną z wydajnością 17–44%. Wykonano kilkanaście prób optymalizacji tej transformacji. Polegały one na zmianie temperatury, rozpuszczalnika (TFE), czasu reakcji (ponad 7 dni) i stosunków molowych reagentów biorących udział w reakcji wieloskładnikowej Ugi. [43]. Można też uzyskać aniliidy fenyloglicynowe, będące inhibitorami deacetylazy histonu, przez hydrolizę estru i przyłączenie N-Boc-1,2-diaminobenzenu. Następnie otrzymany amid może być poddany reakcji Ugi z odpowiednim kwasem i 2,4-dimetyloksybenzylami prowadząc do uzyskania pożądanych inhibitorów HDAC1 [44].

Dzięki reakcji Ugi, Thompson i współpracownicy uzyskali pochodne 5-amino-tiazolowe podstawione w pozycji 2 i 4 pierścienia. Sporządzenie jednej z mieszanin reakcyjnych polegało na dodaniu 2,4-dimetoksybenzyloaminy do roztworu tiofeno-2-karboksaldehydu w metanolu, a po 30 minutowym mieszaniu wprowadzono kwas 4-fluorobenzoëowy w metanolu, a na końcu izocyjanek 1,1,3,3-tetrametylobutylowy (Schemat 8). Tak sporządzoną mieszaninę reakcyjną mieszano przez całą noc w temperaturze pokojowej [45].



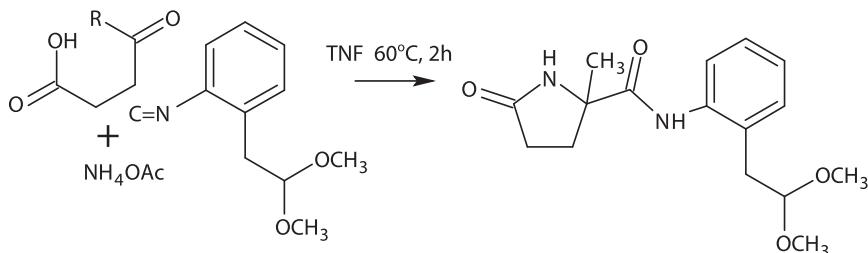
Schemat 8. Synteza pochodnych 5-amino-tiazolowych [45]

Scheme 8. Synthesis of 5-aminothiazoles derivatives [45]

Wieloskładnikowa reakcja Ugi może być stosowana do otrzymywania związków różnorodnych strukturalnie w pozycji 5 pierścienia pirymidyny 2'-deoksyurydyny o aktywności przeciw wirusowi krowianki i przeciw pasożytowi *Leishmania donovani*. Przygotowanie mieszaniny reakcyjnej w tym eksperymencie polegało na rozpuszczeniu 3',5'-di-O-acetylo-5-formylo-2'-deoksyurydyny w metanolu. Do tego roztworu dodano anilinę, przy czym roztwór stopniowo przybierał jasnożółtą barwę. Po 20 minutach dodano kwas benzoëowy i izocyjanek benzylowy. Mieszaninę reakcyjną mieszano w temperaturze pokojowej od 2 do 3 dni. Rozpuszczalnik usunięto pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość rozdzielono na kolumnie chromatograficznej [46].

Kwasy Lewisa mogą służyć do zwiększenia diastereoselektywności w reakcji Ugi. W celu zoptymalizowania diastereoselektywności otrzymywanych pochodnych tiazolowych Wang i współpracownicy zastosowali różne kwasy Lewisa. Pierwszym testowanym kwasem Lewisa był $ZnCl_2$, który nie doprowadził do uzyskania produktu. Natomiast użycie $BF_3 \cdot OEt_2$ wywołało powstanie małej ilości pożądanej, lecz zanieczyszczonego produktu. Zadecydowano o rozdzieleniu mieszaniny MCR 1:1 bez dodatku kwasu Lewisa, dzięki czemu otrzymano większą ilość obydwu enancjomerów naturalnego produktu [47].

Isaacson i współpracownicy uzyskali kwasy piroglutaminowe w reakcji Ugi. 2 mmole octanu amonu dodano do kwasu lewulonowego w TFE. Mieszaninę reakcyjną ogrzewano w 60°C. Po 30 minutach dodano 1-izocyjano-2-(2,2-dimetoksycyto)benzen kontynuując ogrzewanie w 60°C do momentu zaniku izocyjanku w TLC tj. około 2 godziny (Schemat 9). Następnie odparowano rozpuszczalnik, a pozostałość przemyto wodą, a potem octanem etylu. Przemyto solanką Na₂SO₄, a później jej stężonym roztworem [48].



Schemat 9. U-3CR prowadząca do kwasów piroglutaminowych [48]

Scheme 9. The U-3CR leading to obtain pyroglutamic acids [48]

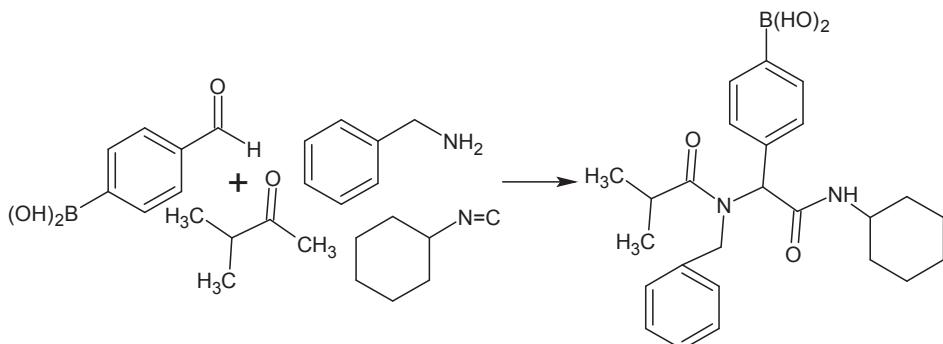
Otrzymywanie niesymetrycznych poliamin (ang. *polyamines*, PAs) zazwyczaj jest problematyczne ze względu na długi proces syntezy i brak regioselektywności. Reakcja Ugi izocyjanku butylowego, *N,N*-dibenzylo-1,3-propandiaminy, para-formaldehydu i *N*-acetylo- β -alaniny w metanolu pod chłodnicą zwrotną przez 16 godzin prowadzi do uzyskania pożądanych poliamidów [49].

Opisano również efektywną i prostą syntezę teterazolo-zabezpieczonych benzodiazepin i benzodiazepinonów obejmującą reakcję Ugi z użyciem azydku, który odgrywa rolę nukleofila. Do reakcji pobrano drugorzędowe aminy cykliczne i mrówczan metylu, a także azydek trimetylosilanu oraz izocyjanek. Rozpuszczalnikiem był TFE. Niska nukleofilowość TFE sprawia, że jest on polarnym, protycznym rozpuszczalnikiem odpowiednim dla reacji Ugi, podczas gdy metanol nie jest zdolny do ataku pośredniej elektrofilowej zasady Schiffa. Reakcje prowadzono w temperaturze pokojowej przez 24 godziny [50].

Syntezą dwucyklicznych 2,6-diketopiperazyn za pomocą 4-składnikowej reakcji Ugi polegała na mieszaniu sporzązonego roztworu α -aminokwasu i aromatycznego aldehydu w metanolu w obecności chlorku żelaza(III) i izocyjanku przez 24 godziny pod chłodnicą zwrotną. Diastereometryczna mieszanina została oczyszczona [51].

Schemat 10 obrazuje syntezę analogów kwasu aryloborowego w reakcji Ugi kwasu formylofenyloborowego, kwasu izomasłowego, benzyloaminy i izocyjanku cykloheksylowego. Czas prowadzonej syntezy i jej wydajność różniły się w zależności od zastosowanego rozpuszczalnika. Na przykład w ciągu 1 godziny reakcja ta przebiegała z różną wydajnością dla rozpuszczalnika, którym była woda (20%), eter (49%), DCM (30%) i metanol (73%). Natomiast przy wydłużeniu czasu reakcji

w metanolu do 5 godzin wydajność (76%) nie różniła się znacząco od efektywności reakcji prowadzonej przez 1 godzinę (73%) w tym rozpuszczalniku [52].



Schemat 10. Schemat syntezy analogów kwasu aryloborowego [52]

Scheme 10. Scheme of arylboronic acid analogues [52]

PODSUMOWANIE

Dwadzieścia lat temu chemia MCRs była niedoceniana i rozważano jej użycie tylko dla otrzymania specyficznej klasy substancji. Od niedawna jest powszechnie stosowana i pozwala na szybką oraz efektywną syntezę substancji z ogromną liczbą podstawników przypadających na podstawowy szkielet uzyskanych związków. Charakterystyka trójwymiarowego ułożenia grup chemicznych wspólnych dla związków aktywnych stanowi szczególną wartość dla odkryć nowych substancji bioaktywnych. Co więcej, w wyniku MCRs można pozyskać produkty enancjomeryczne. Chemia MCRs może być z korzyścią zastosowana do poszukiwania jak i produkcji nowych związków chemicznych [53]. Dowodem wielostronności MCRs, a zarazem uniwersalności jest wieloskładnikowa reakcja Ugi, której przykłady syntezy przedstawiono w niniejszej pracy.

Syntesa organiczna, zwłaszcza synteza ukierunkowana na różnorodność prawdopodobnie odegra decydującą rolę w odkryciach leków w przyszłości [27]. Bardzo ważny do zaakcentowania jest fakt, że końcowy sukces każdej biblioteki jest determinowany przez biologiczne znaczenie uzyskanych substancji [14, 16, 17]. Jeżeli biblioteka powstała w wyniku MCRs nie wykazuje wypadkowej aktywności biologicznej, wtedy uznana jest za pustą, bez względu na to, jaką różnorodnością strukturalną charakteryzowałyby się otrzymane ziązki [16, 17, 23].

PIŚMIENIĘTWO CYTOWANE

- [1] A. Dömling, I. Ugi, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2000, **39**, 3168.
- [2] J. Wan, Y. Zhou, Y. Liu, Z. Fang, C. Wen, *Chin. J. Chem.*, 2014, **32**, 219.
- [3] J.E. Biggs-Houck, A. Younai, J.T. Shaw, *Chem. Biol.*, 2010, **14**, 371.
- [4] R.J. Spandl, A. Bender, D.R. Spring, *Org. Biomol. Chem.*, 2008, **6**, 1149.
- [5] A. Dömling, *Chem. Rev.*, 2006, **106**, 17.
- [6] O. Kreye, C. Trefzger, A. Sehlinger, M.A.R. Meier, *Macromol. Chem. Phys.*, 2014, **215**, 2207.
- [7] O. Kreye, O. Türünç, A. Sehlinger, J. Rackwitz, M.A.R. Meier, *Chem. Eur. J.*, 2012, **18**, 5767.
- [8] M. Dawidowski, S. Sobczak, M. Wilczek, A. Kulesza, J. Turło, *Mol. Divers.*, 2014, **18**, 61.
- [9] T.P. Ribelin, A.S. Judd, I. Akritopoulou-Zanze, R.F. Henry, J.L. Cross, D.N. Whittern, S.W. Djuric, 2007, **9**, 5119.
- [10] S.L. Schreiber, *Nature*, 2009, **457**, 153.
- [11] B.B. Touré, D.G. Hall, *Chem. Rev.*, 2009, **109**, 4439.
- [12] A. Dondoni, A. Massi, *Acc. Chem. Res.*, 2006, **39**, 451.
- [13] L.A. Wessjohann, D.G. Rivera, O.E. Vercillo, *Chem. Rev.*, 2009, **109**, 796.
- [14] D.J. Newman, G.M. Cragg, *J. Nat. Prod.*, 2007, **70**, 461.
- [15] A. Dömling, W. Wang, K. Wang, *Chem. Rev.*, 2012, **112**, 3083.
- [16] W.R.J.D. Galloway, A. Bender, M. Welch, D.R. Spring, *Chem. Commun.*, 2009, 2446.
- [17] W.R.J.D. Galloway, D.R. Spring, *Exp. Opin. Drug Discov.*, 2009, **4**, 467.
- [18] M.D. Burke, S.L. Schreiber, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2004, **43**, 46.
- [19] D.R. Spring, *Org. Biomol. Chem.*, 2003, **1**, 3867.
- [20] M.D. Burke, G. Lalic, *Chem. Biol.*, 2002, **9**, 535.
- [21] S. Borman, *Chem. Eng. News: Sci. Technol.*, 2004, **82**, 32.
- [22] D. Lee, J.K. Sello, S.L. Schreiber, *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, **121**, 10648.
- [23] W.R.J.D. Galloway, A. Isidro-Llobet, D.R. Spring, *Nature Commun.*, 2010, **1**, 80.
- [24] C.J. O'Connor, H.S.G. Beckmann, D.R. Spring, *Chem. Soc. Rev.*, 2012, **41**, 4444.
- [25] M.D. Burke, E.M. Berger, S.L. Schreiber, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**, 14095.
- [26] H. Oguri, S.L. Schreiber, *Org. Lett.*, 2005, **7**, 47.
- [27] S. Schreiber, *Science*, 2000, **287**, 1964.
- [28] D.A. Heerding, D.T. Takata, C. Kwon, W.F. Huffman, J. Samanen, *Tetrahedron Lett.*, 1998, **39**, 6815.
- [29] C. Lipiski, A. Hopkins, *Nature*, 2004, **432**, 855.
- [30] W. Zhao, L. Huang, Y. Guan, W.D. Wulff, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2014, **53**, 3436.
- [31] H. Mehrabi, T. Saleki, *J. Che. Res.*, 2015, **39**, 195.
- [32] A. Sehlinger, R. Schneider, M.A.R. Meier, *Macromol. Rapid Commun.*, 2014, **35**, 1866.
- [33] T. Godet, Y. Bonvin, G. Vincent, D. Merle, A. Thozet, M.A. Ciufolini, *Org. Lett.*, 2004, **6**, 3281.
- [34] X. Zuo, N. Mi, Z. Fan, Q. Zheng, H. Zhang, H. Wang, Z. Yang, *J. Agric. Food Chem.*, 2010, **58**, 2755.
- [35] B. Beck, G. Larbig, B. Mejat, M. Magnin-Lachaux, A. Picard, E. Herdtweck, A. Dömling, *Org. Lett.*, 2003, **5**, 1047.
- [36] A. Basso, L. Banfi, R. Riva, G. Guanti, *Tetrahedron*, 2006, **62**, 8830.
- [37] J.D. Sunderhaus, C. Dockendorff, S.F. Martin, *Org. Lett.*, 2007, **9**, 4223.
- [38] K. Paulvannan, *Tetrahedron Lett.*, 1999, **40**, 1851.
- [39] S.M. Sheehan, J.J. Masters, M.R. Wiley, S.C. Young, J.W. Liebeschuetz, S.D. Jones, C.W. Murray, J.B. Franciskovich, D.B. Engel, W.W. Weber, J. Marimuthu, J.A. Kyle, J.K. Smallwood, M.W. Farren, G.F. Smith, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2003, **13**, 2255.

- [40] K. Groebke Zbinden, D.W. Banner, J. Ackermann, A. D'Arcy, D. Kirchhofer, Y.H. Ji, T.B, Tschoop, S. Wallbaum, L. Weber, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2005, **15**, 817.
- [41] M.A. Rasouli, M. Mohammad, P.R. Ranjbar, M. Saeedi, A. Shafiee, A. Foroumadi, *Tetrahedron Lett.*, 2012, **53**, 7088.
- [42] N. Liu, S. Cao, J. Wu, J. Yu, L. Shen, X. Feng, X. Qian, *Tetrahedron*, 2008, **64**, 3966.
- [43] A.A Grolla, V. Podestà, M.G. Chini, S. Di Micco, A. Vallario, A.A Genazzani, P.L. Canonico, G. Bifulco, G.C. Tron, G. Sorba, T. Pirali, *J. Med. Chem.*, 2009, **52**, 2776.
- [44] J.L. Hubbs, H. Zhou, A.M. Kral, J.C. Fleming, W.K. Dahlberg, B.L. Hughes, R.E. Middleton, A.A. Szewczak, J.P. Sechrist, T.A. Miller, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2008, **18**, 34.
- [45] M.J. Thompson, B. Chen, *Tetrahedron Lett.*, 2008, **49**, 5324.
- [46] X. Fan., X. Zhang, C. Bories, P.M. Loisean, *Bioorg. Chem.*, 2007, **35**, 121.
- [47] W. Wang, S. Joyher, K.A. Sameer Khoury, A. Dömling, *Org. Biomol. Chem.*, 2010, **8**, 529.
- [48] J. Isaacson, C.B. Gilley, Y. Kobayashi, *J. Org. Chem.*, 2007, **72**, 3913.
- [49] T. Pirali, G. Callipari, E. Ercolano, A.A. Genazzani, G.B. Giovenzana, G.C. Tron, *Org. Lett.*, 2008, **10**, 4199.
- [50] S. Gunawan, M. Ayaz, F. De Moliner, B. Frett, C. Kaiser, N. Patrick, Z. Xu, C. Hulme, *Tetrahedron*, 2012, **68**, 5606.
- [51] M. Dawidowski, F. Herold, M. Wilczek, J. Turło, A. Chodkowski, A. Gomółka, J. Kleps, *Tetrahedron*, 2012, **68**, 8222.
- [52] R.C. Lian, M.H. Lin, P.H. Liao, J.J. Fu, M.J. Wu, Y.C. Wu Y, F.R. Chang, C.C. Wu, P.S. Pan, *Tetrahedron*, 2014, **70**, 1800.
- [53] S.M. Bauer, R.W. Armstrong, *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, **121**, 6355.

Praca wpłynęła do Redakcji 12 stycznia 2017

ALDITOLE I ANHYDROALDITOLE

ALDITOLS AND ANHYDROALDITOLS

**Karol Sikora^{1,2}, Justyna Samaszko-Fiertek¹,
Rafał Ślusarz¹, Beata Liberek¹, Janusz Madaj¹,
Barbara Dmochowska^{*1}**

¹ Wydział Chemii Uniwersytetu Gdańskiego
ul. Wita Stwosza 63, 80-308 Gdańsk

² Wydział Farmaceutyczny Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
Al. Gen. Hallera 107, 80-416 Gdańsk
*e-mail: basia.dmochowska@ug.edu.pl

Abstract

Wykaz stosowanych skrótów

Wprowadzenie

1. Alditole jako składniki strukturalne aktywnych biologicznie związków
2. Zastosowanie alditoli w syntezie polimerów
3. Metody syntezy alditoli oraz anhydroalditoli

Uwagi końcowe

Podziękowania

Piśmiennictwo cytowane

Dr Barbara Dmochowska w roku 1994 ukończyła studia chemiczne na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego w Gdańsku. Jest adiunktem w Pracowni Chemii Cukrów na Wydziale Chemii UG. Tematyka badawcza: tworzenie czwartorzędowych soli *N*-D-glikoamoniowych i alditoliloamoniowych z udziałem amin o potencjalnych właściwościach biologicznych.

Dr hab. Beata Liberek, prof. nadzw. UG, ukończyła studia chemiczne na Wydziale Matematyki, Fizyki i Chemii Uniwersytetu Gdańskiego. Pracę doktorską obroniła w roku 1998, a stopień doktora habilitowanego uzyskała w roku 2009. W latach 1996–1998 asystent, 1998–2009 adiunkt, a od roku 2009 profesor nadzwyczajny UG, Wydział Chemii Uniwersytetu Gdańskiego. Od roku 2014 kieruje Pracownią Glikochemii. Jest współautorką kilkudziesięciu prac naukowych, głównie z dziedziny chemii węglowodanów.

Dr hab. Janusz Madaj, prof. nadzw. UG, ukończył studia chemiczne na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego w roku 1989. W tym samym roku podjął pracę w Zakładzie Chemii Cukrów UG. Stopień doktora nauk chemicznych uzyskał w roku 1995. W latach 1997–8 odbył staż naukowy w Case Western Reserved University w Cleveland, Ohio USA w grupie profesora Vincenta M. Monnier. W roku 2004 uzyskał stopień doktora habilitowanego nauk chemicznych po przedstawieniu rozprawy na temat: „Badania dróg tworzenia i przemian wybranych związków cukrowych”. Jego aktualne zainteresowania naukowe skupiają się na chemii organicznej ze szczególnym uwzględnieniem chemii węglowodanów. Ostatnio swoje prace koncentruje na badaniach mechanizmu oddziaływania wankomycyny ze ścianą komórkową bakterii Gram-dodatnich oraz wpływem na to oddziaływanie fragmentów cukrowych.

Dr Justyna Samaszko-Fiertek w roku 2004 ukończyła Wydział Chemii Uniwersytetu Gdańskiego w Gdańsku. Stopień doktora nauk chemicznych uzyskała w roku 2010. Jest adiunktem w Pracowni Chemii Cukrów na Wydziale Chemii UG. Tematyka badawcza: badanie mechanizmu oddziaływania wankomycyny ze ścianą komórkową bakterii Gram-dodatnich, opracowanie metod syntezy nowych pochodnych antybiotyków glikopeptydowych.

Mgr Karol Sikora w roku 2010 ukończył studia magisterskie na Wydział Chemii Uniwersytetu Gdańskiego w Gdańsku - na kierunku chemia, specjalność chemia biologiczna. Tematyka badawcza: synteza, oczyszczanie oraz analiza struktury pochodnych cukrów oraz czwartorzędowych soli amoniowych pochodnych alditoli oraz cukrów. Obecnie zatrudniony na stanowisku asystenta w Katedrze i Zakładzie Chemii Nieorganicznej, Wydziału Farmaceutycznego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

Dr Rafał Ślusarz ukończył studia chemiczne na Uniwersytecie Gdańskim. Także na Wydziale Chemii UG, w 2004 roku uzyskał stopień doktora nauk chemicznych, po obronie rozprawy pt. „Symulowanie dynamiką molekularną blokowania i aktywacji receptorów sprzężonych z białkiem G”. Obecnie zajmuje się badaniem zmian konformacyjnych układów cukrowych i glikoproteinowych podczas swoistego oddziaływania z fragmentami konstrukcyjnymi komórek bakteryjnych oraz enzymami organizmów wyższych metodami modelowania molekularnego. Jego warsztat pracy obejmuje dynamikę molekularną, analizę statystyczną, optymalizacje, dokowania oraz badanie oddziaływań międzymolekularnych.

ABSTRACT

Alditols belong to the group of acyclic polyols. Formally, they are obtained from the aldose or ketose by reduction of the carbonyl group. Single or double dehydration of alditols provides the cyclic compounds named anhydroalditols and dianhydroalditols, respectively.

Alditols and anhydroalditols are widespread in both animal and plant kingdoms. They are in human blood and urine, and in the amniotic and cerebrospinal fluids.

Herein the applications of alditols and anhydroalditols in medicine and human nutrition are presented. (For example D-mannitol is used as a diuretic agent or in osmotherapy to reduce acutely raised intracranial pressure; isosorbide mononitrate is used against angina pectoris. Xylitol (pentitol) can counteract several diseases, among others, the acute *otitis media*, osteoporosis, tooth decay and helps the remineralization of teeth, thanks to that it found use as an additive to chewing gum [4]. Most alditols including D-mannitol, D-glucitol and 1,4-anhydro-D,L-galactitol, are used as sweeteners and as well as additives for low caloric food or as diets for diabetes. Although they show lower sweetness than glucose or saccharose, their great advantage is that it does not cause a rapid increase of glucose level in blood [5,6]. While nitrates 1,4:3,6-dianhydro-D-mannitol and 1,4:3,6-dianhydro-D-glucitol thanks to the ability of blood vessels relaxant are commonly used for years in the treatment of heart diseases and blood system [10]). It is demonstrated that introduction of alditol or anhydroalditol to biologically active compound may improve its activity. Anhydroalditols are also useful substrates for the stereospecific synthesis of bicyclic compounds. Additionally, alditols and anhydroalditols are promising monomers for synthesis of polymers with interesting properties.

Finally, methods of alditols and anhydroalditols syntheses are presented. Among them we consider: cyclization in an acid medium involving intramolecular dehydration, S_N2 reaction with suitable leaving groups, deamination reaction combined with reduction, reduction of glycosyl halide, tioglycoside and glycoside, and addition of water or hydrogen to the double bond in glycals.

Keywords: alditol, anhydroalditol, dianhydroalditol

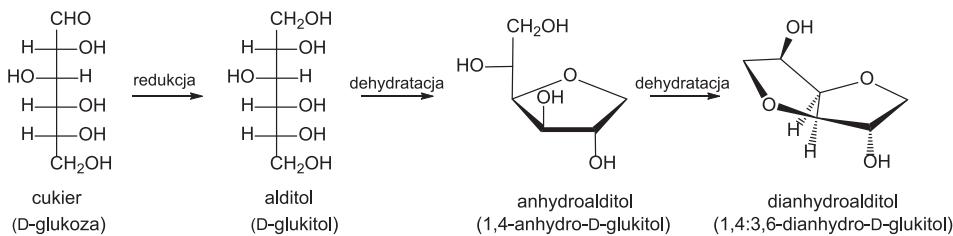
Słowa kluczowe: alditol, anhydroalditol, dianhydroalditol

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

Ac	– acetyl
AIBN	– 2-(2-cyjanopropan-2-ylodiazenylo)-2-metylopropa-nonitril
Bn	– benzyl
Et	– etyl
HIV	– ludzki wirus niedoboru odporności
Ms	– metanosulfonyl (mesyl)
Ph	– fenył
Tf	– trifluorometanosulfonyl (triflil)

WPROWADZENIE

Alditole to acykliczne poliole, otrzymywane w wyniku redukcji grupy karbonylowej w cukrach, zarówno aldozach jak i ketozach [1]. Jako, że są to pochodne cukrów nazwa alditolu wywodzi się od monosacharydu o danej budowie, poprzez zastąpienie końcówki -oza końcówką -itol. Natomiast anhydro i dianhydroalditole otrzymywane są poprzez pojedyncze (lub podwójne) odwodnienie alditolu, utworzenie wiązania eterowego i powstanie formy pierścieniowej – heterocyklicznej. Dianhydroalditole posiadają dwa wiązania eterowe oraz dwa sprzężone pierścienie heterocykliczne. Na Schemacie 1 przedstawiono przykładowy szlak otrzymywania alditolu, anhydroalditolu i dianhydroalditolu z D-glukozy.



Schemat 1. Otrzymywanie alditolu, anhydroalditolu oraz dianhydroalditolu z D-glukozy

Scheme 1. Preparation of alditol, anhydroalditol and dianhydroalditol from D-glucose

Alditole oraz anhydroalditole rozpowszechnione są zarówno w świecie roślinnym jak i zwierzęcym. W wyniku wielu badań rozpoznano liczne funkcje oraz znaczenie biologiczne niektórych z tych związków. Alditole występują w wielu preparatach medycyny naturalnej, przykładem może być ocet z rośliny sorgo stosowany od wieków w chińskiej medycynie. Zawiera on liczne pochodne cukrów i alditoli, które wykazują czynność przeciw agregacji płytek krwi, w związku z czym przeciwdziałają chorobom sercowo-naczyniowym i udarom [2].

D-Mannitol jest używany jako środek diuretyczny oraz obniżający ciśnienie wewnętrzczaszkowe w urazach głowy. Wykazuje on zdolność do pokonywania bariery krew–mózg, przez co stosowany jest jako dodatek do leków ułatwiających przeniknięcie ich do mózgu. Stosunkowo niedawno odkryto, że D-mannitol może zmniejszać objawy choroby Parkinsona poprzez inhibicję agregacji białek, w tym α-synukleiny [3].

Ksylitol (pentitol) może przeciwdziałać kilkunastu chorobom, między innymi zapalaniu ucha środkowego, osteoporozie, próchnicy a także wspomagać remineralizację zębów, dzięki czemu znalazł zastosowanie jako dodatek do gum do żucia. Ksylitol jako przedstawiciel pentitolu jest wchłaniany przez bakterie próchniczo-twórcze jednak w odróżnieniu od alditoli oraz cukrów o sześciu atomach węgla nie jest metabolizowany. W ten sposób inhibiuje ich wzrost oraz zapobiega zakwaszeniu jamy ustnej [4].

Bardzo często alditole, w tym: D-mannitol, D-glukitol a także 1,4-anhydro-D,L-galaktitol, stosowane są jako słodziki oraz dodatki do żywności niskokalorycznej, np. w dietach diabetyków. Mimo, że wykazują one słodkość niższą niż glukoza czy sacharoza, ich ogromną zaletą jest to, że nie powodują wzrost poziomu glukozy we krwi [5,6].

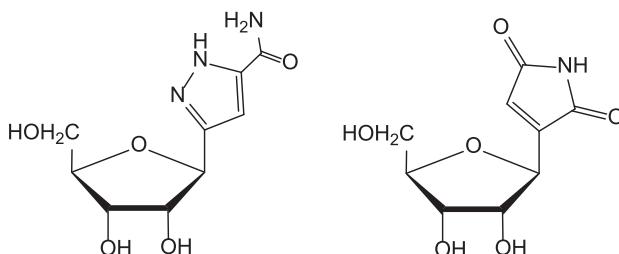
1,5-Anhydro-D-glukitol, który naturalnie występuje we krwi oraz moczu, jest wykorzystywany w diagnostyce jako pierwszy wskaźnik chorób sercowo-naczyniowych [7] oraz cukrzycy [8]. Podanie samego anhydroalditolu pozwala regulować poziom glukozy w trakcie hiperglikemii poprzez obniżenie poziomu glukozy we krwi oraz zwiększenie jej wydalania z moczem [9].

Natomiast, azotany (niesłusznie określane potocznie nitratami) 1,4:3,6-dianhydro-D-mannitolu i 1,4:3,6-dianhydro-D-glukitolu dzięki zdolności rozkurczającej naczynia krwionośne od lat stosowane są powszechnie w leczeniu chorób serca i układu krwionośnego [10].

1. ALDITOLE JAKO SKŁADNIKI STRUKTURALNE ZWIĄZKÓW AKTYWNYCH BIOLOGICZNIE

Istnieje sporo doniesień literaturowych dotyczących korzystnego wpływu dodania jednostki alditolowej do aktywnego biologicznie związku, pozwalającego w znacznym stopniu zmienić właściwości biologiczne.

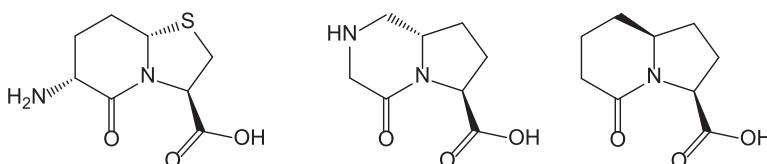
Dużym zainteresowaniem cieszy się wykorzystanie alditoli jako prekursorów w syntezie pseudonukleozydów o aktywności biologicznej: przeciwwirusowej, antybakteryjnej czy przeciwnowotworowej. Najczęstsze modyfikacje to zastąpienie jednostki 2-deoksy-D-rybozy lub D-rybozy w nukleotydach i nukleozydach cząsteczkami 1,5-anhydro-, 2,5-anhydro- oraz 1,4-anhydroalditoli o różnej długości łańcucha węglowodorowego. Związki takie mogą następnie zostać włączone w łańcuch DNA lub RNA. Ważnym czynnikiem w tych procesach jest zdolność wiązania ich przez polimerazy DNA lub RNA, a także ich zdolność do oddziaływań w celu utworzenia par w łańcuchu DNA [11, 12]. Analogi nukleozydów wykazują czynność również w formie niezwiązanej. Przykładem takich związków o strukturze podobnej do nukleozydów są pochodne zaprezentowane na Rysunku 1. Te wyizolowane z bakterii z rodziny *Streptomyces* związki wykazują czynność przeciwbakteryjną, przeciwwirusową oraz przeciwnowotworową [13].



Rysunek 1. Struktura biologicznie aktywnych analogów nukleozydów, pochodnych 1,4-anhydrorybitolu
 Figure 1. Structure of biologically active of nucleosides analogues, derivatives of 1,4-anhydroribitol

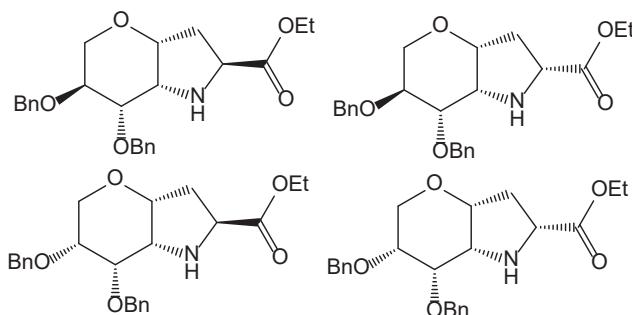
Alditole wykorzystywane są w preparatach farmaceutycznych jako stabilizatory, chronią przed degradacją aktywnych biologicznie związków podczas ich przechowywania oraz zamrażania. W podobny sposób stosowane są pochodne oligogliceroli, których ponadto używa się jako surfaktanty i emulsyfikatory w farmacji i kosmetyce. Pochodne oligogliceroli można otrzymać z anhydroalditoli w tym z 1,5-anhydro-D-mannitolu, 1,5-anhydro-D-galaktitolu oraz 2,5-anhydro-D-mannitolu [14].

Anhydroalditole wykorzystane są jako użyteczne substraty w syntezie aktywnych biologicznie związków. Dzięki swojej budowie, a w szczególności posiadaniu licznych centrów asymetrii są świetną platformą, na bazie której można otrzymać bardzo wiele różnych związków [10]. Na przykład, Ella-Menye i in. [15] w oparciu o anhydroalditole przeprowadzili syntezę analogów usztywnionych bicyklicznych aminokwasów (aeruginozany, Rys. 2), które są częstym motywem strukturalnym, występującym między innymi w związkach pozyskiwanych z organizmów morskich. Związki z tej grupy wykazują właściwości inhibitujące trombiny oraz proteazy serynowe i dlatego stosowane są jako antykoagulanty.



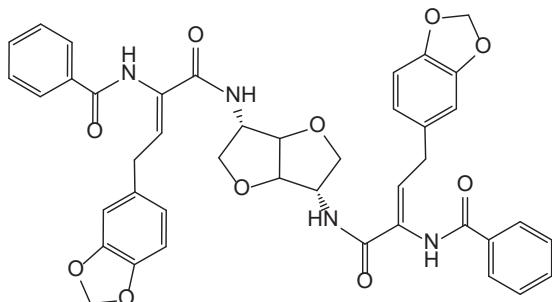
Rysunek 2. Struktura usztywnionych, bicyklicznych aminokwasów występujących w aeruginozanach
 Figure 2. Structure of strained cyclic amino acids found in aeruginosa

Wspomniani autorzy, wychodząc z 1,5-anhydro-D-mannitolu oraz 1,5-anhydro-D-glukitolu, na drodze wieloetapowych syntez otrzymali zaprezentowane na Rysunku 3 ziązki, które mogą być wykorzystane do syntezy związków z grupy aeruginozanów.



Rysunek 3. Struktura analogów bicyklicznych aminokwasów, zsyntezowanych przez Ella-Menye i in. [15]
Figure 3. Structure of cyclic analogues of amino acids, synthesized by Ella-Menye et al. [15]

1,4:3,6-Dianhydroheksitole mogą być wykorzystane również do syntezy mimeptyków aminokwasów. I tak, na przykład 1,4:3,6-dianhydro-D-mannitol użyto do syntezy pseudopeptydów (Rys. 4), które przebadano pod kątem inhibicji proteaz wirusowych, w tym wirusa zapalenia wątroby typu C. Okazało się, że takie pseudopeptydy wykazują czynność przeciwvirusową, poprzez blokowanie proteazy serynowej, która jest niezbędna w replikacji wirusa [16, 17].



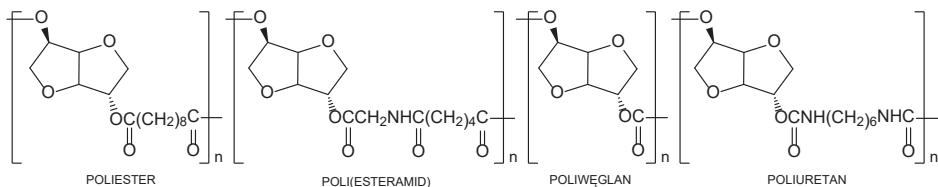
Rysunek 4. Struktura pseudopeptydu pochodzącego od dianhydroheksitolu
Figure 4. Structure of pseudopeptid derived from dianhydrohexitol

Otrzymano także peptyd posiadający przyłączoną jednostkę 2-amino-1,4-anhydro-2-deoksy-D-glukitolu. Modyfikowany peptyd stanowi fragment domeny białkowej wirusa HIV, odpowiedzialnej za łączenie się z komórkami podczas infekcji. W porównaniu z samym peptydem pochodna zawierająca przyłączoną jednostkę 2-amino-1,4-anhydro-2-deoksy-D-glukitolu wykazuje większą stabilność *in vivo* oraz lepsze pobudzanie odpowiedzi immunologicznej i wydzielanie przeciwciał neutralizujących wirus HIV-1 [18].

2. ZASTOSOWANIE ALDITOLI W SYNTEZIE POLIMERÓW

Dzięki dostępności oraz ze względu na pochodzenie ze źródeł naturalnych, niektóre alditole i anhydroalditolowe znalazły zastosowanie w chemii polimerów. Potencjalnie polimery, pochodne alditoli, powinny cechować się lepszymi właściwościami, biokompatybilnością oraz być bardziej przyjazne środowisku, co może pozwolić na ich bardzo szerokie zastosowanie, np. w medycynie.

Szczególne zainteresowanie skierowane jest w stronę wykorzystania 1,4:3,6-dianhydro-D-mannitolu oraz 1,4:3,6-dianhydro-D-glukitolu. Otrzymano liczne kopolimery tych dianhydroheksitoli: poliamidy, poliestry, poli(estroamidy), poli(estroimidły), poliwęglany, poliuretany oraz polieterety (Rys. 5). Spośród nich częściej stosowany jest 1,4:3,6-dianhydro-D-glukitol, który jest znacznie tańszy oraz handlowo dostępny.

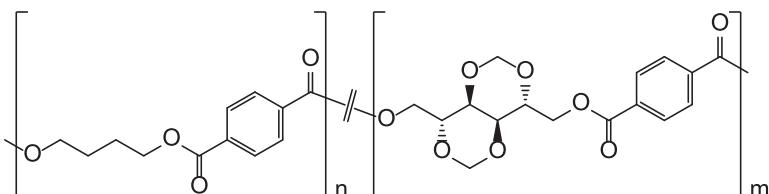


Rysunek 5. Przykładowe kopolimery 1,4:3,6-dianhydro-D-glukitolu

Figure 5. Examples of copolymers of 1,4:3,6-dianhydro-D-glucitol

Otrzymane polimery przeważnie cechowały się bardzo dobrymi właściwościami termicznymi, szczególnie temperaturą zeszklenia a także biodegradowalnością. Zwiększoną odporność termochemiczną spowodowana była sztywnością monomeru dianhydroalditolowego. Jednakże, na chwilę obecną, zastosowanie 1,4:3,6-dianhydro-D-glukitolu jako monomeru jest ograniczone ze względu na niską reaktywność drugorzędowych grup hydroksylowych. Z tego też powodu większość znanych dziś kopolimerów 1,4:3,6-dianhydro-D-glukitolu cechuje się stosunkowo niskimi masami cząsteczkowymi. Wyjątkiem okazały się poliuretany 1,4:3,6-dianhydro-D-glukitolu, które otrzymuje się z dobrymi wydajnościami i wysokimi masami cząsteczkowymi, w stosunku łagodnych warunkach. W większości pozostałych polimerów zwiększenie zawartości monomerów 1,4:3,6-dianhydro-D-glukitolu powyżej 10% (w stosunku molowym) znacznie utrudnia polimeryzację, wymuszając zastosowanie bardziej drastycznych warunków polimeryzacji. Powoduje to częściowy rozkład i ciemnienie otrzymanych polimerów. Pomimo sporych trudności, prace badawcze są kontynuowane i prawdopodobnie niebawem wprowadzone zostaną do użytku materiały zawierające monometry 1,4:3,6-dianhydro-D-heksitolowe. Spory potencjał aplikacyjny mają poliestry 1,4:3,6-dianhydro-D-glukitolu stosowane do pakowania oraz produkcji przedmiotów otrzymywanych metodą wtryskową [19–22].

Podobne prace zostały przeprowadzone z zastosowaniem łańcuchowych alditoli. Otrzymane zostały poliestry, poliamidy a także politereftalany, gdzie zastosowano jednostki alditolowe: D-mannitolu [23,24], L-iditolu [25], L-arabinitolu oraz ksylitolu [26, 27]. Na etapie syntezy omawianych polimerów drugorzędowe grupy hydroksylowe, w celu zapobiegnięcia niepożądanym reakcjom, zostały przekształcone w pochodne eterowe, metylowe a także benzylowe. Następnie, tak otrzymane pochodne poddane zostały reakcjom polimeryzacji. Przykładem może być synteza poliestrów D-mannitolu posiadających mostki metylenowe pomiędzy grupami hydroksylowymi przy atomach węgla 2 i 4 oraz 3 i 5 (Rys. 6).



Rysunek 6. Struktura kopolimeru poli(tereftalan butylenu) oraz D-mannitolu

Figure 6. Structure of copolymer of poly(butylene terephthalate) and D-mannitol

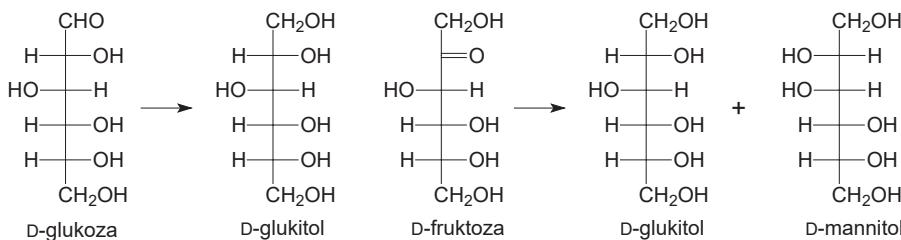
Usztywnienie łańcucha alditolowego powoduje wzrost stabilności termicznej otrzymanych kopolimerów. Zastosowanie D-mannitolu z chronionymi drugorzędowymi grupami hydroksylowymi pozwala na otrzymanie polimerów o wysokich masach cząsteczkowych, porównywalnych z klasycznymi politereftalanami. Wiąże się to z dużo wyższą reaktywnością pierwszorzędowych grup hydroksylowych zaangażowanych w reakcję polimeryzacji, w porównaniu z omawianymi 1,4:3,6-dianydroheksitolowymi monomerami [23].

Mimo sporych wad, polimery zawierające podstawniki alditolowe wciąż znajdują się w centrum zainteresowania i prawdopodobnie w niedługim czasie znajdą zastosowanie ze względu na ich biokompatybilność, wynikającą z zastosowania nietoksycznych jednostek monomerycznych.

3. METODY SYNTEZY ALDITOLI, ANHYDROALDITOLI ORAZ DIANHYDROALDITOLI

Synteza alditoli, anhydro- i diahydroalditoli została w szeroki sposób opisana w literaturze. Alditole będące polihydroksyalkoholami otrzymuje się najczęściej w wyniku reakcji redukcji grupy karbonylowej monoz: aldoz lub ketoz. Najczęściej stosowanymi odczynnikami redukującymi są LiAlH_4 w przypadku środowisk niewodnych lub NaBH_4 dla roztworów wodnych. Mechanizm tych reakcji zakłada redukcję grupy aldehydowej bądź ketonowej przez anion wodorkowy. W wyniku redukcji aldoz powstaje jeden alditol, natomiast w przypadku redukcji ketoz powstają dwa produkty, alditole będące epimerami. Tak więc, redukcja D-glukozy

prowadzi do D-glukitolu, a redukcja D-fruktozy do mieszaniny D-glukitolu i D-mannitolu (Schemat 2).



Schemat 2. Redukcja aldozy (D-glukoza) oraz ketozy (D-fruktoza)

Scheme 2. Reduction of aldose (D-glucose) and ketose (D-fructose)

Metody wykorzystujące wodorki metali są powszechnie stosowne w skali laboratoryjnej. Jednak, w syntezie na skalę przemysłową szersze zastosowanie znalazły metody polegające na redukcji wodorem w obecności odpowiednich katalizatorów (np. Pd/C).

O ile synteza alditoli nie nastręcza specjalnych problemów, to synteza anhydro i dianhydroalditoli jest dużo bardziej skomplikowana. Synteza anhydroalditolu polega na odwodnieniu alditolu i utworzeniu mostka eterowego pomiędzy dwoma fragmentami alditolu. Mnogość grup wodorotlenowych w alditolu powoduje, że dehydratacja, a tym samym cyklizacja alditolu do anhydroalditolu, może przebiegać na różne sposoby prowadząc do powstania wielu izomerów.

W literaturze odnotowano kilka metod syntezy anhydroalditoli. Najczęściej spotykane to:

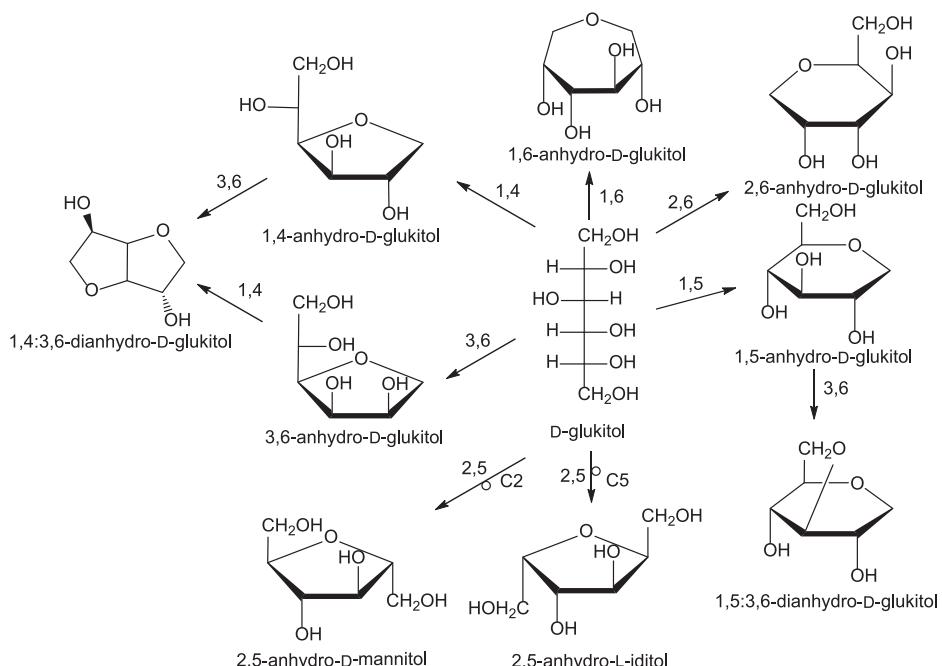
- cyklizacja w środowisku kwaśnym polegająca na wewnętrzczasteczkowej dehydratacji,
- reakcja S_N2 z odpowiednimi grupami odchodzącymi,
- reakcja deaminacji połączona z redukcją,
- redukcja halogeno- i tiopochodnych cukrów oraz glikozydów,
- addycja wody lub wodoru do wiązania podwójnego w glikalach,
- przekształcenie biomasy.

Pierwsza z wymienionych metod, dehydratacja w środowisku kwaśnym, polega na ogrzewaniu roztworu alditolu oraz kwasu. Najczęściej stosowane są kwasy nieorganiczne takie jak kwas siarkowy(VI) lub solny [28–30]. Istnieją doniesienia dotyczące dehydratacji alditoli bez dodatku kwasu, a w obecności zeolitów [31, 32].

Cykliczna dehydratacja w środowisku kwaśnym w wykonaniu jest niezwykle prosta, jednak posiada jedną bardzo ważną wadę. W większości przypadków prowadzi do skomplikowanej mieszaniny produktów. Poza możliwością reakcji pomiędzy różnymi centrami w cząsteczce alditolu, powodującą powstanie różnej wielkości pierścieni heterocyklicznych, pod uwagę należy brać także możliwość zmiany konfiguracji atomu węgla w wyniku reakcji oraz otrzymanie innych produktów, np.:

międzycząsteczkowej dehydratacji lub chloropochodnych, gdy użyty zostanie kwas solny.

Istnieje wiele doniesień dotyczących dehydratacji alditol o różnej wielkości (tetritoli, pentitoli i heksitoli). Jednym z przykładów może być odwodnienie D-glukitolu, D-mannitolu lub galaktitolu prowadzone w 5% roztworze kwasu siarkowego(VI) w temperaturze 200°C opisane przez Wiśniewskiego i in. [28]. Za pomocą kapilarnej chromatografii gazowej ustalili oni skład mieszaniny produktów odwodnienia (Schemat 3).

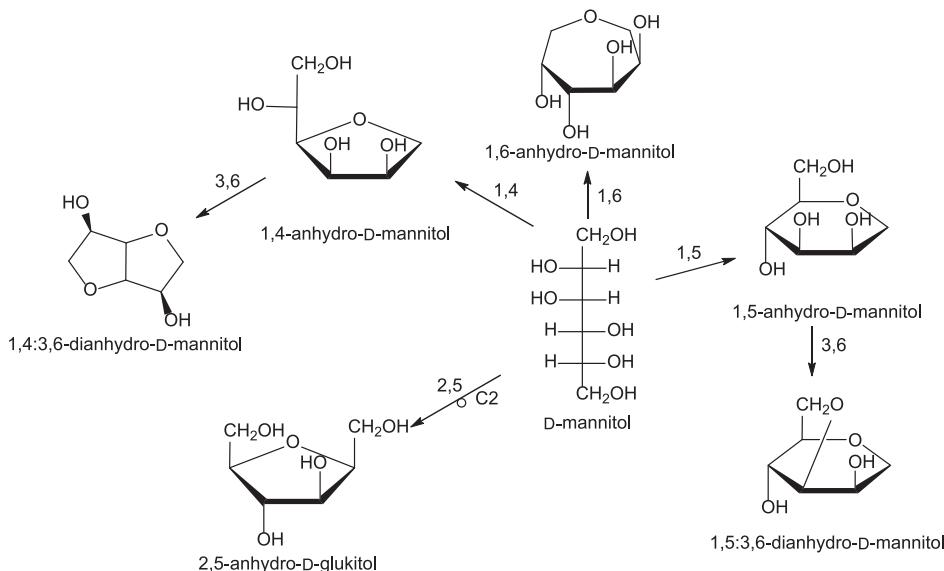


Schemat 3. Możliwe produkty odwodnienia D-glukitolu w środowisku kwaśnym [28]

Scheme 3. Possible dehydration products of D-glucitol in an acidic solution [28]

W wyniku reakcji dehydratacji D-glukitolu (trwającej 30 min.) otrzymano mieszaninę siedmiu produktów składających się z: 1,4-anhydro-D-glukitolu oraz 3,6-anhydro-D-glukitolu z sumaryczną wydajnością 68%, 1,5-anhydro-D-glukitolu oraz 2,6-anhydro-D-glukitolu (około 2%), 2,5-anhydro-L-iditolu (27%), 2,5-anhydro-D-mannitolu (3%) oraz śladowe ilości 1,6-anhydro-D-glukitolu (Schemat 3). Natomiast, w reakcji dehydratacji D-mannitolu otrzymano mieszaninę trzech produktów: 1,4-anhydro-D-mannitolu (37%), 2,5-anhydro-D-glukitolu (61%) oraz 1,5-anhydro-D-mannitolu (2%). Wyniki sugerują, że w opisanych warunkach preferowane jest powstawanie pierścieni pięcioczłonowych (furanozowy) oraz, że możliwa jest zmiana konfiguracji atomu węgla nawet w stosunkowo łagodnych warunkach.

Analogiczne badania wykonano dla D-glukitolu i D-mannitolu, stosując do dehydratacji 3 M kwas siarkowy(VI) [33]. Głównym produktem dehydratacji D-glukitolu w tych warunkach był 1,4-anhydro-D-glukitol, natomiast wydłużenie czasu reakcji prowadziło do dalszej reakcji dehydratacji i powstania 1,4:3,6-dianhydro-D-glukitolu. Z kolei, w przypadku D-mannitolu powstała bardziej złożona mieszanina produktów. Podobnie, jak w przypadku opisanym wyżej, w przewadze powstały produkty o pierścieniu pięcioczłonowym: 1,4-anhydro-D-mannitol oraz 2,5-anhydro-D-glukitol. Zaobserwowało także tworzenie niewielkich ilości 1,5-anhydro-D-mannitolu. Przedłużenie czasu reakcji prowadziło do następnych reakcji dehydratacji i przekształcenia 1,4-anhydro-D-mannitolu w 1,4:3,6-dianhydro-D-mannitol (Schemat 4) [33].

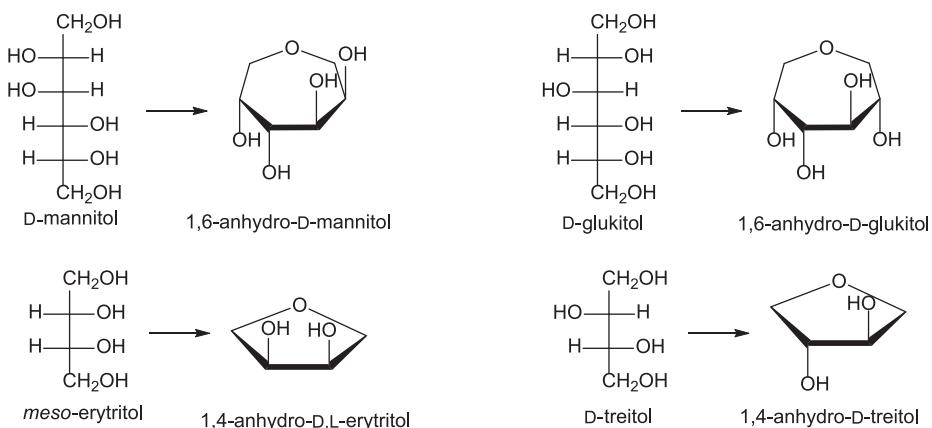


Schemat 4. Wybrane produkty dehydratacji D-mannitolu [33]

Scheme 4. Selected products of dehydration of D-mannitol [33]

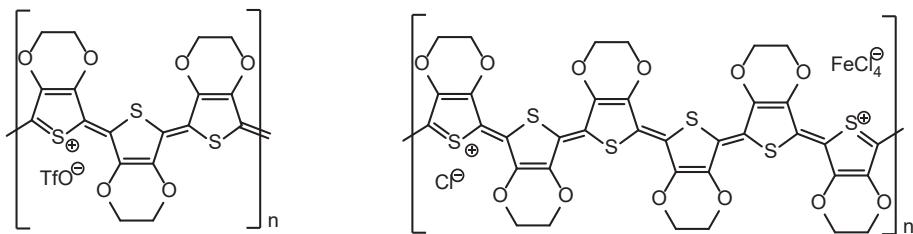
Mechanizm reakcji cykлизacji w środowisku kwaśnym zakłada w pierwszym etapie protonowanie grupy hydroksylowej, a następnie atak nukleofilowy kolejnej grupy hydroksylowej z równoczesnym oderwaniem cząsteczki wody. W ten sposób powstaje wiązanie eterowe. Do zmiany konfiguracji jednostki alditolowej dochodzi w przypadku przebiegu reakcji na asymetrycznym atomie węgla [33].

W dwóch pracach, Onorato i in. [34] oraz Pavlik i in. [35] opisali cyklodehydrację alditoli prowadzącą do pierścieni heterocyklicznych o maksymalnej wielkości. Oznacza to, że z tetritoli otrzymano 1,4-anhydroalditole, a z heksitoli 1,6-anhydroheksitole (Schemat 5). Wydajności otrzymanych produktów wyniosły około 80%. Należy podkreślić, że wcześniej nie opisano tak wydajnych syntez tego typu anhydroalditoli. Zazwyczaj powstawały one w ilościach śladowych.



Schemat 5. Cyklohydratacja alditoli prowadząca do anhydroalditoli o maksymalnej wielkości pierścienia
 Scheme 5. Cyclodehydration of alditols to anhydroalditols with a maximum ring size

W reakcjach tych wykorzystano jako katalizatory: kwas trifluorometanosulfonylowy, kwas *p*-toluenosulfonowy [35] lub polimeryczne katalizatory, których struktura przedstawiona została na Rysunku 7 [34].

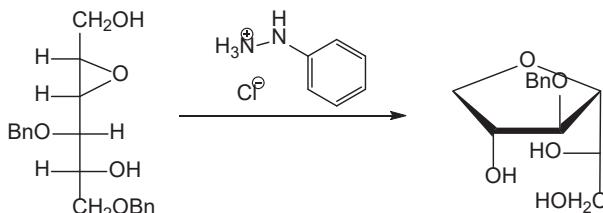


Rysunek 7. Struktura polimerów zastosowanych przez Onorato i in. [33]

Figure 7. Structure of the polymers used by Onorato et al. [33]

Mimo niezaprzeczalnej użyteczności metody prowadzenia odwodnienia alditol za pomocą kwasów, bardziej preferowane są metody prowadzące w sposób selektywny do jednego produktu. Reakcje takie wymagają przeważnie zastosowania substratu częściowo chronionego, zawierającego co najmniej jedną dobrze odchodzącą grupę w reakcji S_N2 . Budowa taka pozwala na lepszą kontrolę rodzaju powstającego anhydroalditolu. Najczęściej wykorzystuje się pochodne alditoli zawierające grupy epoksydowe [36, 37] oraz estry sulfonowe [38–40]. Przykładem wykorzystania grup epoksydowych może być opisana przez Reddy i in. [36] synteza anhydroheksitoli. W reakcji zastosowane zostały alditoły posiadające grupy hydroksylowe przeprowadzone w pochodne benzylowe oraz posiadające mostki epoksydowe pomiędzy drugim i trzecim atomem węgla w jednostce alditolu. Na Schemacie 6 zaprezentowana została jedna z przeprowadzonych syntez. W obecności katalizatora (chlorowodorku fenylohydrazyny) doszło do cyklizacji z rozerwaniem mostka

epoksydowego i utworzeniem 3,6-anhydroheksitolu o pierścieniu furanozowym. W reakcji zamknięcia pierścienia bierze udział terminalna grupa hydroksylowa w postaci pochodnej benzylowej. W trakcie reakcji dochodzi do usunięcia grupy benzylowej i utworzenia wiązania eterowego. Przeprowadzono szereg syntez, gdzie jako substraty zastosowano alditole o różnej konfiguracji, otrzymując produkty z bardzo dobrymi (około 80%) wydajnościami.

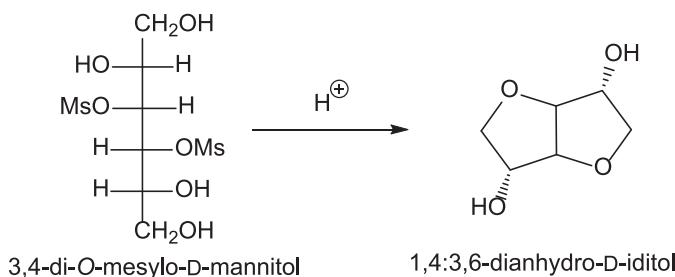


Schemat 6. Synteza 3,6-anhydroalditolu opisana przez Reddy i in. [36]

Scheme 6. Synthesis of 3,6-anhydroalditol described by Reddy et al. [36]

W podobnej reakcji z 1,2:5,6-dianhydro-3,4-di-O-benzylo-D-mannitolu, poprzez rozerwanie mostków epoksydowych, otrzymano 2,5-anhydro-D-glukitol [13].

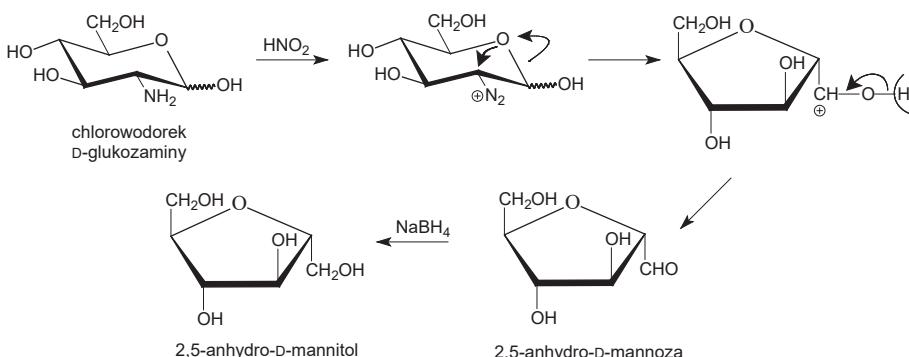
1,4:3,6-Dianhydro-D-iditol otrzymano z 3,4-di-O-mesylo-D-mannitolu. W reakcji w środowisku kwaśnym, dochodzi do powstania ilościowego dianhydroheksitolu o zmienionej konfiguracji atomów węgla C-3 oraz C-4 (Schemat 7) [38].



Schemat 7. Synteza 1,4:3,6-dianhydro-D-iditolu [38]

Scheme 7. Synthesis of 1,4:3,6-dianhydro-D-iditol [38]

Bardzo użyteczną metodą syntezy anhydroalditoli, zarówno wydajną jak i bardzo selektywną, jest reakcja deaminacji D-glukozaminy przy pomocy kwasu azotowego(III), połączona z redukcją ugrupowania aldehydowego. Metoda ta okazała się szczególnie użyteczna w syntezie 2,5-anhydro-D-mannitolu. Do reakcji zastosowano chlorowodorek D-glukozaminy oraz inne pochodne, np. metylowy glikozyd. Jednakże najlepsze wyniki uzyskano dla 2-amino-2-deoksy-D-glukozy. Ogólny schemat reakcji został przedstawiony na poniższym Schemacie 8 [41, 43].



Schemat 8. Synteza 2,5-anhydro-D-mannitolu w reakcji deaminacji D-glukozaminy

Scheme 8. Synthesis of 2,5-anhydro-D-mannitol in deamination reaction of D-glucosamine

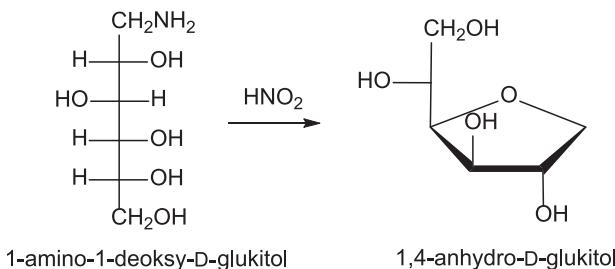
Przeprowadzono szereg reakcji deaminacji połączonych z redukcją dla D-glukozaminy oraz jej pochodnych [41, 42]. Na podstawie przeprowadzonych syntez stwierdzono, że w reakcji tej istotne jest utworzenie formy cyklicznej (piranozowej) D-glukozaminy, występującej w przewadze w roztworze wodnym. Następnie, pod wpływem kwasu azotowego(III) otrzymanego w reakcji kwasu octowego oraz azotynu sodu, grupa aminowa przeprowadzona zostaje w kation diazioniowy. Mechanizm zakłada następnie atak nukleofilowy heterocyklicznego atomu tlenu z jednoczesnym rozerwaniem wiązań: tlen heterocykliczny-węgiel anomeryczny oraz azot-węgiel z utworzeniem wiązania eterowego. Ponieważ reakcja zachodzi według mechanizmu S_N2 powstający produkt ma konfigurację D-manno. W ostatnim etapie grupa aldehydowa zostaje zredukowana przy pomocy NaBH_4 do 2,5-anhydro-D-mannitolu (Schemat 8).

Próby otrzymania 2,5-anhydro-D-glukitolu w podobnej reakcji deaminacji z wykorzystaniem chlorowodorku 2-amino-2-deoksy-D-mannozy nie powiodły się. W reakcji tej zamiast wewnętrzcząsteczkowego ataku nukleofilowego z utworzeniem anhydrozwiązku dochodzi do ataku cząsteczki rozpuszczalnika – wody, co prowadzi do powstania D-glukozy [44]. Zaplanowany produkt otrzymano inną metodą, poprzez zastosowanie do reakcji tlenku rtęci(II) zamiast kwasu azotowego(III). Taki katalizator powoduje powstanie 2,5-anhydro-D-glukozy, którą w dalszych etapach można zredukować do 2,5-anhydro-D-glukitolu [45].

W oparciu o powyższe wyniki Horton i in. [41] wywnioskowali, że reakcja deaminacji zależy zarówno od konfiguracji jak i konformacji jaką przyjmuje jednostka cukrowa. Reakcja wewnętrzcząsteczkowej cyklizacji połączona z deaminacją preferowana jest gdy grupa aminowa (przy drugim atomie węgla) jest w położeniu ekwatorialnym (D-glukozamina), natomiast gdy grupa jest w położeniu aksjalnym dochodzi do przyłączenia cząsteczki wody (D-mannozaamina).

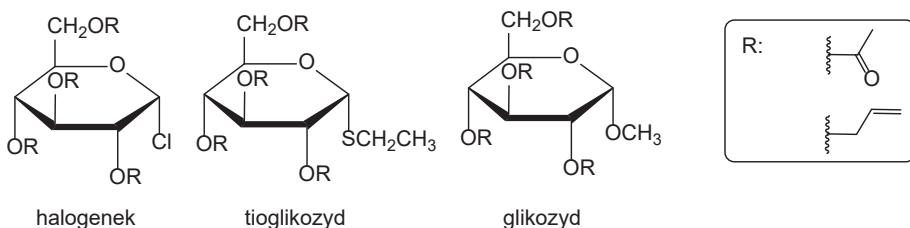
Deaminacja połączona z wewnętrzcząsteczkową cyklizacją znalazła także zastosowanie w syntezie innych anhydrozwiązków a także epoksydowych pochodnych cukrów. Na przykład, z 1-amino-1-deoksy-D-heksitolu otrzymano

1,4-anhydro-D-heksitole (Schemat 9) [46-48]. Z kolei, z 2-amino-1,6-anhydro-4-O-benzylo-2-deoksy- β -D-glukopiranozy uzyskano 1,6:2,3-dianhydro-4-O-benzylo- β -D-mannopiranozę a 1,6:3,4-dianhydro- β -D-galaktopiranozę zsyntezowano z 4-amino-1,6-anhydro-2-deoksy- β -D-glukopiranozy [49].



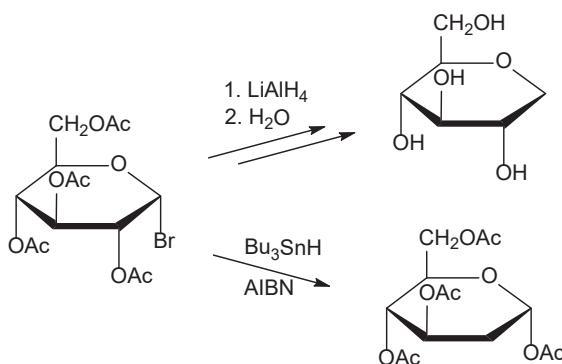
Schemat 9. Synteza 1,4-anhydro-D-glukitolu z 1-amino-1-deoksy-D-glukitolu [46–48]
Scheme 9. Synthesis of 1,4-anhydro-D-glucitol from 1-amino-1-deoxy-D-glucitol [46–48]

Kolejną bardzo użyteczną metodą syntezy 1,4- i 1,5-anhydroalditoli jest substytucja anionem wodorowym z usuwaniem podstawników znajdujących się przy anomerycznym atomie węgla piranoz i furanoz. Najczęściej wykorzystywane są do tego halogenki glikozylu [50], tioglikozydy [51], a także glikozydy [52] (Rys. 8).



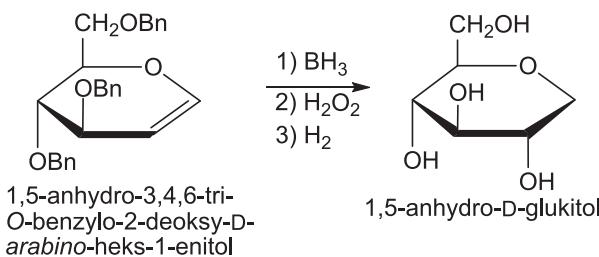
Rysunek 8. Struktura przykładowych substratów stosowanych w reakcji redukcji anomerycznego atomu węgla
Figure 8. Examples of structure of substrates used in the reduction reaction of the anomeric carbon

Powyzsze związki redukuje się do anhydroalditoli przy pomocy wodorków metali takich jak: LiAlH₄ [50], Bu₃SnH [52,53] lub Et₃SiH [52]. Przykładem takich syntez może być otrzymywanie 1,5-anhydroheksitoli, w których to bromek lub chlorek tetra-O-acetylglukopiranozu redukowany jest przy pomocy tetrahydrolinianu litu (Schemat 10).

Schemat 10. Redukcja bromku 2,3,4,6-tetra-O-acetylo- α -D-glukopiranozyluScheme 10. Reduction of 2,3,4,6-tetra-O-acetyl- α -D-glucopyranosyl bromide

Z powodzeniem otrzymano w ten sposób anhydroalditole takie jak: 1,5-anhydro-D-glukitol, 1,5-anhydro-D-galaktitol, 1,5-anhydro-D-mannitol [15, 50, 55], 2-amino-1,5-anhydro-2-deoksy-D-glukitol [54]. W przypadku redukcji glikofuranozydów otrzymano odpowiednio 1,4-anhydroalditole [56]. W trakcie redukcji acetylowych halogenków glikozylu za pomocą wodorków metali dochodzi czasem do niepożądanej migracji grupy O-acetylowej. Wówczas produktem redukcji jest 2-deoksycukier zamiast anhydroalditolu (Schemat 10) [57]. Główną zaletą tej metody jest fakt otrzymywania jednego anhydroalditolu o ścisłe określonej wielkości pierścienia heterocyklicznego i konfiguracji centrów stereogenicznych.

Kolejną ciekawą metodą jest wykorzystanie 1,2-nienasyconych pochodnych cukrów - glikali. Addycja cząsteczki wody poprzez hydroborowanie, połączona z utlenieniem, prowadzi do powstania anhydroalditolu. Dla przykładu, z 1,5-anhydro-3,4,6-tri-O-benzylo-2-deoksy-D-arabino-heks-1-enitolu poprzez addycję wody i usunięcie osłon O-benzylowych otrzymano 1,5-anhydro-D-mannitol (Schemat 11) [58].

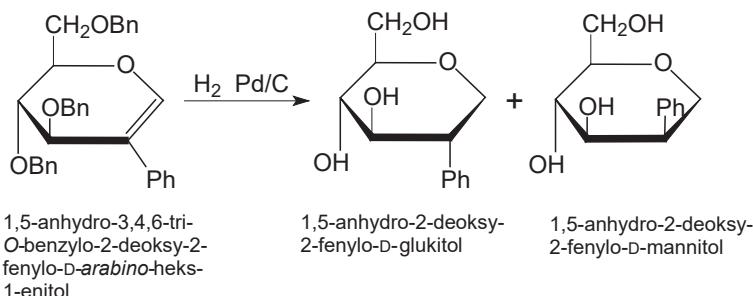


Schemat 11. Addycja wody do 1,5-anhydro-3,4,6-tri-O-benzylo-2-deoksy-D-arabino-heks-1-enitolu

Scheme 11. Addition of water to 1,5-anhydro-3,4,6-tri-O-benzyl-2-deoxy-D-arabino-hex-1-enitol

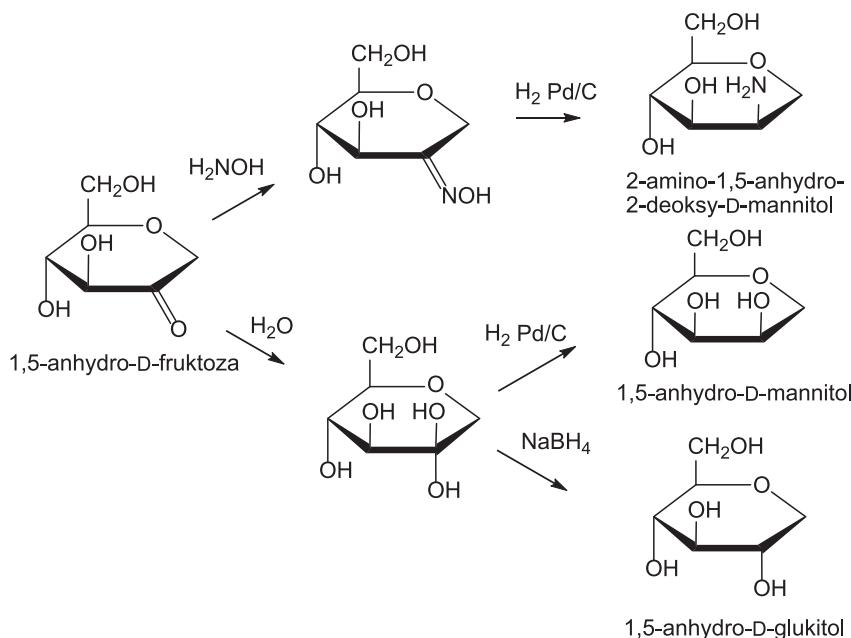
Natomiast, poprzez redukcję wodorem 1,5-anhydro-3,4,6-tri-O-benzylo-2-deoksy-2-fenylo-D-arabino-heks-1-enitolu można otrzymać 1,5-anhydro-2-deoksy-2-fenylo-D-mannitol oraz 1,5-anhydro-2-deoksy-2-fenylo-D-glukitol. Jednakże,

reakcja addycji wodoru jest mniej stereospecyficzna niż opisana wyżej addycja wody, dlatego też w reakcjach tego typu powstaje mieszanina dwóch epimerów. W tym szczególnym wypadku powstaje w znaczącej przewadze produkt o konfiguracji D-manno (Schemat 12) [59].



Schemat 12. Uwodornienie 1,5-anhydro-3,4,6-tri-O-benzylo-2-deoksy-2-fenylo-D-arabino-heks-1-enitolu
 Scheme 12. Hydrogenation of 1,5-anhydro-3,4,6-tri-O-benzyl-2-deoxy-2-phenyl-D-arabino-hex-1-enitol

W syntezie różnych pochodnych anhydroalditoli użytecznym substratem może być 1,5-anhydro-D-fruktoza. Można z niej, w kilku etapach, z bardzo dobrymi wydajnościami otrzymać m.in. takie anhydroalditole jak: 1,5-anhydro-D-mannitol, 1,5-anhydro-D-glukitol, 2-amino-1,5-anhydro-2-deoksy-D-mannitol (Schemat 13) [60, 61].



Schemat 13. Synteza anhydroalditoli z 1,5-anhydro-D-fruktozy
 Scheme 13. Synthesis of anhydroalditols from 1,5-anhydro-D-fructose

UWAGI KOŃCOWE

Obecnie wprowadzane na rynek substancje chemiczne powinny wykazywać się istotnymi cechami: pochodzić z źródeł odnawialnych, łatwo dostępnych, o dobrym czynniku ekonomicznym, być specyficzne, skuteczne oraz biodegradowalne. Przedstawicielami tej klasy związków mogą być alditoli (i pochodne), które mają szerokie zastosowanie, np. jako: leki, stabilizatory szczepionek antywirusowych, solubilizatory, czynniki korygujące smak czy surowce do produkcji żywic i olejów szybkoschnących.

W niniejszej pracy omówiono metody syntezy, budowę i zastosowanie alditoli i anhydroalditoli, które mogą być użyte jako substraty w syntezie związków aktywnych biologicznie. Dodanie jednostek alditolowych (anhydroalditolowych) może poprawić specyficzność leków przeciwnowotworowych oraz ograniczyć niepożądaną cytotoksyczność leku wobec innych komórek organizmu.

PODZIĘKOWANIA

Praca dedykowana jest śp. Profesorowi Andrzejowi Wiśniewskiemu.
Praca została wykonana w ramach funduszu DS 530-8455-D 501-16.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] IUPAC Recommendations, Pure & Appl. Chem., 1995, **67**, 1307.
- [2] J. Li, G. Yu, J. Fan, J. Ethnopharmacol., 2014, **155**, 285.
- [3] R. Shaltiel-Karyo, M. Frenkel-Pinter, E. Rockenstein, C. Patrick, M. Levy-Sakin, A. Schiller, N. Egoz-Matia, E. Masliah, D. Segal, E. Gazit, J. Biol. Chem., 2013, **288**, 17579.
- [4] K.K. Mäkinen, Med. Hypotheses, 2000, **54**, 603.
- [5] G. Livesey, Nutr. Res. Rev., 2003, **16**, 163.
- [6] M. Hendrick, B. J. Morton, R. J. Rafka, *Use of 1,4-anhydroglucitol/galactitol in low calorie food products, and a method of preparing 1,4-anhydro-DL-galactitol*, US006007848, 1999.
- [7] M. Watanabe, Y. Kokubo, A. Higashiyama, Y. Ono, Y. Miyamoto, T. Okamura, Atherosclerosis, 2011, **216**, 477.
- [8] M. Koga, J. Murai, H. Saito, M. Mukai, S. Kasayama, A. Imagawa, T. Hanafusa, Clin. Biochem., 2010, **43**, 1265.
- [9] A. Kato, T. Kunimatsu, Y. Yamashita, I. Adachi, K. Takeshita, F. Ishikawa, J. Agric. Food Chem., 2013, **61**, 611.
- [10] E.M.F. Muri, B.A. Ibrahim, T.G. Barros, J.S. Williamson, O.A.C. Antunes, Mini. Rev. Org. Chem., 2010, **7**, 75.
- [11] C. Jiang, B. Li, Z. Guan, Z. Yang, L. Zhang, L. Zhang, Bioorganic Med. Chem., 2007, **15**, 3019.
- [12] M. Fisher, M. Abramov, A. van Aerschot, J. Rozenski, V. Dixit, R.L. Juliano, P. Herdewijn, Eur. J. Pharmacol., 2009, **606**, 38.
- [13] V. Aragão-Leoneti, I. Carvalho, Tetrahedron Lett., 2013, **54**, 1087.
- [14] S. Cassel, C. Debaig, T. Benvegnu, P. Chaimbault, M. Lafosse, D. Plusquellec, P. Rollin, European J. Org. Chem., 2001, **5**, 875.

- [15] J.R. Ella-Menyé, X. Nie, G. Wang, *Carbohydr. Res.*, 2008, **343**, 1743.
- [16] T.G. Barros, S. Pinheiro, J.S. Williamson, A. Tanuri, M. Gomes, H.S. Pereira, R.M. Brindeiro, J.B.A. Neto, O.A.C. Antunes, E.M.F. Muri, *Amino Acids*, 2010, **38**, 701.
- [17] E.M.F. Muri, M. Gomes, M.G. Albuquerque, E.F.F. da Cunha, R.B. de Alencastro, J.S. Williamson, O.A.C. Antunes, *Amino Acids*, 2005, **28**, 413.
- [18] A. Schafer, G. Klich, M. Schreiber, H. Paulsen, J. Thiem, *Carbohydr. Res.*, 1998, **313**, 107.
- [19] F. Fenouillot, A. Rousseau, G. Colomines, R. Saint-Loup, J.P. Pascault, *Prog. Polym. Sci.*, 2010, **35**, 578.
- [20] R. Sablong, R. Duchateau, C.E. Koning, G. de Wit, D. va Es, R. Koelewijn, J. van Haveren, *Biomacromolecules*, 2008, **9**, 3090.
- [21] J. Wu, P. Eduard, S. Thiagarajan, L. Jasinska-Walc, A. Rozanski, C. Fonseca Guerra, B.A.J. Noordover, J. van Haveren, D.S. van Es, C.E. Koning, *Macromolecules*, 2012, **45**, 5069.
- [22] S. Thiagarajan, J. Wu, R.J.I. Knoop, J. van Haveren, M. Lutz, D.S. van Es, *RSC Adv.*, 2014, **4**, 47937.
- [23] C. Lavilla, A. Martínez de Ilarduya, A. Alla, M.G. García-Martín, J.A. Galbis, S. Muñoz-Guerra, *Macromolecules*, 2012, **45**, 8257.
- [24] M. Mancera, I. Roffé, S.S.J. Al-Kass, M. Rivas, J.A. Galbis, *Macromolecules*, 2003, **36**, 1089.
- [25] M. Mancera, I. Roffé, M. Rivas, C. Silva, J.A. Galbis, *Carbohydr. Res.*, 2002, **337**, 607.
- [26] A. Alla, K. Hakkou, F. Zamora, M.A. de Ilarduya, J.A. Galbis, S. Munoz-Guerra, *Macromol. Biosci.*, 2006, **39**, 1410.
- [27] M. Violante de Paz Bañez, J.A. Aznar Moreno, J. A. Galbis, *J. Carbohydr. Chem.*, 2008, **27**, 120.
- [28] A. Wiśniewski, E. Skorupowa, J. Sokolowski, *J. Carbohydr. Chem.*, 1991, **10**, 77.
- [29] H.G. Fletcher, H.W. Diehl, *J. Am. Chem. Soc.*, 1952, **74**, 3175.
- [30] A. Wiśniewski, *Wiad. Chem.*, 1992, **46**, 847.
- [31] M. Kurszewska, E. Skorupka, R. Kasprzykowska, P. Sowiński, A. Wiśniewski, *Carbohydr. Res.*, 2000, **326**, 241.
- [32] M. Kurszewska, E. Skorupowa, J. Madaj, A. Konitz, W. S. Wojnowski, A. Wiśniewski, *Carbohydr. Res.*, 2002, **337**, 1261.
- [33] K. Bock, C. Pedersen, H. Thogersen, *Acta Chem. Scand. B*, 1981, **35**, 441.
- [34] A. Onorato, C. Pavlik, M.A. Invernale, I.D. Berghorn, G.A. Sotzing, M.D. Morton, M.B. Smith, *Carbohydr. Res.*, 2011, **346**, 1662.
- [35] C. Pavlik, A. Onorato, S. Castro, M. Morton, M. Peczu, M.B. Smith, *Org. Lett.*, 2009, **11**, 3722.
- [36] L.V.R. Reddy, A.D. Roy, R. Roy, A.K. Shaw, *Chem. Commun.*, 2006, 3444.
- [37] T. Satoh, T. Imai, S. Umeda, K. Tsuda, H. Hashimoto, T. Kakuchi, *Carbohydr. Res.*, 2005, **340**, 2677.
- [38] P. Stoss, H. Reinhard, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 1991, **49**, 93.
- [39] V.S. Rao, A.S. Perlin, *Can. J. Chem.*, 1984, **62**, 886.
- [40] F.L. van Delft, A. Rob, P.M.M. Valentijn, G.A. van der Marel, J.H. van Boom, *J. Carbohydr. Chem.*, 1999, **18**, 191.
- [41] D. Horton, K.D. Philips, *Carbohydr. Res.*, 1973, **30**, 367.
- [42] S. Akiya, T. Osawa, *Pharmaceutical Society of Japan*, 1959, **7**, 277.
- [43] B.B.C. Bera, A.B. Foster, M. Stacey, *J. Chem. Soc.*, 1956, 4531.
- [44] D. Horton, K.D. Philips, *Carbohydr. Res.*, 1972, **21**, 417.
- [45] F. Shafizadeh, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 1958, **13**, 9.
- [46] R. Barker, *J. Org. Chem.*, 1964, **29**, 869.
- [47] V.G. Bashford, L.F. Wiggins, *J. Chem. Soc.*, 1948, 299.
- [48] D.D. Heard, B.G. Hudson, R. Barker, *J. Org. Chem.*, 1970, **35**, 464.
- [49] T. Elbert, M. Černy, J. Defaye, *Carbohydr. Res.*, 1979, **76**, 109.
- [50] R.K. Ness, H.G. Fletcher, C.S. Hudson, *J. Am. Chem. Soc.*, 1950, **72**, 4547.
- [51] L. Hough, M.I. Taha, *J. Chem. Soc.*, 1956, 2042.

- [52] C. Yuan, R.I. Hollingsworth, Tetrahedron Lett., 2011, **52**, 5421.
- [53] U. Mühlhausen, R. Schirrmacher, M. Piel, B. Lecher, M. Briegert, A. Piee-Staffa, B. Kaina, F. Rösch, J. Med. Chem., 2006, **49**, 263.
- [54] Z.J. Witczak, R.L. Whistler, Carbohydr. Res., 1986, **150**, 121.
- [55] P. Kocienski, C. Pant, Carbohydr. Res., 1982, **110**, 330.
- [56] R.K. Ness, H.G.F. Jr., C.S. Hudson, J. Am. Chem. Soc., 1951, **73**, 3742.
- [57] B. Giese, K.S. Gröninger, Org. Synth., 1990, **8**, 66.
- [58] R. Murali, M. Nagarajan, Carbohydr. Res., 1996, **280**, 351.
- [59] I. Cobo, M. I. Matheu, S. Castill, O. Boutureira, B.G. Davis, Org. Lett., 2013, **14**, 1728.
- [60] S.M. Andersen, I. Lundt, J. Marcussen, J. Carbohydr. Chem., 2000, **19**, 717.
- [61] I. Lundt, S. Yu, Carbohydr. Res., 2010, **345**, 181.

Praca wpłynęła do Redakcji 10 stycznia 2017

GŁÓWNE METODY SYNTEZY SOLI PIRYLIOWYCH

THE MAIN SYNTHESIS OF PYRYLIUM SALTS

Andrzej Günther, Jacek A. Soroka

*Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie
Wydział Technologii i Inżynierii Chemicznej, Al. Piastów 42, Szczecin
e-mail: andrzej.gunther@zut.edu.pl, jacek.soroka@zut.edu.pl*

Abstract

Wprowadzenie

1. Wybrane właściwości i zastosowanie soli piryliowych

2. Reaktywność soli piryliowych

3. Główne metody otrzymywania soli piryliowych

3.1. Przekształcenie układu piranu

3.2. Cyklizacja łańcucha C_5

3.3. Syntezy C_{4+1}

3.4. Syntezy C_{3+2}

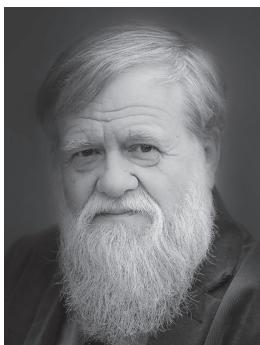
3.5. Syntezy C_{3+1+1}

3.6. Syntezy C_{2+2+1}

3.7. Syntezy C_{2+1+2}

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane



barwników organicznych.

Dr hab. inż. Jacek A. Soroka – w roku 1972 ukończył studia na Wydziale Chemicznym Politechniki Szczecińskiej. W 1981 r. uzyskał stopień doktora nauk chemicznych na tej samej uczelni, a w 1995 r. stopień doktora habilitowanego w zakresie fizycznej chemii organicznej na Uniwersytecie im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. W latach 2008–2016 był dziekanem Wydziału Technologii i Inżynierii Chemicznej do 2009 r. Politechniki Szczecińskiej, potem Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie. Specjalność – badania nad syntezą, właściwościami, chemią i zastosowaniami



Mgr inż. Andrzej Günther – jest doktorantem w Katedrze Chemii Fizycznej i Chemii Organicznej, Wydziału Technologii i Inżynierii Chemicznej, Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie. Interesuje się chemią organiczną, projektowaniem leków oraz substancjami pochodzenia naturalnego. Od 2015 prowadzi badania nad syntezą chiralnych związków heterocyklicznych pod kierunkiem dr hab. inż. Jacka A. Soroki, prof. nadzw. Członek Polskiego Towarzystwa Chemicznego.

ABSTRACT

Pyrylium salts are valuable organic aromatic compounds based on pyrylium cation, which are built from six-membered ring and contain one positively charged oxygen atom. The presence of a non-nucleophilic anion makes aromatic system stable. These salts are very sensitive for nucleophiles and react with them easily, especially 2,6-disubstituted (α positions) salts because of a lower density of electrons than that of 4-substituted (γ position). They react with primary amine groups giving pyridinium salts. This mechanism runs through the stages of attack of nucleophile, ring opening and ring closing (SnANRORC). The synthesis of pyrylium salts is very useful and comfortable because of their ionic properties, obtained products are not soluble in diethyl ether or liquid alkanes, and can be easily isolated and purified from a reaction mixture.

Pyrylium salts have a wide range of applications, such as laser dyes, fluorescent dyes, biological and chemical sensors, reactive matrices for MALDI-MS imaging of biologically active primary amines (e.g. amphetamine, dopamine) and many others especially as a universal substrate in the synthesis of heterocyclic compounds. In nature pyrylium ions occur only in structures of anthocyanins in tissues of higher plants and are used as food dyes.

Herein we described selected properties and applications of pyrylium salts, chemical reactivities, and the most frequently used and useful methods of syntheses of pyrylium salts which can be used as starting materials to obtain different class of heterocyclic compounds.

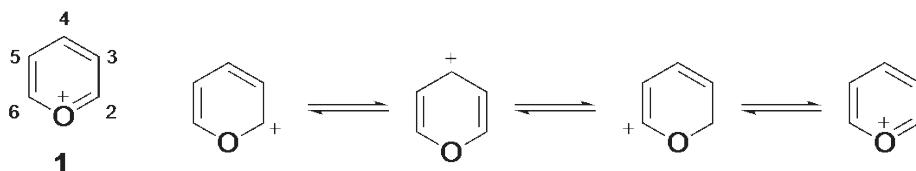
Keywords: pyrylium salts, pyrylium cation, nucleophilic additions, mechanism SnANRORC

Słowa kluczowe: sole piryliowe, kation piryliowy, addycja nukleofilowa, mechanizm SnANRORC

WPROWADZENIE

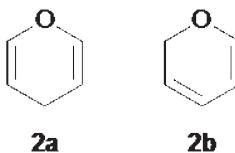
Sole piryliowe należą do grupy związków heterocyklicznych o budowie jonoowej. Składają się z kationu (**1**) posiadającego budowę pierścieniową zawierającą trzeciorzędowy, dodatnio naładowany atom tlenu [1]. Trwałość cząsteczki zapewnia obecność anionu niebędącego nukleofilem pochodzącego od mocnego kwasu [2].

Deficyt elektronów w cząsteczce powoduje, że jest ona podatna na atak czynników nukleofilowych. Przebieg reakcji z czynnikami elektrofilowymi jest bardzo utrudniony, ze względu na, obecność dodatniego ładunku na atomie tlenu, który silnie dezaktywuje atomy węgla w pierścieniu (Rys. 1) [3].



Rysunek 1. Kation piryliowy oraz jego struktury rezonansowe
Figure 1. Pyrylium cation and its resonance structures

Pozycje α są najbardziej podatne na atak nukleofilowy, ze względu na większy niedobór elektronów. Atak może również występować na atomie γ , zwłaszcza jeśli pozycje α są podstawione, np. podstawnikami arylowymi. Prowadzi to, w zależności od użytego czynnika nukleofilowego, do otrzymania odpowiednich pochodnych, w tym piranów [4]. Struktury piranów przedstawiono poniżej.



Rysunek 2. Struktura **2a** α -piran i **2b** γ -piran
Figure 2. Structures of **2a** α -pyran and **2b** γ -pyran

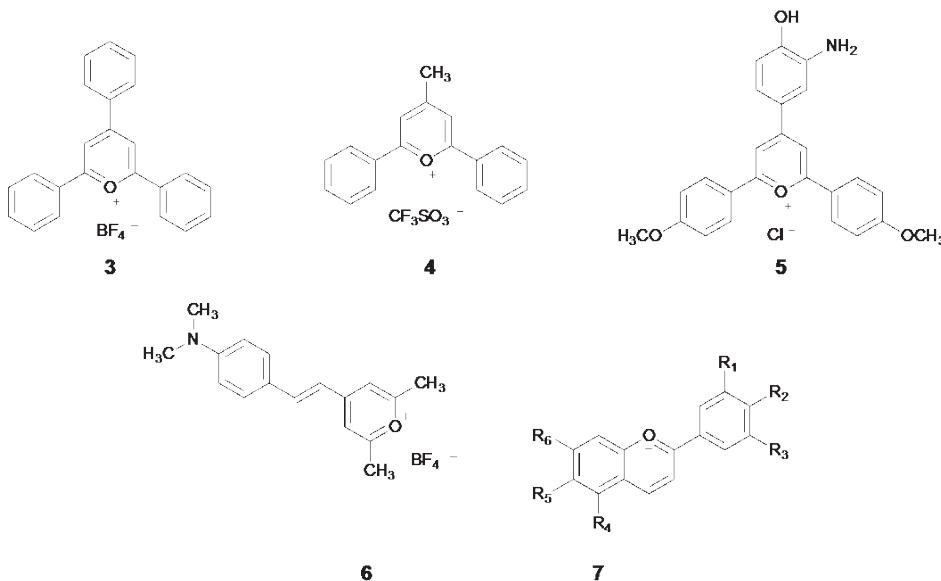
Synteza soli piryliowych jest wygodna, ponieważ produkt można w prosty i szybki sposób oddzielić od nieprzereagowanych substratów i produktów ubocznych. Charakter jonowy soli piryliowych powoduje, że są one nierozpuszczalne w rozpuszczalnikach polarnych (np. eter dietylowy, ciekłe węglowodory), a więc materiały wyjściowe i produkty uboczne można łatwo usunąć przez proste przemywanie, np. eterem [5, 6].

Niektóre jony soli piryliowych takie jak: sulfooctan, wodorosiarczan, tetrachlorożelazian, pikrynian oraz fluorowce, powodują wzrost rozpuszczalności w rozpuszczalnikach apolarnych, co prowadzi do trudniejszego oddzielenia ich od reagentów. W takim przypadku należy zastosować inne metody [3].

1. WYBRANE WŁAŚCIWOŚCI I ZASTOSOWANIE SOLI PIRYLIOWYCH

Sole piryliowe znajdują zastosowanie w wielu dziedzinach między innymi; w analityce medycznej, biotechnologii, chemii, farmacji czy przemyśle. Na Rysunku 3 przedstawiono kilka przykładowych związków.

Sole piryliowe są przede wszystkim prekursorami do syntezy wielu innych związków heterocyklicznych, jak np. analogów furanu, pirydyny, a zwłaszcza soli pirydyniowych, będących ważnymi substratami w syntezach totalnych skomplikowanych substancji aktywnych.



Rysunek 3. Przykłady soli piryliowych
Figure 3. Examples of pyryliums salts

Już ponad sto lat temu, zanim poznano budowę soli piryliowych zaobserwano, że tetrafluoroboran 2,4,6-trifenylopiryliowy wykazuje silne właściwości fluorescencyjne. Te właściwości umożliwiają zastosowanie go jako ośrodka czynnego laserów [7]. Zaobserwowano poprawę skuteczności lasera, podobną do wysoce fluorescencyjnego barwnika – rodaminy 6G, który dzięki wyraźnej i trwałej fluorescencji może być stosowany jako wskaźnik ciągu wody, określający szybkość i kierunek przepływu [8, 9].

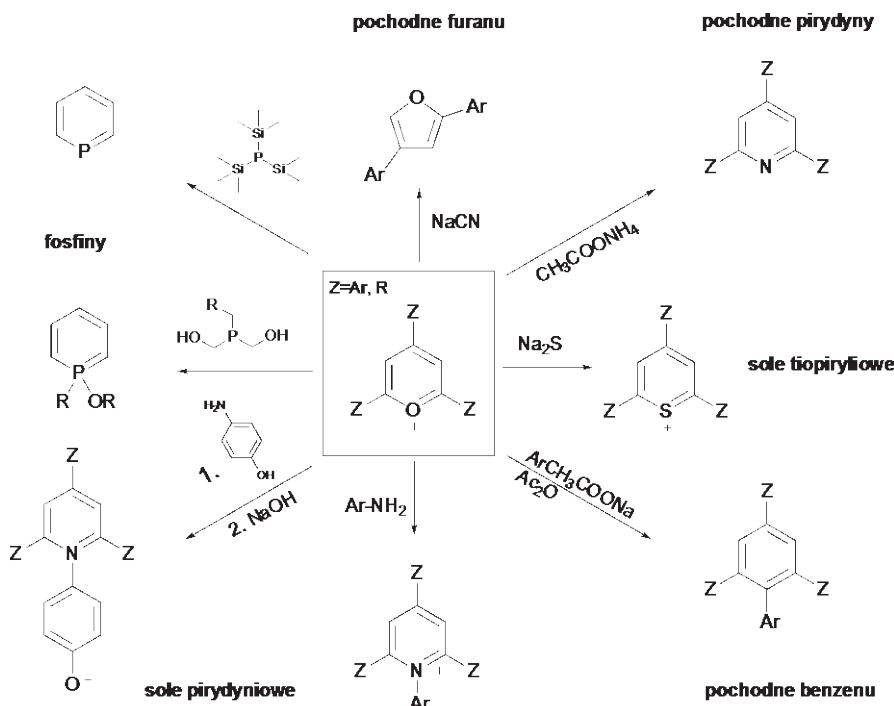
Kolejnym zastosowaniem soli piryliowych są czujniki biologiczne oraz chemiczne. Trifluorometanosulfonian 4-metylo-2,6-difenylopiryliowy służy do wykrywania anionów cyjankowych [10], chlorek 4-(3-amino-4-hydroksyfenylo-2,6-bis(4-metoksyfenylo)piryliowy stosowany jest do wykrywania amin, grup aminowych w aminokwasach oraz tlenków azotu [11], a związek (7) do oznaczania białek [12].

W 2015 roku [13] zastosowano sole piryliowe jako związki matrycowe umożliwiające wykrycie pierwszorzędowych amin w analizie śladowych ilości analogów fenyloetyloaminy (np. amfetaminy) i neuroprzekaźników, głównie dopaminy, metodą laserowej desorpcji i jonizacji próbki wspomaganą matrycą sprzężoną ze spektrometrią masową MALDI-MS (ang. *Matrix Assisted Laser Desorption and Ionisation – Mass Spectrometry*).

Układy piryliowe obecne są również w świecie naturalnym. Oparte na nich są antocyjany (przykładowo: Rys. 3, związek 7), naturalnych barwników, których barwa uzależniona jest od pH. Wiele z nich stosuje się do barwienia produktów spożywczych [14].

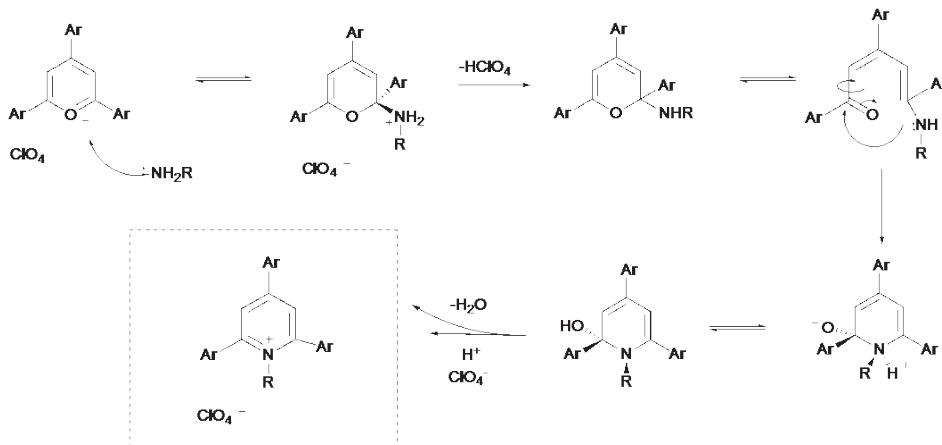
2. REAKTYWNOŚĆ SOLI PIRYLIOWYCH

W związkach z niedoborem elektronów, sole piryliowe wykazują wysoką reaktywność w stosunku do czynników nukleofilowych. Prowadzi to do otrzymania wielu innych cennych związków. Na Rysunku 4 przedstawiono niektóre przekształcenia chemiczne soli piryliowych w różne inne ziązki, w tym pochodne pirydyny, podstawionego furanu, soli betainy i barwniki [15].



Rysunek 4. Przykładowe przekształcenia chemiczne soli piryliowych, R=alkil, Ar=aryl
Figure 4. Exemplary of chemical conversion of pirylium salts, R-alkyl, Ar-aryl

Sole piryliowe reagują w specyficzny sposób z pierwszorzędowymi grupami aminowymi obecnymi w różnorodnych cząsteczkach, w tym w białkach, zastępując atom tlenu atomem azotu i tworząc sól pirydyniową. Reakcja zachodzi w temperaturze pokojowej, według mechanizmu substytucji nukleofilowej (Rys. 5) kolejno poprzez stadia ataku nukleofilu (AN), otwarcia (*Ring Opening*) i zamknięcia pierścienia (*Ring Closing*) – $S_N(ANRORC)$ [16].



Rysunek 5. Mechanizm $S_N(ANRORC)$
Figure 5. The mechanism of $S_N(ANRORC)$

Dzięki odwracalności pierwszego etapu, możliwy atak w pozycji γ nie prowadzi do związków pośrednich nieposiadających możliwości ponownego zamknięcia pierścienia.

W pierwszym etapie wolna para elektronów na atomie azotu nadaje cząsteczce charakter nukleofilowy, która atakuje cząsteczkę soli piryliowej. Dalej w addukcie tworzy się chwilowy ładunek dodatni na atomie azotu, który zanika wraz z odchodzącym atomem wodoru, tworząc z anionem (tu nadchloranowym) kwas. Następnie otwiera się pierścień, a wolne elektrony na atomie azotu atakują atom węgla grupy karbonylowej, w wyniku czego następuje wymiana atomu tlenu na atom azotu. Proton, który jest obecny w środowisku odciąga atom tlenu oraz jeden atom wodoru, tworząc wodę, a anion (tutaj nadchloranowy) łączy się z kationem, tworząc sól pirydyniową. Szybkość reakcji wyznaczana jest przez etap zamknięcia pierścienia, natomiast sam proces otwarcia zachodzi bardzo szybko.

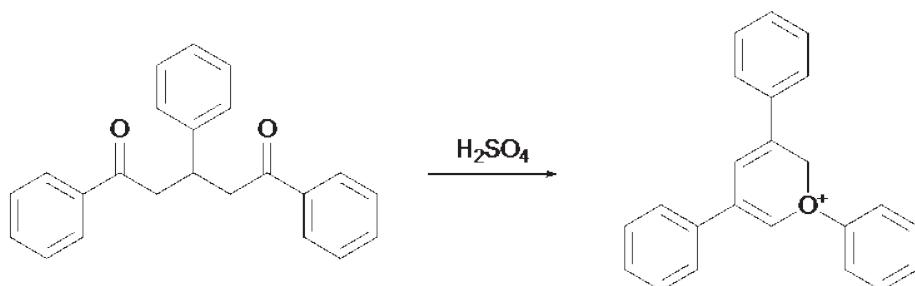
Sole piryliowe nie ulegają reakcjom podstawienia elektrofilowego, ze względu na niedobór elektronów spowodowany obecnością oksoniowego atomu tlenu. Wyjątek stanowi reakcja z nadchloranem 2,4,6-trimetylopiryliowym lub 2,4,6-trifenylopiryliowym z deuterowanym kwasem octowym [15].

3. GŁÓWNE METODY OTRZYMYWANIA SOLI PIRYLIOWYCH

Poniżej wybrano i zaprezentowano najczęściej stosowane metody syntezy, które mogą być wykorzystane jako materiał wyjściowy do otrzymania różnych klas związków heterocyklicznych.

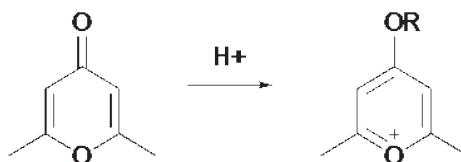
3.1. PRZEKSZTAŁCENIE UKŁADU PIRANU

W 1896 roku Kostanecki i Rossbach [17] po raz pierwszy zsyntezowali sól piryliową na drodze dehydrokondensacji 1,3,5-trifenylopentano-1,5-dionu (1,5-diketonu), jednak bez jej wydzielenia (Rys. 6).



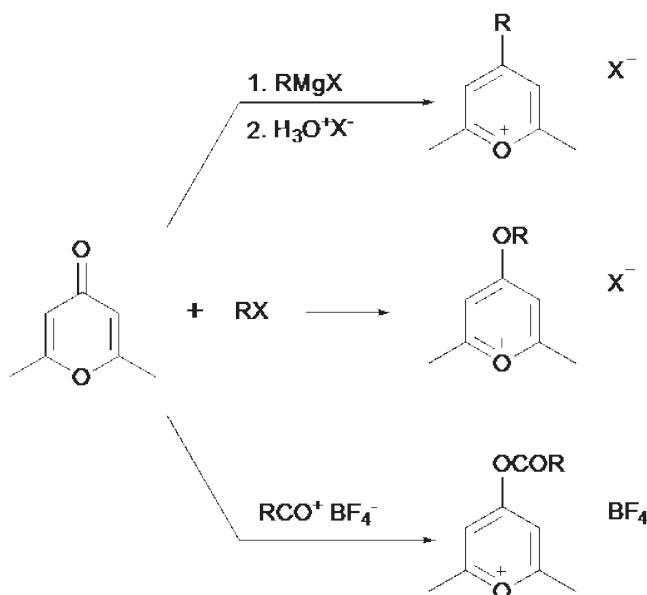
Rysunek 6. Dehydrokondesnacja 1,3,5-trifenylopentano-1,5-dionu
Figure 6. Dehydro-condensation of 1,3,5-triphenylpentane-1,5,-dione

Trzy lata później Collie i Tickle [18] otrzymali sól w postaci krystalicznej na drodze protonowania 2,6-dimetylo-4*H*-piran-4-onu. Sól ta była także pierwszym związkiem zawierającym udokumentowany trójwiązalny atom tlenu (Rys. 7).



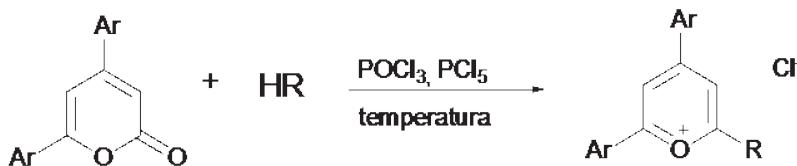
Rysunek 7. Protonowanie 2,6-dimetylo-4*H*-piran-4-onu, R – alkil
Figure 7. Protonation of 2,6-dimethyl-4*H*-pyran-4-one, R – alkyl

Sole piryliowe można otrzymać poprzez przekształcenie układu piranu w kation piryliowy (Rys. 8)



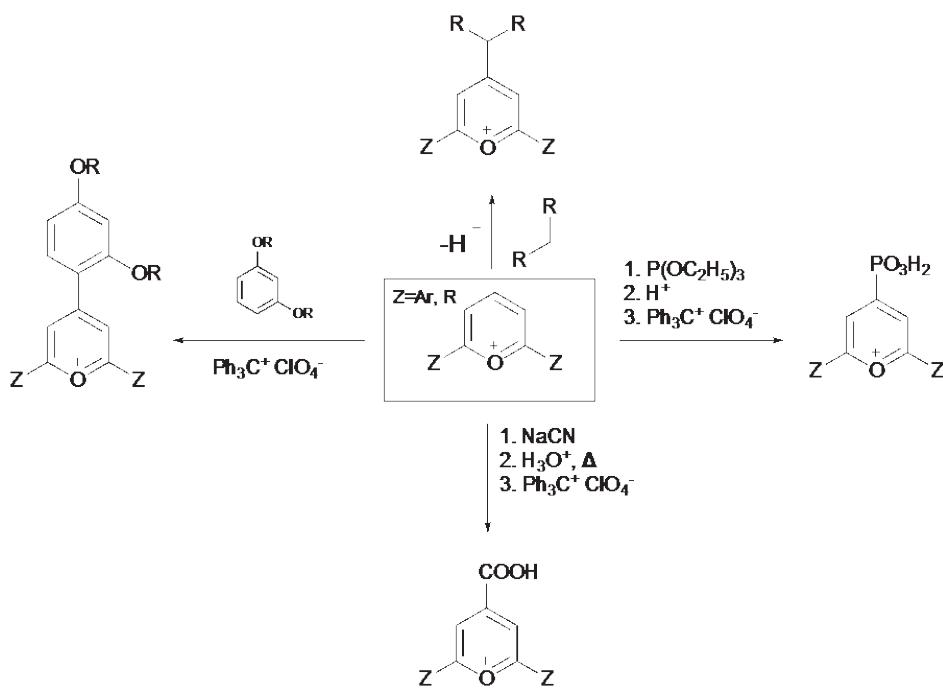
Rysunek 8. Synteza soli piryliowych z piranu i jego analogów, R – grupa alkilowa, X – atom fluorowca
 Figure 8. Synthesis of pyrylium salts from pyran and its analogues, R- alkyl group, X – halogen atom

W reakcji pochodnych 2,4-diarylo-4*H*-pironu z alkanami w obecności tlenku fosforu(V) oraz tlenochlorku fosforu(V) powstają chlorki 6-alkilopodstawione (Rys. 9) [19].



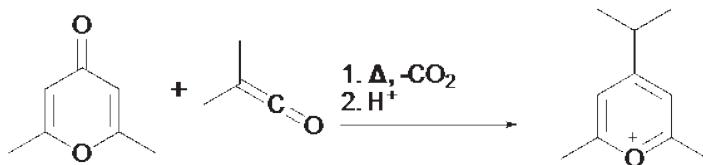
Rysunek 9. Reakcja podstawionych analogów 2,4-diarylo-4*H*-piranu z alkanami, R – grupa alkilowa, X – atom fluorowca
 Figure 9. Reaction of substituted analogues of 2,4-diaryl-4*H*-pyrane with alkanes, R- alkyl group, X – halogen atom

Sole piryliowe można też otrzymać z podstawionych pozycjach 2 i 4 soli piryliowych. Kilka przykładów przedstawiono na Rysunku 10 [20–23].



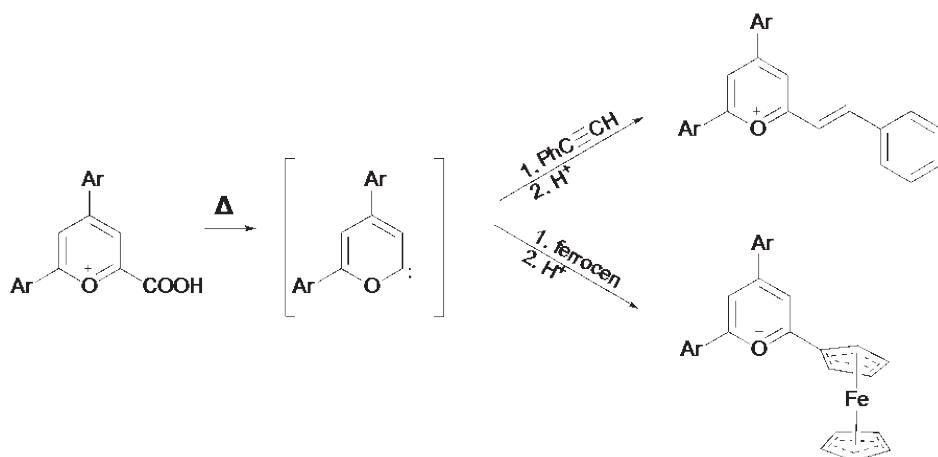
Rysunek 10. Przykłady reakcji 2,6-dipostawionych soli piryliowych
Figure 10. Examples of reaction of 2,6-disubstituted pyrylium salts

W 1911 roku opisano reakcję ketenów z 4*H*-pironami (Rys. 11) [24].



Rysunek 11. Synteza soli piryliowych z ketenów i analogów 4*H*-pironu
Figure 11. Synthesis of pyrylium salts from ketenes and analogues of 4*H*-pyrone

Sole piryliowe można także otrzymać z karbenów piranowych powstających podczas ogrzewania karboksylowych analogów kationu piryliowego (Rys. 12) [25].

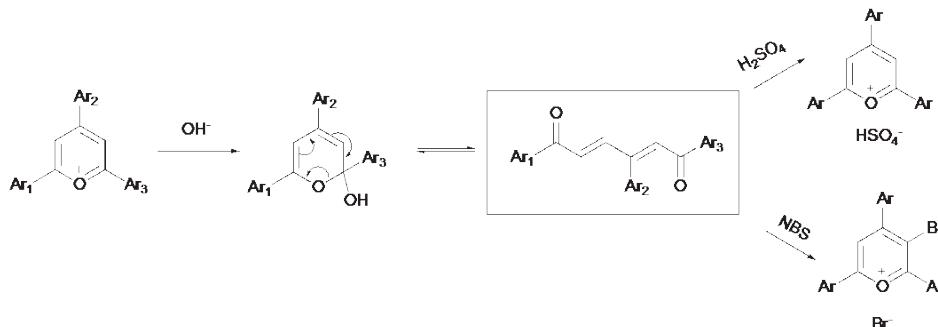


Rysunek 12. Synteza soli pyryliowych z karbenów powstających przez ogrzewanie karboksylowych analogów kationu pyryliowego

Figure 12. Synthesis of pyrylium salts from carbenes formed by heating of carboxylic analogues of pyrylium cation

3.2. CYKLIZACJA ŁAŃCUCHA C₅

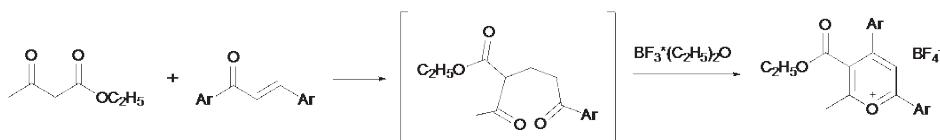
Kolejna metoda opiera się na cyklizacji pięciowęglowego łańcucha α,β -nienasyconego. W środowisku alkalicznym w solach pyryliowych dochodzi do otwarcia pierścienia, co prowadzi do powstania α,β -nienasyconych-1,5-diketonów. Reakcja biegnie według mechanizmu S_N(ANRO), podobnie do wcześniej omówionego S_N(ANRORC) z tą różnicą, że nie dochodzi jeszcze do zamknięcia pierścienia. Otwarta forma zawiera aktywowany fragment alkilowy, na którym można dokonywać dalszych reakcji. Cyklizację indukuje dodatek kwasu (Rys. 13) [26].



Rysunek 13. Synteza soli pyryliowych przez cyklizację z otrzymanych α,β -nienasyconych-1,5-diketonów

Figure 13. Synthesis of pyrylium salts via cyclization from obtained α,β -unsaturated-1,5-diketones

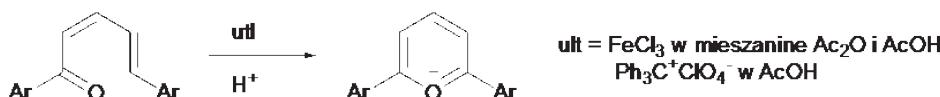
Sole piryliowe można otrzymać na drodze syntezy z 1,5-diketonem który tworzy się *in situ* w reakcji nienasyconych ketonów aromatycznych z acetylacetanem etylu. (Rys. 14) [25].



Rysunek 14. Otrzymywanie soli piryliowych z powstającego *in situ* 1,5-diketonu

Figure 14. Synthesis of pyrylium salts via 1,5-diketone generated *in situ*

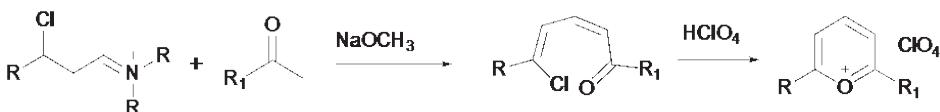
Analogi 1-acylobutadienu pod wpływem utleniacza również tworzą sole piryliowe. Utleniaczem może być chlorek żelaza(III) w mieszaninie bezwodnika octowego i kwasu octowego [27] lub nadchloranu trifenylometylowego w kwasie octowym (Rys. 15) [28].



Rysunek 15. Synteza soli piryliowych z analogów 1-acylobutadienu w obecności utleniaczy

Figure 15. Synthesis of pyrylium salts from 1-acylbutadiens in the presence of oxidizers

W przeciwnieństwie do analogów 1-alkilo-4-amin, reakcja zachodzi bez konieczności użycia utleniacza (Rys. 16) [28].

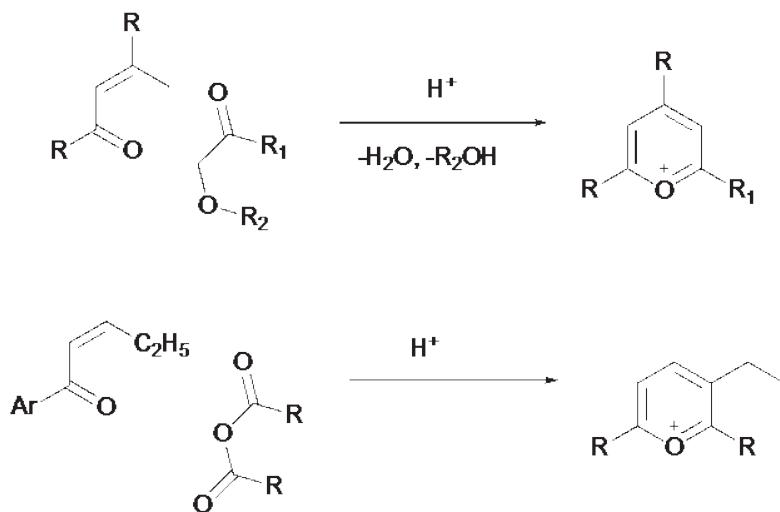


Rysunek 16. Synteza soli piryliowych w wyniku przekształcenia analogów 1-alkilo-4-amin pod wpływem metanolanu sodu R, R' – alkil

Figure 16. Synthesis of pyrylium salts as a result of conversion of 1-alkyl-4-amines in the presence of sodium methoxide, R, R' – alkyl

3.3. SYNTEZY C_{4+1}

Kolejnym typem przekształceń jest synteza oparta na cyklizacji pochodnych β -metylo- α,β -nienasyconych ketonów pod wpływem kwasu mineralnego (Rys. 17) [29].



Rysunek 17. Otrzymywanie soli piryliowych z β -metylo- α,γ -nienasyconych ketonów, R – alkil
Figure 17. Preparation of pyrylium salts from β -methyl- α,γ -unsaturated ketones, R – alkyl

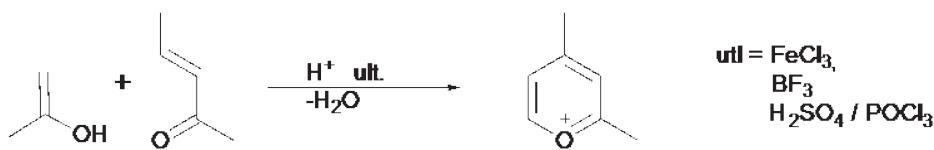
Sole piryliowe, a głównie nadchlorany można otrzymać z α,γ -nienasyconych ketonów w środowisku kwasu nadchlorowego (Rys. 18) [29].



Rysunek 18. Otrzymywanie nadchloranów piryliowych z α,γ -nienasyconych ketonów, R – alkil
Figure 18. Preparation of pyrylium perchlorates from α,γ -unsaturated ketones, R – alkyl

3.4. SYNTEZY C₃₊₂

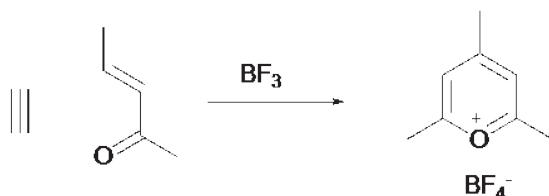
W 1917 roku Dilthey po raz pierwszy przeprowadził syntezę soli piryliowych przez kondensację α,β -nienasyconych ketonów z analogami enoli pod wpływem chlorku żelaza(III) jako utleniacza [30]. Później inni jako utleniaczy zastosowani trifluorek boru [31] oraz mieszaninę trichlorku fosforylu w kwasie siarkowym (Rys. 19) [32].



Rysunek 19. Synteza soli piryliowych na drodze kondensacji analogów enoli z α,β -nienasyconych ketonów w obecności utleniacza

Figure 19. Synthesis of pyrylium salts via condensation of analogues of enoles with α,β -unsaturated ketones in the presence of oxidizers

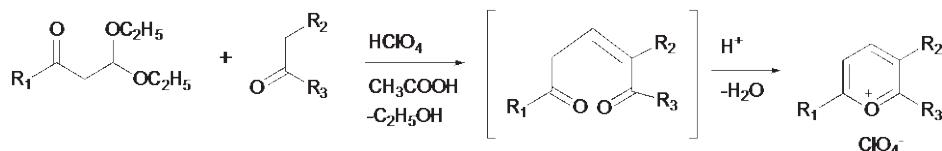
Powyższa reakcja zachodzi również przy użyciu acetylenu (Rys. 20) [33].



Rysunek 20. Synteza soli piryliowych z acetylenu i α,β -nienasyconych ketonów

Figure 20. Synthesis of pyrylium salts from acetylene and α,β -unsaturated ketones

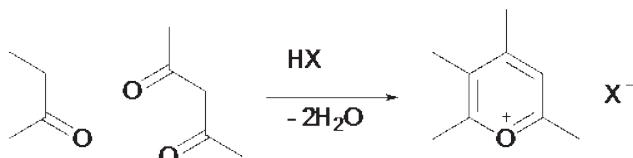
Syntezę nadchloranów piryliowych na drodze kondensacji acetalu acetyloloctowego z ketonami opracował zespół Dorofeenki (Rys. 21) [34].



Rysunek 21. Synteza nadchloranów piryliowych z acetali acetyloloctowych i ketonów, $\text{R}_1, \text{R}_2, \text{R}_3$ – alkil

Figure 21. Synthesis of pyrylium perchloric from acetoacetic acetals and ketones, $\text{R}_1, \text{R}_2, \text{R}_3$ – alkyl

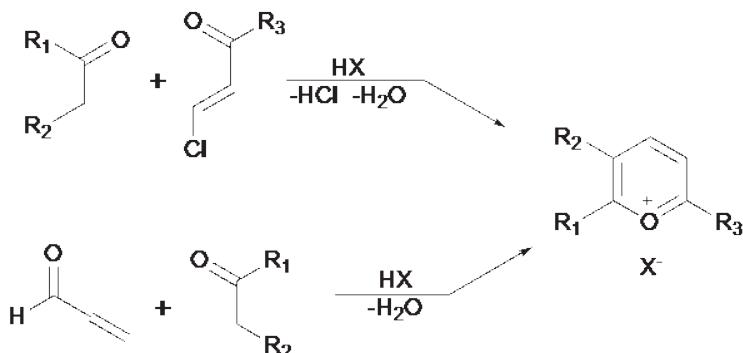
Do wygodnych syntezy należy bezpośrednia kondesacja β -diketonów z metyloketonami (Rys. 22) [35].



Rysunek 22. Synteza soli piryliowych na drodze kondensacji β -diketonów z metyloketonami

Figure 22. Synthesis of pyrylium salts via condensation of β -diketones with methylketones

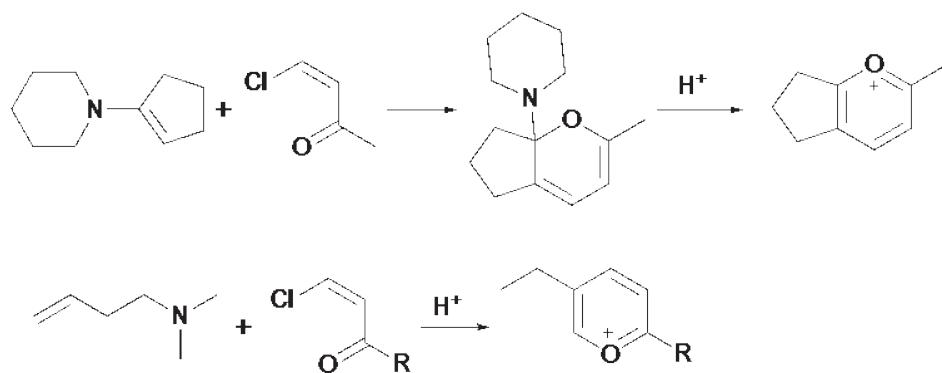
Sole piryliowe można także otrzymać na drodze kondensacji β -chlorowinyloketonów lub akroleiny z ketonami (Rys. 23) [36].



Rysunek 23. Dwie drogi syntezy soli piryliowych: przez kondensację β -chlorowinyloketonów lub akroleiny z ketonami

Figure 23. Two synthesis route of pyrylium salts: via condensation of β -chlorovinyloketones or acrolein with ketones

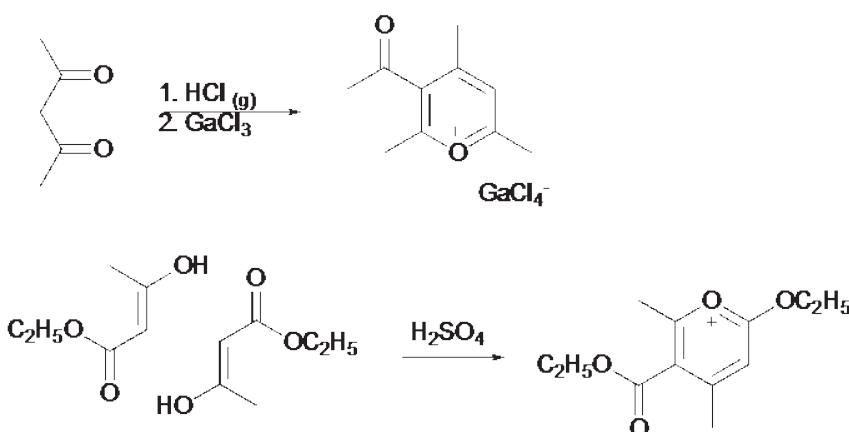
Analogicznie przebiega reakcja z enaminami i zasadami Mannicha (Rys. 24) [37].



Rysunek 24. Synteza soli piryliowych z enamin i zasad Mannicha, R – alkil

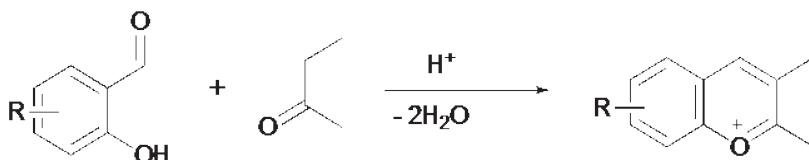
Figure 24. Synthesis of pyrylium salts from enamines and Mannich bases R – alkyl

Sole piryliowe mogą być również otrzymywane na drodze dimeryzacji związków β -dikarbonylowych w środowisku kwasowym, w obecności gazowego chlorowodoru i trójchlorku galu(III) [38], lub kwasu siarkowego (Rys. 25) [39].



Rysunek 25. Synteza soli piryliowych na drodze dimeryzacji związków β -dikarbonylowych
Figure 25. Synthesis of pyrylium salts from via dimerization of β -dicarbonyl compounds

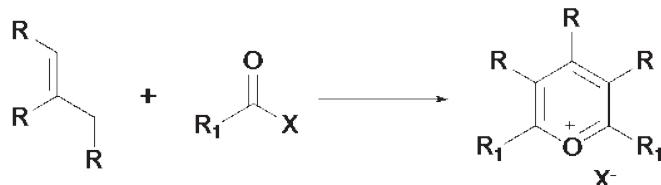
Zastosowanie aldehydu salicylowego lub jego analogów w reakcji z metyloketonami prowadzi do soli chromyliowych (benzo[*b*]piryliowych, Rys. 26) [40].



Rysunek 26. Synteza soli chromyliowych z metyloketonów i aldehydu salicylowego lub jego analogów
Figure 26. Synthesis of benzopyrylium salts from methyloketones and salicylic aldehyde or its analogues

3.5. SYNTEZY C_{3+1+1}

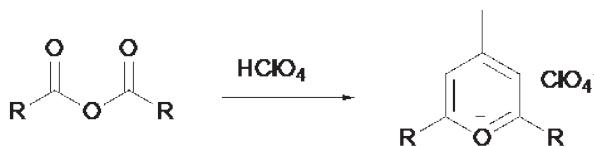
Do najbardziej rozpowszechnionych syntez tego typu należy reakcja halogenków acylowych z olefinami lub ich prekursorami (Rys. 27) [41].



Rysunek 27. Synteza soli piryliowych z olefin lub ich prekursorów w reakcji z halogenkami kwasowymi, R – alkil, X – atom fluorowca

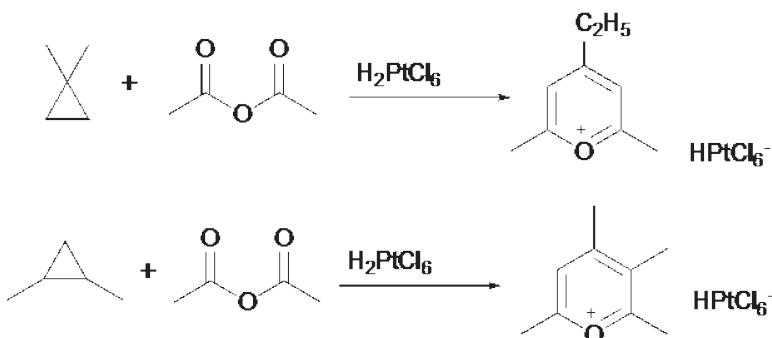
Figure 27. Synthesis of pyrylium salts from olefins or their precursors with acyl halide, R – alkyl, X – halogen atom

Sole piryliowe mogą być łatwo otrzymywane z bezwodników kwasów karboksylo-wych, na które działa się kwasem nadchlorowym (Rys. 28) [42].



Rysunek 28. Synteza nadchloranów piryliowych z bezwodników kwasowych i kwasu nadchlorowego
Figure 28. Synthesis of pyrylium perchlorates from acid anhydrides and perchloric acid

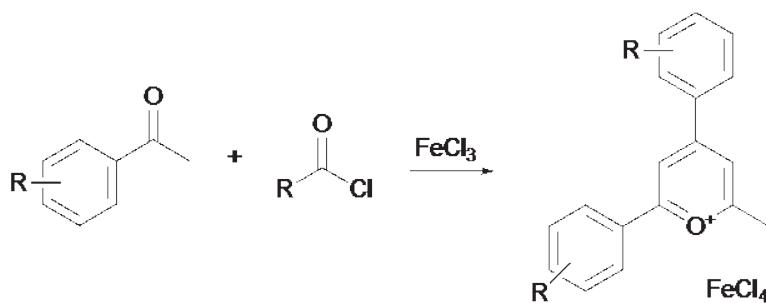
Kolejnym przykładem jest synteza soli piryliowych z analogów cyklopropanu w reakcji z bezwodnikiem octowym i kwasem chloroplatynowym (Rys. 29) [43].



Rysunek 29. Synteza chloroplatynianów piryliowych z analogów cyklopropanu, bezwodnika octowego i kwasu chloroplatynowego
Figure 29. Synthesis of pyrylium hexachloroplatinates from analogues of cyclopropane, acetic anhydride and chloroplatinic acid

3.6. SYNTEZY C₂₊₂₊₁

Synteza soli piryliowych metodą „C₂₊₂₊₁” charakteryzuje się zarówno wysoką wydajnością jak i czystością. Polega ona na kondensacji analogów acetofenonu z wytwarzanymi kationami acylowymi w środowisku kwasowym. Metoda ta została opublikowana przez Schneidera i Seebacha [44] w 1921 roku i określana jest jako główna synteza soli 2-alkilo-4,6-diarylopiryliowych (Rys. 30). Do typowych środków kondensujących zalicza się kwas chlorożelazowy [45], kwas sulfooctowy, a także kwas nadchlorowy [46].



Rysunek 30. Synteza soli piryliowych przez kondensację analogów acetofenonów z wytwarzanymi kationami acylowymi, R – alkil

Figure 30. Synthesis of pyrylium salts via condensation of analogues of acetophenones with produced acylium cation, R – alkyl

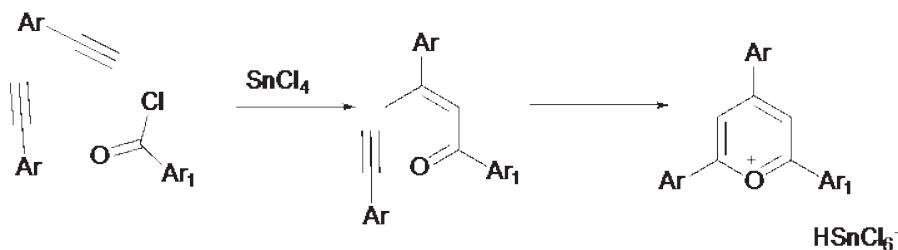
Odpowiedni kation acylowy generuje się przez dodatnie kwasu mineralnego do bezwodnika kwasu karboksylowego. Można go również otrzymać w reakcji halogenku acylowego z utleniaczem (Rys. 31).



Rysunek 31. Otrzymanie kationu acylowego

Figure 31. Preparation of acylium ion

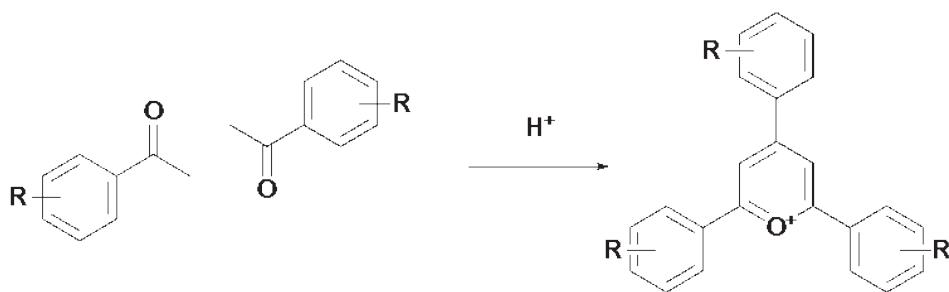
Schmidt [47] opublikował metodę otrzymywania soli piryliowych z fenyloacetylu lub jego analogów i chlorków arylowych (Rys. 32).



Rysunek 32. Synteza soli piryliowych z analogów fenyloacetylu i chlorków arylowych

Figure 32. Synthesis of pyrylium salts from analogues of phenylacetylene and aryl chlorides

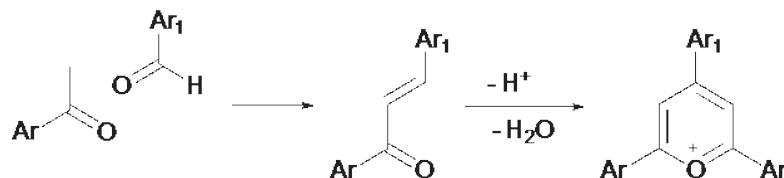
Kationy piryliowe można także otrzymać na drodze autokondensacji analogów acetofenonu w środowisku kwasowym (Rys. 33) [48].



Rysunek 33. Autocondensacja analogów acetofenonu, R – alkil
 Figure 33. Autocondensation of analogues of acetophenone, R – alkyl

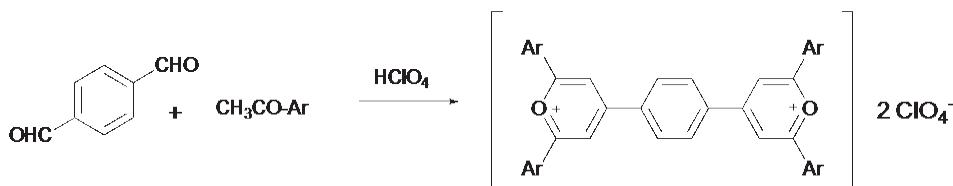
3.7. SYNTEZY C₂₊₁₊₂

Metoda została odkryta przez Dithey'a w 1919 roku i polega na reakcji aldehydów z analogami acetofenonu [49]. W pierwszym etapie syntezy dochodzi do utworzenia odpowiedniego chalkonu, a następnie reakcja biegnie według metody C₃₊₂ (Rys. 34).



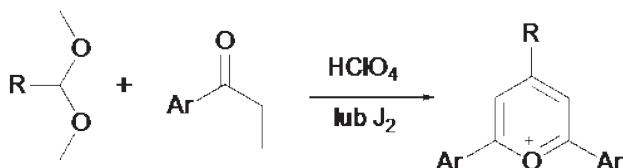
Rysunek 34. Otrzymywanie soli piryliowych z aldehydów i acetofenonu lub jego analogów
 Figure 34. Preparation of pyrylium salts from aldehydes and acetophenone or its analogues

Do środków kondensujących stosowanych w tej reakcji należą: chlorek żelaza(III) [49], chlorek fosforu w kwasie nadchlorowym [50], trifluorek boru [51], oraz kwas nadchlorowy. Użycie ostatniego wymienionego odczynnika prowadzi do otrzymania podwójnych soli piryliowych (Rys. 35) [52].



Rysunek 35. Otrzymywanie podwójnych soli piryliowych
 Figure 35. Preparation of bis-pirylium perchlorates

W analogiczny sposób reagują acetale aldehydów pod wpływem kwasu nadchlorowego lub jodu cząsteczkowego (Rys. 36) [53].



Rysunek 36. Synteza soli piryliowych z acetali aldehydów i ketonów w obecności HClO_4 lub J_2

Figure 36. Synthesis of pyrylium salts from acetals of aldehydes with ketones in the presence of HClO_4 or J_2

PODSUMOWANIE

Sole piryliowe są aktywnymi związkami heterocyklicznymi, zawierającymi w swojej budowie trójwartościowy atom tlenu, czyniąc je wrażliwymi na odczynniki nukleofilowe.

Różnorodna reaktywność soli piryliowych sprawia, że stanowią wartościowe półprodukty do dalszych przemian, m.in. pochodnych benenu, węglowodorów cyklicznych, ketonów niecyklicznych, układów heterocyklicznych z jednym, dwoma lub więcej heteroatomami.

Ze względu na możliwość zastosowania ich w różnych dziedzinach przemysłu, z roku na rok obserwuje się coraz większe zainteresowanie solami piryliowymi i wykorzystaniem ich w szczególności w syntezach totalnych, głównie do związków biologicznie aktywnych. Wynika to z faktu, że tak otrzymane związki często są niedostępne innymi drogami lub ich synteza jest nieopłacalna.

W niniejszej pracy przedstawiono różnorodne metody syntezy soli piryliowych przy użyciu prostych i stosunkowo łatwo dostępnych odczynników. Pierwsza z przedstawionych metod polegała na przekształceniu istniejącego układu piranu w kation. Kolejna opierała się na cyklizacji łańcucha pięciowęglowego α,β -nienasycony 1,5-diketonów pod wpływem kwasów lub utleniaczy. Dalej opisano metody syntezy typu C_{4+1} , oparte na kondensacji pochodnych krotonyloowych w środowisku kwasowym, a także syntezy typu C_{3+2} , polegające głównie na kondensacji nienasyconych ketonów. Do metod charakteryzujących się wysokimi wydajnościami oraz czystością produktu należą syntezy C_{2+2+1} . Polegają one na kondensacji acetofenonu lub jego analogów z kationami acylowymi w środowisku kwasowym. Ostatni rodzaj syntezy soli piryliowych polega na kondensacji analogów acetofenonu z aldehydami.

PIŚMIENIICTWO CYTOWANE

- [1] J.A. Soroka, Praca doktorska, Politechnika Szczecińska, 1981, 79.
- [2] A.T. Balaban, Top Heterocycl. Chem., 2009, **19**, 2009, 203.
- [3] A. Mouradzadegun, F. Abadast, Synlett., 2014, 448.
- [4] A.M. Bello, L.P. Kotra, Tetrahedron Lett., 2003, **44**, 9271.
- [5] A.T Balaban, W. Schroth, G.W. Fischer, Adv. Heterocycl. Chem., 1969, **10**, 241.
- [6] A.R. Katritzky, R.T.C. Brownlee, G. Musumarra, Heterocycl., 1979, **12**, 775.
- [7] M.A. Miranda, H. García, Chem. Rev., 1994, **94**, 1063.
- [8] E.J. Duarte, L.W. Hillman, *Dye Laser Principles With Applications*, Academic, New York 1990, str. 5.
- [9] C. Arcoumanis, J.J. McGuirk, J.M.L.M. Palma, Exp. Fluids., 1990, **10**, 177.
- [10] B.A. Rao, J.Y. Lee, Y. Son, Supramol. Chem., 2015, 191.
- [11] A. Beltrán, M.I. Burguete, D.R. Abánades, D. Pérez-Sala, S.V. Luis, F. Galindo, Chem. Commun., 2014, **50**, 3579.
- [12] B.K. Wetzl, S.M. Yarmoluk, D.B. Craig, O.S. Wolfbeis, Angew. Chem. Int. Ed., 2004, **43**, 5400.
- [13] M. Shariatgorji, A. Nilsson, P. Källback, O. Karlsson, X. Zhang, P. Svensson, P.E. Andren, J. Am. Soc. Mass Spectrom., 2015, **26**, 934.
- [14] T. Fossen, L. Cabrita, O.M. Andersen, Food Chem., 1998, **63**, 435.
- [15] A.R. Katritzky, C.A. Ramsden, J. Joule, V. Zhdankin, *Handbook of Heterocyclic Chemistry*, Wyd. 3, Elsevier, Amsterdam 2010, str. 55.
- [16] A.T. Balaban, W. Schroth, G. Fischer, Adv. Heterocycl. Chem., 1969, **10**, 241.
- [17] S. Kostanecki, G. Rossbach, Ber. Dtsch. Chem. Ges., 1896, **29**, 1488.
- [18] J.N. Collie, T. Tickle, J. Chem. Soc., 1899, **75**, 710.
- [19] R. Wizinger, A. Grüne, E. Jacobi, Helv. Chim. Acta, 1956, **39**, 4.
- [20] K. Dimroth, K.H. Wolf, Angew. Chem., 1960, **72**, 777.
- [21] O.F. Voziyanova, S.N. Baranov, S.V. Krivun, Zh. Obshch. Khim., 1970, **40**, 1905.
- [22] S.N. Baranov, M.A. Dumbaj, S.V. Krivun, Khim. Geterotsikl. Soedin., 1972, **10**, 1313.
- [23] S.V. Krivun, G.N. Dorofeenko, S. Kowalewskij, Khim. Geterotsikl. Soedin., 1970, **6**, 733.
- [24] H. Staudinger, N. Koh, Ann. Chem., 1911, **384**, 38.
- [25] J.P. Andriechikov, N.V. Kholodova, G.N. Dorofeenko, Zh. Org. Khim., 1977, **13**, 1566.
- [26] J.A. Van Allan, G.A. Reynolds, J. Org. Chem., 1968, **33**, 1102.
- [27] W. Dilthey, Ber. Dtsch. Chem. Ges., 1917, **50**, 1008.
- [28] M. Siemiatycki , R. Fugnitto, Bull. Soc. Chim. Fr., 1961, 538.
- [29] S.A. Basker, T. Riley, J. Chem. Soc. Perkin Trans., 1972, **1**, 809.
- [30] W. Dilthey, B. Burger, Ber. Dtsch. Chem. Ges., 1921, **54**, 825.
- [31] W.C. Dovery, R. Robinson, J. Chem. Soc., 1935, 1389.
- [32] W. Schroth, G. Fischer, Ber. Dtsch. Chem. Ges., 1969, **102**, 1214.
- [33] H.J.T. Bos, J.F. Arens, Rec. Trav. Chim., 1963, **82**, 845.
- [34] V.V. Mezheritski, A.L. Wasserman, G.N. Dorofeenko, Khim. Geterotsikl. Soedin., 1972, **9**, 1163.
- [35] W. Schroth, G. Fischer, Ber. Deut. Chem. Ges., 1969, **102**, 1214.
- [36] W. Schroth, G. Fischer, J. Rottmann, Ber. Dtsch. Chem. Ges., 1969, **102**, 1202.
- [37] W. Schroth, G. Fischer, Angew. Chem., 1963, **75**, 574.
- [38] G.W.A. Fowlers, A.D. Rice, K.J. Shanton, J. Chem. Res., 1977, 3.
- [39] F. Feist, Ber. Dtsch. Chem. Ges., 1925, **58**, 231.
- [40] R. Robinson, Ber. Dtsch. Chem. Ges., 1934, **67**, 85.
- [41] A.T. Balaban, A. Bota, F. Chiraleu, E. Sliau, A. Hanes, C. Draghici, Rev. Roum. Chim., 1977, **22**, 1003.

- [42] A.T. Balaban, M. Gavat, P.T. Frangopol, M. Mocan, C.D. Nenitzescu, Rev. Roum. Chim., 1964, **9**, 79.
- [43] S.E. Earnest, D.B. Brown, J. Heterocycl. Chem., 1975, **12**, 815.
- [44] W. Schneider, F. Seebach, Ber. Dtsch. Chem. Ges., 1921, **54**, 2285.
- [45] W. Dilthey, J. Prakt. Chem. 1916, **94**, 53.
- [46] O. Diels, K. Alder, Ber. Dtsch. Chem. Ges., 1959, **92**, 2042.
- [47] R. Schmidt, Ber. Dtsch. Chem. Ges., 1965, **98**, 337.
- [48] W.C. Dovery , R. Robinson, J. Chem. Soc., 1935, 1389.
- [49] W. Dilthey, Ber. Dtsch. Chem. Ges., 1919, **52**, 1195.
- [50] R. Wizinger, P. Urlich, Helv. Chim. Acta, 1956, **39**, 217.
- [51] R. Lombard, J.P. Stephan, Bull. Soc. Chim. Fr., 1958, 1458.
- [52] S.V. Krivun, G.N. Dorofeenko, Zh. Obshch. Khim., 1964, **34**, 2091.
- [53] G.N. Dorofeenko, S.M. Lukjanov, E.S. Mackowskaja, Zh. Org. Khim., 1972, **8**, 1960.

Praca wpłynęła do Redakcji 20 grudnia 2016

BADANIA FTIR-ATR I FLUORESCENCYJNE UKŁADÓW BIAŁKOWO-LIPIDOWYCH

FTIR-ATR AND FLUORESCENCE STUDIES OF PROTEIN-LIPID SYSTEMS

**Adriana Litwińczuk-Mammadova,
Katarzyna Cieślik-Boczula*, Maria Rospenk**

Uniwersytet Wrocławski, Wydział Chemiczny

ul. F. Joliot-Curie 14, 50-383 Wrocław

**e-mail: katarzyna.cieslik@chem.uni.wroc.pl*

Abstract

Wykaz stosowanych symboli i oznaczeń

Wprowadzenie

1. Spektroskopia FTIR-ATR

1.1. Organia fosfolipidów

1.2. Widmo FTIR-ATR białek

2. Spektroskopia fluorescencyjna

2.1. Wewnętrzna fluorescencja białek

2.2. Efekt czerwonego przesunięcia fali wzbudzenia

2.3. Sondy fluorescencyjne jako markery błon lipidowych

2.4. Anizotropia fluorescencji

Uwagi końcowe

Podziękowanie

Piśmiennictwo cytowane

Dr Adriana Litwińczuk-Mammadova ukończyła studia magisterskie w 2010 roku na kierunku Informatyka Chemiczna na Wydziale Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego. Stopień doktora nauk chemicznych uzyskała w roku 2016 po publicznej obronie rozprawy doktorskiej pt. „Chemometrycznie wspomagana analiza oddziaływania α -laktoalbuminy z modelową błoną lipidową”. Jej zainteresowania naukowe obejmują oddziaływanie w układzie białkowo-lipidowym, przejścia fazowe dwuwarstw lipidowych, pośrednie stany konformacyjne białek i aplikacje metod chemometrycznych do analizy danych spektralnych.

Dr Katarzyna Cieślik-Boczula w roku 2002 ukończyła studia na Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego. Praca magisterska dotyczyła fizyko-chemicznych badań cieni erytroцитów modyfikowanych związkami chemicznymi o aktywności biologicznej. Pracę doktorską pt. „Właściwości fotofizyczne i funkcje biologiczne pochodnych fenoli.” obroniła z wyróżnieniem w 2007 roku pod kierunkiem prof. dr hab. Aleksandra Kolla na Wydziale Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego. Aktualnie realizowane kierunki prac badawczych dotyczą badań struktury i właściwości fizykochemicznych błon lipidowych i układów białkowych metodami FTIR, FTIR-ATR, VCD, TEM, DSC i spektroskopii fluorescencyjnej. Jej zainteresowania obejmują procesy fibrylogenezy i sposobów jej modyfikacji oraz błonowo -zależne mechanizmy chemoprewencyjnej aktywności związków z rodziny fenotiazyn.

Prof. dr hab. Maria Rospenk absolwentka chemii Wydziału Matematyki, Fizyki i Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego (1969). Stopień naukowy doktora nauk chemicznych uzyskała na Uniwersytecie Wrocławskim w 1977 roku na podstawie rozprawy „Badania wiążania wodorowego w kompleksach zasad tlenowych z HCl i HBr oraz ich deuterowanymi analogami” wykonanej pod kierunkiem prof. Lucjana Sobczyka. Habilitowała się w zakresie chemii fizycznej i teoretycznej w 1992 r., tytuł rozprawy „Równowaga przeniesienia protonu w wewnętrzczasteczkowym wiążaniu wodorowym w zasadach Mannicha”. W 2004 r. otrzymała tytuł naukowy Profesora, nadany przez Prezydenta RP. Jej zainteresowania naukowe obejmują badania nad stanem wewnętrz- i międzycząsteczkowego wiążania wodorowego oraz jego wpływu na właściwości fizykochemiczne różnorodnych układów.

ABSTRACT

Lipid-protein systems play curtail roles in living systems [49]. Hence, a determination of their structure at different levels of organization is still one of the most important tasks in many research projects. A study of lipid-protein systems is based on many physicochemical techniques, such as spectroscopy of FTIR, Raman, fluorescence, NMR, EPR, as well as DLS, DSC and TEM methods. In the presented paper two of the most frequently used methods, that is FTIR and fluorescence spectroscopy, will be discussed in details. They are characterized by a relatively low cost of sample preparation, a short measuring time, and they give a huge number of structural and physicochemical information about lipid-protein systems. In the FTIR-ATR spectroscopy many of vibrational bands are commonly used as very precise vibrational indicators of structural changes in lipids and proteins (Fig. 1) [1–6]. They allow to characterize lipid and protein components separately in mixed systems. Additionally, structural changes in lipid membranes can be monitored in one FTIR-ATR experiment simultaneously in a region of hydrophilic lipid head-groups (Fig. 5) [17, 18], in a hydrophobic part composed of hydrocarbon lipid chains (see Figures 2 and 3) [7–9], and in a lipid membrane interface represented by ester lipid groups (Fig. 4) [4, 6, 11, 12]. A secondary structure of proteins and peptides in different experimental conditions can be defined in the FTIR-ATR spectroscopy on the base of amide I bands (Fig. 6 and Tabs 1, 2 and 3) [20–22]. A fluorescence spectroscopy is a complementary methods to FTIR spectroscopy in a study of lipid-protein systems. It competes information about time-dependent and very fast (in a scale of femtoseconds) structural processes in both lipids [41–45] and proteins [23, 27, 48]. The folding, denaturation, and aggregation of proteins and lipid membranes accompanied by changes in an order, packing and hydration of the system under study [23, 27, 41–45, 48].

Keywords: FTIR-ATR spectroscopy, fluorescence spectroscopy, anisotropy, REES effect, fluorescence quenching, fluorescent probes, protein, lipid

Słowa kluczowe: spektroskopia FTIR-ATR, spektroskopia fluorescencyjna, anizotropia, efekt REES, wygaszanie fluorescencji, model stanów dyskretnych Trp, sondy fluorescencyjne, białko, lipid

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

- α -laktoalbumina (ang. *α -lactalbumin*)
- AF – anizotropia fluorescencji
- ATR – technika osłabionego całkowitego odbicia (ang. *attenuated total reflectance*, ATR)
- DPPC – dipalmitoilofosfatylocholina (ang. *dipalmitoilphosphatidylcholine*)
- FFT – szybka transformata Fouriera (ang. *fast Fourier transform*)
- FTIR-ATR – Fourierowska spektroskopia osłabionego całkowitego odbicia w podczerwieni (ang. *Fourier transform infrared attenuated total reflectance*)
- FRET – fluoresencyjne rezonansowe przeniesienie energii (ang. *fluorescence resonance energy transfer*), homo FRET – efekt występujący między flouroforami jednego rodzaju
- H – heksagonalna symetria upakowania (ang. *hexagonal packing*)
- IR – podczerwień (ang. *infrared*)
- L_α – lamelarna faza ciekłokrystaliczna (ang. *lamellar liquid crystalline*)
- L_β – lamelarna faza żelowa (ang. *lamellar gel phase*)
- O_\perp – ortorombowa symetria upakowania (ang. *orthorhombic packing*)
- REES – efekt czerwonego przesunięcia fal wzbudzenia (ang. *red edge excitation shift*)
- RF – rezonans Fermiego
- TEM – transmisyjna mikroskopia elektronowa (ang. *transmission electron microscopy*), cryo-TEM – niskotemperaturowa odmiana TEM,
- Tm – temperatura głównego przejścia fazowego (ang. *main phase transition temperature*)

WPROWADZENIE

Układy białkowo-lipidowe stanowią podstawowe składniki budulcowe każdej błony biologicznej. Dzięki dużej różnorodności w składzie chemicznym błon biologicznych, mogą one pełnić wiele zasadniczych funkcji biologicznych, np. uczestnictwo w separacji komórek i organelli wewnętrzkomórkowych, komunikacji biologicznej poprzez m.in. kontrolę nad transportem energii i enzymów między oddzielonymi obszarami komórek, oraz współudział w wielu szlakach metabolicznych [49]. Ze względu na zasadniczą rolę w funkcjonowaniu żywych organizmów, systemy białkowo-lipidowe stały się przedmiotem szerokich badań, w których zaangażowano różnorodne metody fizykochemiczne, np. spektroskopię FTIR, Ramana, fluorescencyjną, NMR, EPR czy technikę DLS, DSC i transmisyjną mikroskopię elektronową (TEM). W ramach niniejszej pracy zostaną szczegółowo omówione dwie z wyżej wymienionych metod pomiarowych, tj. spektroskopia FTIR oraz fluorescencyjna. Metody te ze względu na relatywnie niski koszt przygotowania próbek, krótki czas pomiarowy a z drugiej strony bogactwo uzyskanych informacji o badanym układzie są szczególnie często stosowane do badań nad układami białkowo-lipidowymi. Zaletą spektroskopii FTIR jest możliwość uzyskania na podstawie analizy otrzymanych widm szczegółowych informacji strukturalnych o badanym układzie. Występowanie szeregu pasm FTIR będących swoistymi markerami różnych zmian strukturalnych pozwala na jednoczesny opis stanów konformacyjnych, oddziaływań wewnętrz- i międzycząsteczkowych w skali nie tylko całego układu ale również w odniesieniu do poszczególnych jego części. Komplementarną metodą jest spektroskopia fluorescencyjna, która pozwala uzupełnić informacje strukturalne, otrzymane na podstawie widm FTIR, o czasowo-zależną charakterystykę bardzo szybkich procesów, tzn. zachodzących np. w skali femtosekundowych. Procesy foldingu i agregacyjne białek wynikające ze zmiany w uporządkowaniu, upakowaniu i uwodnieniu układu mogą być z powodzeniem śledzone z wykorzystaniem spektroskopii fluorescencyjnej.

1. SPEKTROSKOPIA FTIR-ATR

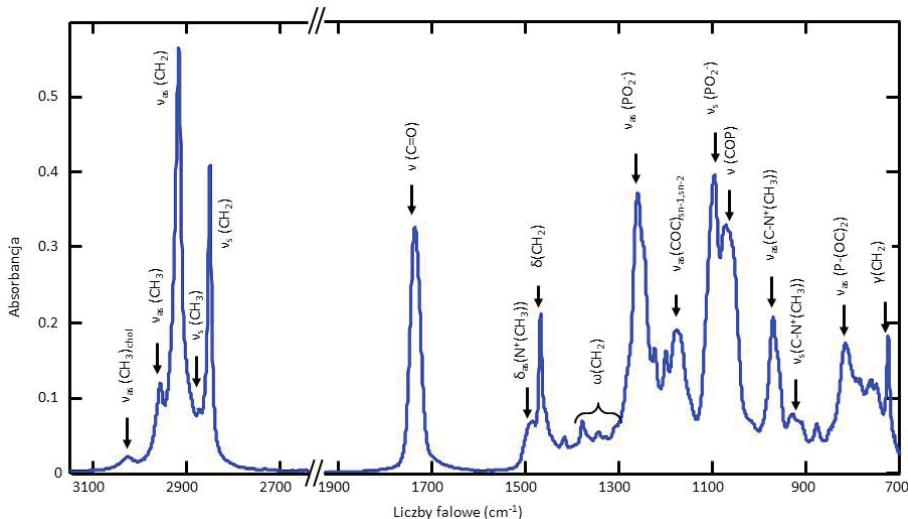
Fourierowska spektroskopia osłabionego całkowitego odbicia w podczerwieni (ang. *Fourier transform infrared attenuated total reflectance*, FTIR-ATR) jest jedną z powszechnie stosowanych technik do badań układów biologicznych, począwszy od peptydów zawierających jedynie kilka reszt aminokwasowych w cząsteczce po wyizolowane enzymy a nawet kompleksy peptyd-białko i białko-błona lipidowa o dużych masach cząsteczkowych. Metoda ta dostarcza informacji o strukturze i oddziaływaniach międzycząsteczkowych jak również ujawnia zmiany strukturalne wywołane zewnętrznym zaburzeniem (np. temperaturą lub pH) [1, 2]. Zastosowanie w spektroskopii FTIR procedury szybkiej transformaty Fouriera (ang. *fast Fourier transform*, FFT) umożliwia gromadzenie znacznej liczby interferogramów

i zwiększenie stosunku sygnału do szumu (S/N), co sprawia, że zarejestrowane widma odznaczają się zadawalającą rozdzielczością [1] i mogą być z powodzeniem stosowane przy badaniu układów biologicznych w środowisku wodnym.

Spektroskopia FTIR w połączeniu z techniką osłabionego całkowitego odbicia (ang. *attenuated total reflectance*, ATR) umożliwia rejestrację widm substancji nienTransparentnych, próbek o niskim stężeniu ($\leq 0,3 \text{ mg/mL}$), zarówno w rozpuszczalniku wodnym jak i organicznym, w zawiesinie, czy też w środowisku błony lipidowej [1–6]. Należy w tym miejscu podkreślić, że metoda FTIR-ATR dostarcza informacji o wąskiej warstwie próbki stycznej do powierzchni kryształu [5].

1.1. DRGANIA FOSFOLIPIDÓW

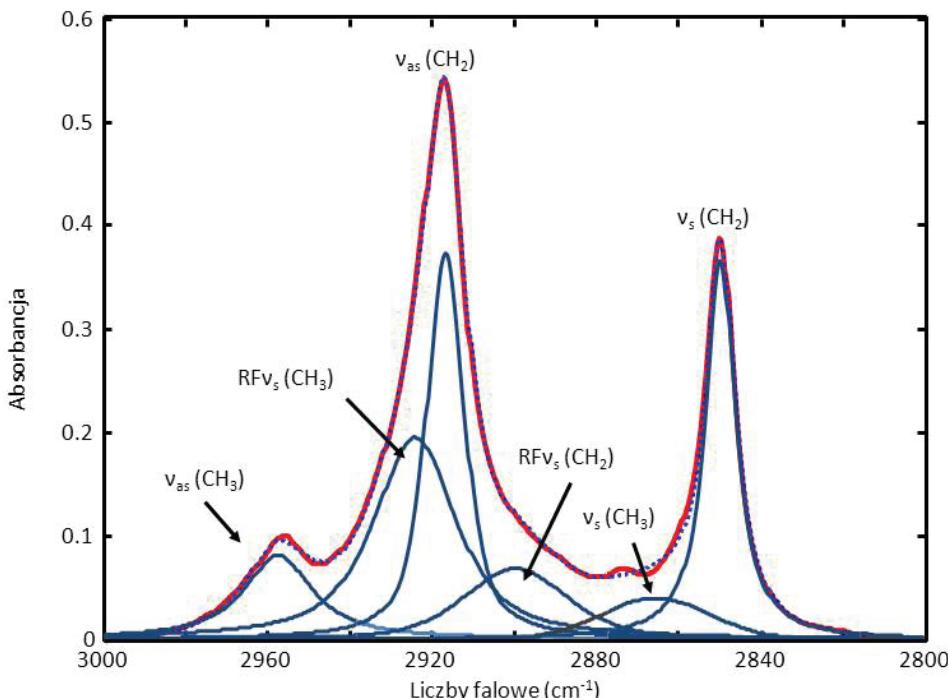
Wynikiem absorpcji światła w zakresie średniej podczerwieni przez cząsteczki fosfolipidów, np. dipalmitoilofosfatylocholina (DPPC) jest zbiór pasm drgań normalnych w zakresie od 4000 do 700 cm^{-1} . Rysunek 1 przedstawia widmo FTIR-ATR dwuwarstw DPPC w postaci suchego filmu wraz z przypisaniem pasm, których przeważająca większość stanowi powszechnie używanie markery zmian strukturalnych badanych błon lipidowych.



Rysunek 1. Widmo FTIR-ATR suchego filmu DPPC o pH 8 zarejestrowane w temperaturze 25°C
Figure 1. FTIR-ATR spectrum of the dry DPPC film at pH 8 and 25°C

Drgania rozciągające apolarnych łańcuchów węglowodorowych tj. grup metylenowych i metylowych, występują w rejonie wysokoczęstotliwościowym od 3100 do 2800 cm^{-1} . Pasma drgań rozciągających grupy metylenowej ($\nu(\text{CH}_2)$), charakteryzują się najwyższą intensywnością z pośród wszystkich pasm fosfolipidu i leżą przy około 2920 i 2850 cm^{-1} , odpowiednio dla drgania $\nu_{as}(\text{CH}_2)$ i $\nu_s(\text{CH}_2)$. Parametry spektralne

tych pasm jak położenie i kształt, silnie korelują z rodzajem fazy liołopowej i termotropowej agregatów lipidowych. Ogrzewanie dwuwarstwy powyżej temperatury głównego przejścia fazowego prowadzi do przesunięcia pasm $\nu_{as,s}(\text{CH}_2)$ w stronę wyższych liczb falowych i do ich wyraźnego poszerzenia w wyniku wzrostu liczby konformacji *gauche* wzduż wiązań C-C łańcuchów alkilowych budujących cząsteczki lipidowe. Pasma drgań grup metylowych występują przy około 2956 cm^{-1} ($\nu_{as}(\text{CH}_3)$) i 2870 cm^{-1} ($\nu_s(\text{CH}_3)$). Są to pasma o małej intensywności, przez co ich analiza jest utrudniona. Ponadto, rozkład pasm występujących w rejonie wysokoczęstotliwościowym (Rys. 2) pozwala na ujawnienie dwóch dodatkowych pasm, tj. $RF\nu_s(\text{CH}_3)$ i $RF\nu_s(\text{CH}_2)$ leżących odpowiednio przy 2934 i 2900 cm^{-1} i będących wynikiem rezonansu Fermiego (RF) pomiędzy pierwszym nadtonem drgania $\delta_s(\text{CH}_2)$ i drgań $\nu_s(\text{CH}_3)$ oraz $\nu_s(\text{CH}_2)$ [7]. Położenie pasm $RF\nu_s(\text{CH}_3)$ i $RF\nu_s(\text{CH}_2)$ silnie zależy od natury dwuwarstw lipidowych, tj. składu chemicznego, stopnia uwodnienia i fazy termotropowej błony lipidowej [8].



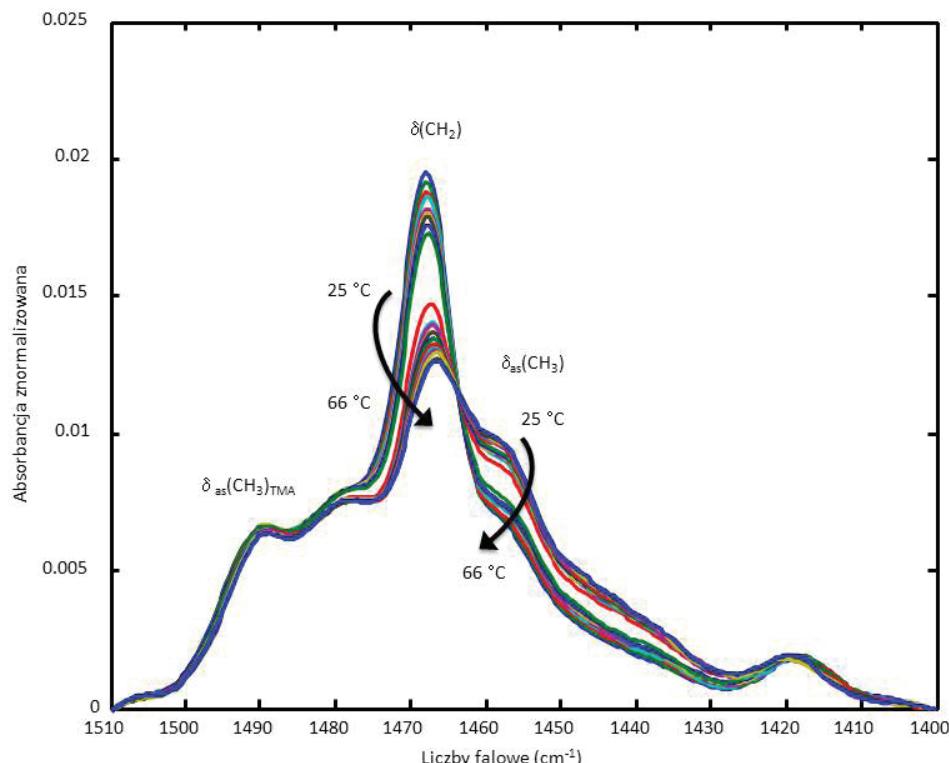
Rysunek 2. Dekonwolucja pasm występujących w zakresie $3000\text{--}2800 \text{ cm}^{-1}$ dla dwuwarstw DPPC o pH 8 w postaci suchego filmu

Figure 2. Deconvolution of bands in the range of $3000\text{--}2800 \text{ cm}^{-1}$ for the DPPC dry film at pH 8

Drgania deformacyjne grup CH_2 i CH_3 dają pasma leżące w obszarze $1500\text{--}1190 \text{ cm}^{-1}$. Z pośród drgań zginających grupy CH_2 należy wyróżnić drgania: nożykowe ($\delta(\text{CH}_2)$), wachlarzowe ($\omega(\text{CH}_2)$) oraz kołyszące ($\gamma(\text{CH}_2)$). Pasma pochodzące od $\delta(\text{CH}_2)$ i $\gamma(\text{CH}_2)$ dominują odpowiednio w zakresach $1480\text{--}1465 \text{ cm}^{-1}$

i $720\text{--}730\text{ cm}^{-1}$. Ich położenie i liczba odzwierciedlają siłę oddziaływań międzyłańcuchowych i dostarczają informacji o upakowaniu łańcuchów węglowodorowych w hydrofobowej części błon lipidowych. Rysunek 3 przedstawia widma IR w zakresie pasma drgań $\delta(\text{CH}_2)$ zawiesiny liposomów DPPC zarejestrowane w funkcji temperatury. W miarę wzrostu temperatury układu, pasmo drgań $\delta(\text{CH}_2)$ przesuwa się w stronę niższych liczb falowych w wyniku zmiany symetrii upakowania błony DPPC z heksagonalnej do zaburzonej heksagonalnej. Natomiast, wzrost temperatury powoduje przesunięcie pasma drgań $\gamma(\text{CH}_2)$ w stronę przeciwną tj. w kierunku wyższych liczb falowych [8, 9].

Seria pasm drgań $\omega(\text{CH}_2)$ występuje w przedziale liczb falowych od 1370 do 1190 cm^{-1} [8, 9]. Ich liczba koreluje z konformacją i ilością grup CH_2 budujących łańcuchy węglowodorowe cząsteczek lipidowych. Dla fosfatydylcholin z uporządkowanymi łańcuchami mirystynowymi w konformacji *all-trans* pierwsze z sześciu pasm progresji pojawia się przy 1325 cm^{-1} a ostatnie przy 1204 cm^{-1} . Należy podkreślić, że pasma te silnie pokrywają się z pasmem drgań $\nu_{\text{as}}(\text{PO}_2^-)$ [8].

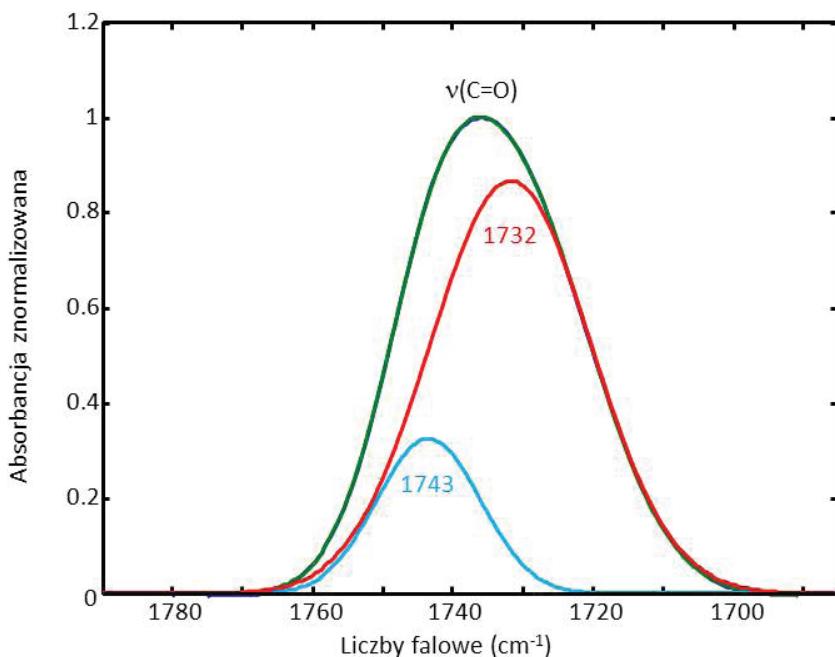


Rysunek 3. Widma FTIR-ATR w zakresie pasma drgań $\delta(\text{CH}_2)$ uwodnionego filmu DPPC o pH 8 zarejestrowane w funkcji temperatury od 25 do 66°C

Figure 3. FTIR-ATR spectra in $\delta(\text{CH}_2)$ band range of the hydrated DPPC film at pH 8 collected from 25 to 66°C

W przypadku wysokotemperaturowych faz termotropowych błon lipidowych, drgania wachlarzowe grup CH_2 dają także pasma leżące powyżej 1330 cm^{-1} . Ich położenie odzwierciedla miejsce występowania konformacji typu *gauche* w łańcuchu węglowodorowym. Konformacja *gauche* znajdująca się przy terminalnej grupie CH_3 (ang. *end gauche*) daje pasmo przy około 1340 cm^{-1} . Z kolei, pasmo sekwencji *gauche-gauche* (ang. *double gauche*) znajduje się około 1350 cm^{-1} . W przypadku, gdy dwie formy *gauche* oddziela konformacja *trans* (*gauche-trans-gauche*, *gtg*) powstaje zgięcie (ang. *kink*) łańcucha alkilowego, któremu odpowiada pasmo przy $\sim 1370 \text{ cm}^{-1}$ [8]. Pasmo położone przy $\sim 1378 \text{ cm}^{-1}$ jest rezultatem symetrycznego drgania deformacyjnego ($\delta_s(\text{CH}_3)$, ang. *methyl umbrella*) końcowych grupy CH_3 łańcucha alifatycznego, zaś, pasmo pochodzące od jego asymetrycznego odpowiednika ($\delta_{as}(\text{CH}_3)$) jest położone przy około 1460 cm^{-1} . Ponieważ, absorbancja drgania $\delta_s(\text{CH}_3)$ jest niewrażliwa na konformację łańcucha, jego pasmo jest często stosowane jako standard wewnętrzny do normalizacji intensywności sąsiednich pasm drgania $\omega(\text{CH}_2)$ [8].

Pasmo pojawiające się na widmie fosfatydylocholin w zakresie $1750\text{--}1700 \text{ cm}^{-1}$ pochodzi od drgań rozciągających grupy estrowej. Położenie i liczba składowych tego pasma silnie zależą od sąsiedztwa grup polarnych i liczby utworzonych wiązań wodorowych. W przypadku dwuwarstwy w postaci suchego filmu, rozkład pasma $\nu(\text{C=O})$ odsłania dwie składowe z maksimum przy 1742 i 1725 cm^{-1} . Pierwsza składowa odpowiada drganiu grupy C=O łańcucha tłuszczowego w konformacji *sn-1* znajdującej się bliżej hydrofobowych obszarów zajmowanych przez łańcuchy węglowodorowe. Natomiast, drugie pasmo składowe odpowiada grupie C=O łańcucha tłuszczowego w konformacji *sn-2* ulokowanej w sąsiedztwie fragmentu fosforanowego części polarnej dwuwarstwy [4, 6, 11, 12]. Pomimo wielu badań dotyczących pasma drgań $\nu(\text{C=O})$ uwodnionej dwuwarstwy lipidowej, jego analiza jest wciąż tematem otwartym. Blume i współpracownicy [13] oraz Lewis i współpracownicy [14], którzy zastosowali izotopowe podstawienie $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ do badań nad konturem pasma grupy C=O dla uwodnionych dwuwarstw DPPC, zróżnicowali składowe pasma $\nu(\text{C=O})$ ze względu na liczbę utworzonych wiązań wodorowych z polarnymi cząsteczkami. Subpasmo przy wyższych liczbach falowych (Rys. 4A) odpowiada drganiu grupy C=O cechująccej się słabyszymi i lub mniej licznymi kontaktami z cząsteczkami wody. Natomiast subpasmo przesunięte w stronę niższych liczb falowych pochodzi od drgań grupy C=O zaangażowanej w większą liczbę wiązań wodorowych z polarnymi cząsteczkami wody. Przejście z fazy żelowej do fazy ciekłokrystalicznej błony lipiodowej wiąże się ze zmniejszeniem populacji pasma przy wyższych liczbach falowych na rzecz pasma przy niższych liczbach falowych, co skutkuje przesunięciem całej obwiedni pasma eksperymentalnego w stronę dalekiej podczerwieni.



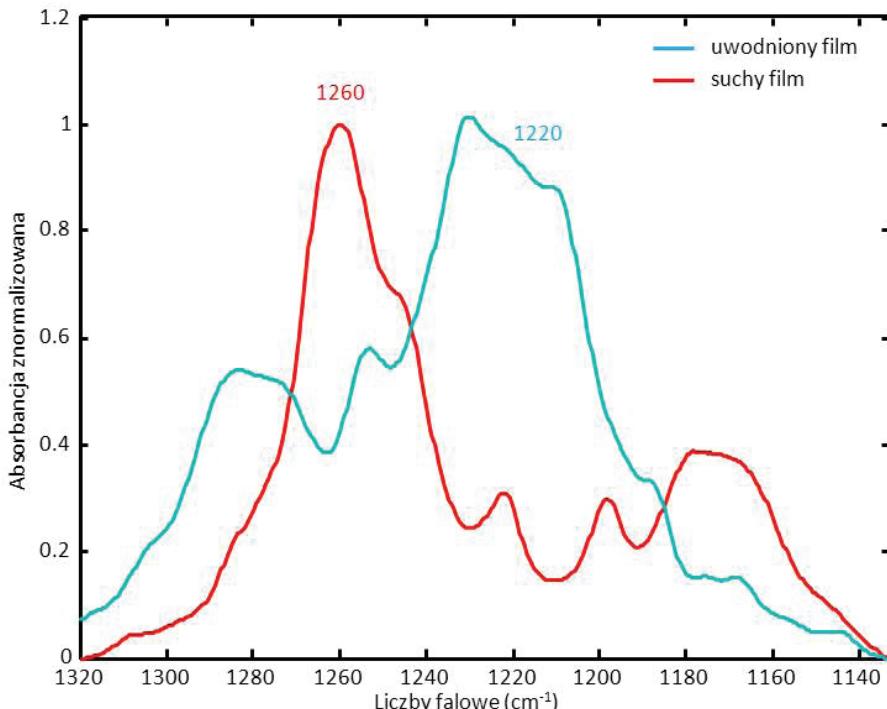
Rysunek 4. Widmo FTIR-ATR w zakresie pasma drgań $\nu(\text{C}=\text{O})$ uwodnionych filmów DPPC o pH 8 w fazie żelowej

Figure 4. FTIR-ATR spectra in the range of $\nu(\text{C}=\text{O})$ band of the hydrated DPPC film at pH 8 in a gel phase

Pasma drgań $\nu(\text{COC})$ antysymetryczne i symetryczne występują odpowiednio przy 1180 i 1075 cm^{-1} [15]. Pasmo drgań $\nu_{\text{as}}(\text{COC})$ często ulega rozszczepieniu na dwie składowe z maksimum przy 1190 i 1170 cm^{-1} pochodzące od absorpcji grup C-O-O w poszczególnych łańcuchach *sn-1* i *sn-2* [7, 15]. Binder i współpracownicy [16] sugerują, że zmiany w obrębie tych pasm są związane ze wzrostem uwodnienia.

Najbardziej rozpoznawalnymi pasmami drgań części polarnej fosfolipidowych błon lipidowych są pasma pochodzące od grupy fosforanowej. Asymetryczne i symetryczne drgania grupy PO_2^- dają pasma odpowiednio w zakresach: 1255 – 1225 cm^{-1} ($\nu_{\text{as}}(\text{PO}_2^-)$) i 1095 – 1085 cm^{-1} ($\nu_{\text{s}}(\text{PO}_2^-)$) [15]. Podobnie jak w przypadku pasma drgań $\nu(\text{C}=\text{O})$, również pasmo drgań $\nu_{\text{as}}(\text{PO}_2^-)$ wykazuje dużą wrażliwość na zmianę polarności otoczenia i możliwość oddziaływanego poprzez wiązanie wodorowe. Podczas uwadniania dwuwarstwy lipidowej maksimum pasma drgania $\nu_{\text{as}}(\text{PO}_2^-)$ przesuwa się w stronę niższych liczb falowych co jest następstwem zwiększenia populacji lipidowych grup fosforanowych oddziałujących z cząsteczkami wody. Rysunek 5 pokazuje zależność między stopniem uwodnienia dwuwarstw DPPC a położeniem pasma $\nu_{\text{as}}(\text{PO}_2^-)$. Ponadto, Lee i Chapman [17] wykazali, że w przypadku uwodnionych dwuwarstw DPPC położenie pasma drgań $\nu_{\text{as}}(\text{PO}_2^-)$ nie ulega zmianie w trakcie głównego przejścia fazowego. Jest to spowodowane wysyceniem wiązań wodorowych przez grupę fosforanową już w fazie żelowej błony, gdzie mamy już do czynienia z utworzeniem pełnej powłoki hydratacyjnej. W konsekwencji dalsze

sze uwodnienie błony lipidowej podczas przejścia do fazy ciekłokrystalicznej nie wpływa na właściwości spektralne drgań grupy PO_2^- . Natomiast, położenie pasma pochodzącego od drgania $\nu_s(\text{PO}_2^-)$ przede wszystkim odzwierciedla zmiany konformacji fragmentu fosforanowego [18].



Rysunek 5. Widma FTIR-ATR w regionie asymetrycznych drgań grupy PO_2^- dla dwuwarstw DPPC o pH 8 w postaci suchego (kolor niebieski) i uwodnionego filmu (kolor czerwony)
 Figure 5. FTIR-ATR spectra of asymmetric vibrations of PO_2^- groups of DPPC bilayers at pH 8, in dry (blue color) and hydrated film (red color)

Ponadto, fragment C-O-P-O-C części fosforanowej cząsteczki lipidu daje pasma przy około 1145, 1120, 1055 i 985 cm⁻¹. Dwa pierwsze pochodzą od drgania rozciągającego wiążania pomiędzy atomem tlenu i węgla połączonym w pierwszym przypadku z częścią cholinową (C^{C}), a w drugim z fragmentem glicerynowym (C^{G}). Dwa kolejne pasma należą do drgania wiążania P-O od strony grupy cholinowej ($\nu(\text{P}-\text{O}(\text{C}^{\text{C}}))$) i glicerynowej ($\nu(\text{P}-\text{O}(\text{C}^{\text{G}}))$) [15].

Pasma drgań grupy cholinowej tworzącej najbardziej zewnętrzną część błony, występują w trzech rejonach widma FTIR. W zakresie od 3050 do 3000 cm⁻¹ pojawia się mało intensywne pasmo pochodzące od drgań $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_3)_{\text{chol}}$. Podczas uwodnienia suchego filmu, pasmo to przesuwa się w kierunku dłuższych fal na skutek osłabienia oddziaływanie między cholinową grupą metylową i grupą fosforanową [12]. Pasma drgań $\delta_{\text{as}}(\text{N}^+(\text{CH}_3))$ i $\delta_{\text{s}}(\text{N}^+(\text{CH}_3))$ występują w sąsiedztwie pasma drgań $\delta(\text{CH}_2)$,

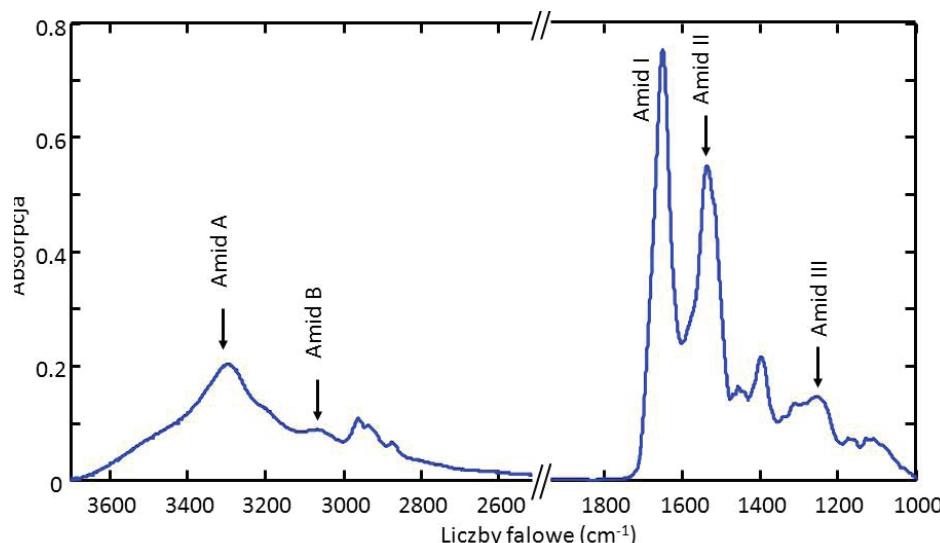
odpowiednio przy 1485 cm^{-1} i 1405 cm^{-1} . Natomiast, pasma drgań $\nu_{as}(\text{C}-\text{N}^+(\text{CH}_3))$ i $\nu_s(\text{C}-\text{N}^+(\text{CH}_3))$ występują przy 970 cm^{-1} i 920 cm^{-1} [15].

1.2. WIDMO FTIR-ATR BIAŁEK

Jedną z najczęściej stosowanych metod w badaniach nad strukturą i dynamiką białek jest spektroskopia w podczerwieni, która pozwala na rejestracje widm białek nie tylko w mętnych zawiesinach, ale również w środowisku dwuwarstwy lipidowej. Wymienione zalety czynią technikę FTIR szczególnie przydatną w poznawaniu mechanizmów procesów zachodzących na poziomie błon biologicznych, stanowiących układy białkowo-lipidowe [4].

Naświetlenie próbki białka promieniowaniem z zakresu średniej podczerwieni, wzbudza drgania grup amidowych łańcucha polipeptydowego oraz reszt aminokwasowych, których charakterystyczne częstości dla licznych grup białek i peptydów są opisane w literaturze [19, 20].

Organia grup szkieletu polipeptydowego są powszechnie charakteryzowane na podstawie drgań wzrorca, tj. *N*-metyloacetamidu, najmniejszej cząsteczki posiadającej grupę amidową w konformacji *trans*. Jeśli przyjmiemy za masy punktowe grupy metylowe, wówczas otrzymamy 6-atomowy układ, który powinien wykonywać 12 drgań normalnych (9 drgań amidowych i 3 drgania szkieletowe) [19]. Rysunek 6 przedstawia 5 najważniejszych pasm amidowych na przykładzie widma FTIR ATR zarejestrowanego dla suchego filmu α -laktoalbuminy.



Rysunek 6. Widmo FTIR-ATR dla suchego filmu α laktoalbuminy przy pH 8 w temperaturze 25°C
 Figure 6. FTIR-ATR spectrum in of α lactalbumin dry film at pH 8 and 25°C

Tabela 1. Charakterystyka pasm amidowych występujących na widmie przedstawionym na Rysunku 6
 Table 1. Characteristics of the amide bands present in the spectrum shown in Figure 6

Przybliżone położenie (cm^{-1})	Symbol pasma amidowego	Przypisanie [2, 19]
~3300	A	$\nu(\text{NH})$ w rezonansie Fermiego z I nadtonem drgania Amid II
~3100	B	
1610–1695	I	$\nu(\text{C=O})$
1480–1575	II	$\delta(\text{NH})$ & $\nu(\text{CN})$
1220–1320	III	$\nu(\text{CN})$ & $\delta(\text{NH})$

Pasma Amid A i B (Tab. 1) są najbardziej przesuniętymi pasmami w stronę bliskiej podczerwieni. Pochodzą od drgania rozciągającego grupy NH sprężonego rezonansem Fermiego z pierwszym nadtonem drgania Amid II. Położenie pasma Amid A zależy od siły oddziaływania wodorowego grupy NH i leży w przedziale od 3310 do 3270 cm^{-1} . Z kolei, pasmo Amid B położone jest w zakresie $3100\text{--}3030 \text{ cm}^{-1}$, jednak z powodu niskiej intensywności jest zwykle pomijane w analizach [19].

W zakresie liczb falowych 1610–1695 cm^{-1} , występuje pasmo Amid I z dominującym wkładem od drgania $\nu(\text{C=O})$. Pozostałe znacznie mniejsze wkłady pochodzą od drgań: $\nu(\text{CN})$, $\delta(\text{CCN})$ i $\delta(\text{NH})$ w płaszczyźnie wiązań. Analiza pasma Amid I odgrywa kluczową rolę w określaniu rodzaju struktury drugorzędowej białka (Tab. 2). W obrębie pasma Amid I występuje szereg pasm składowych, które można wyodrębnić stosując dekonwojucję Fouriera lub metodę fitowania [19]. Ich położenie niemal wyłącznie zależy od siły wiązania wodorowego spinającego poszczególne elementy struktury drugorzędowej (Tab. 2). Podczas określania wkładu struktury β -kartki do struktury białka, należy uwzględnić również fakt, że drganie $\nu(\text{C=O})$ cechuje wysoki molowy współczynnik absorpcji, który podwyższa jego aktywność spektralną [19].

Tabela 2. Położenie składowych pasma Amid I odzwierciedlające rodzaj struktury drugorzędowej białka [2]. 1Wartości molowego współczynnika absorpcji wyznaczono względem wewnętrznego standardu TSPA [21].

Table 2. The position of amide component band and correlated types of protein secondary structure [2]
 1Values molar absorption coefficient was determined relative to the internal standard TSPA [21]

Przybliżone położenie (cm^{-1})	Rodzaj struktury drugorzędowej	Molowe współczynniki absorpcji ¹ [21]
1675–1695	antyrównoległa β -kartka (składowa wysokoczęstościowa)	
1660–1685	β -zgięcie	$1,42 \pm 0,83$
1660–1670	3_{10} helisa	
1648–1660	α -helisa	$2,96 \pm 0,20$
1652–1660	struktury nieregularne	$1,61 \pm 0,07$
1625–1640	antyrównoległa β -kartka (składowa niskoczęstościowa)	$4,27 \pm 0,28$

Przybliżone położenie (cm^{-1})	Rodzaj struktury drugorzędowej	Molowe współczynniki absorpcji ¹ [21]
1610–1628	forma zagregowana β -struktury	

Pasmo Amid II wykazuje także wrażliwość na zmiany w strukturze drugorzędowej badanych białek, choć nie jest ono w interpretacji tak jednoznaczne jak Amid I, głównie z powodu wpływu drgań łańcuchów bocznych. Pasmo Amid II pochodzi głównie od drgania $\delta(\text{NH})$ w płaszczyźnie wiązania i dgrania $\nu(\text{CN})$, natomiast w mniejszym stopniu od drgań $\delta(\text{C-O})$ oraz $\nu(\text{CC})$ i $\nu(\text{NC})$. W zakresie liczb falowych od 1400 do 1200 cm^{-1} występuje pasmo Amid III, które jest wynikiem sprzężenia drgań $\delta(\text{NH})$ i $\nu(\text{CN})$ z niewielkim wkładem od drgań $\delta(\text{C-O})$ oraz $\nu(\text{C-C})$. Pasmo to wykazuje mniejsze powinowactwo do konformacji łańcucha polipeptydowego z powodu znacznego wpływu drgań szkieletu C-C i drgań reszt aminokwasowych. Trzy pasma drgania $\nu(\text{C-C})$ szkieletu leżą w zakresie 1200–880 cm^{-1} [19].

Pomimo, że pasma Amid II i III wykazują mniejszą specyficzność względem przestrzennej konformacji łańcucha polipeptydowego, są również stosowane do określenia typu struktury drugorzędowej (Tab. 3). W przypadku badań prowadzonych metodą spektroskopii w podczerwieni, analizie poddaje się głównie pasma Amid I i II. Natomiast, podczas badań spektroskopią Ramana analizowane są pasma Amid I i III.

Tabela 3. Położenie składowych pasm Amid II i III odzwierciedlające rodzaj struktury drugorzędowej białka [22]

Table 3. The position of subcomponents of Amide II and III bands reflects a type of the protein secondary structure [22]

Rodzaj struktury drugorzędowej	Pasmo amidowe	Przybliżone położenie (cm^{-1})
α -helisa	II	1545
	III	1293, 1300–1311, 1316–1320, 1331
β -kartka	II	1530
	III	1223–1225, 1231–1238, 1242, 1248–1251
β -zgięcie	II	1528, 1577
struktury nieregularne	III	1244, 1259–1269, 1280–1290

Analiza widm FTIR wodnych roztworów białka może stwarzać duże problemy z powodu silnego nakładania się pasm pochodzących od drgań rozpuszczalnika z pasmami amidowymi. W zakresie charakterystycznym dla pasm Amid A i B występują pasma drgania $\nu_{\text{as,s}}(\text{OH})$ wody. Z kolei, pasmo Amid I jest zasłaniane przez silne pasmo drania $\delta(\text{OH})$ wody. W celu uzyskania widma czystego białka należy zastosować procedurę odjęcia widma zarejestrowanego dla samego rozpuszczalnika [1, 2, 5].

Dodatkowo badanie struktury drugorzędowej na podstawie pasm amidowych jest utrudnione z powodu występowania w ich zakresach pasm drgań łańcuchów bocznych. Oszacowano, że 10–30% całkowitej absorpcji występującej w zakresie liczb falowych od $1610\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$ pochodzi od drgań łańcuchów bocznych. Są to przede wszystkim pasma drgań $\nu(\text{C=O})$ grupy Gln i Asn oraz $\nu_{\text{as,s}}(\text{CN}_3\text{H}_5^+)$ grupy Arg [20]. Jednak, analiza pasm reszt aminokwasowych, może także dostarczyć ważnych informacji o mechanizmach reakcji, w której badane białko jest zaangażowane. Zakresy charakterystyczne dla reszt aminokwasowych białek zostały szczegółowo omówione w literaturze [20].

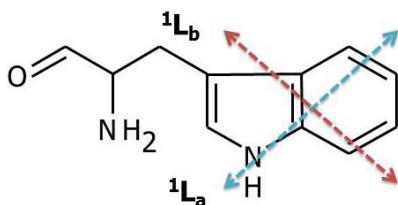
2. SPEKTROSKOPIA FLUORESCENCYJNA

Badania nad strukturą i dynamiką układów białkowo-lipidowych można także przeprowadzić stosując metodę spektroskopii fluorescencyjnej, która dostarcza informacji o lokalnym otoczeniu fluoroforów. Fluorofory to cząsteczki lub grupy atomów, które po wzbudzeniu fluoryzują, czyli emitują promieniowanie z najniższego oscylacyjnego poziomu pierwszego elektronowego stanu wzbudzonego. Fluorofory można podzielić na dwie grupy. Pierwsza z nich obejmuje tzw. fluorofory wewnętrzne, czyli takie, które występują naturalnie w badanej cząsteczce, np.: aromatyczne reszty aminokwasowe białek. Natomiast, drugą grupę stanowią fluorofory zewnętrzne, które są stosowane w badaniach próbek niefluoryzujących takich jak błony lipidowe [23].

2.1. WEWNĘTRZNA FLUORESCENCJA BIAŁEK

Peptydy i białka wykazują wewnętrzną (inherentną) fluorescencję, która pochodzi od trzech aromatycznych reszt aminokwasowych: tryptofanu, tyrozyny i fenyloalaniny. Dominujący wkład w emisję białka pochodzi od tryptofanu, którego współczynnik absorpcji ma największą wartość z pośród wymienionych wyżej aminokwasów. Dodatkowo, energia zaabsorbowana przez tyrozynę i fenyloalaninę jest często przenoszona do tryptofanu. Aminokwas ten charakteryzuje się także najdłuższą linią wzbudzenia, co pozwala na jego selektywne wzbudzenie długością fali równą lub większą od 295 nm [23, 24].

Absorpcji promieniowania z zakresu 260–300 nm towarzyszą elektronowe przejścia absorpcyjne pomiędzy orbitalami $\pi\rightarrow\pi^*$ w obrębie pierścienia indolowego tryptofanu oznaczane symbolami ${}^1\text{L}_a$ i ${}^1\text{L}_b$ [23, 25, 26] zgodnie z nomenklaturą zaproponowaną przez Platt'a [27]. Ich wektory są zorientowane prostopadle wzgledem siebie jak przedstawia Rysunek 7.



Rysunek 7. Struktura tryptofanu wraz z elektronowym przejściem absorpcyjnym pierścienia indolowego
Figure 7. The structure of tryptophan with electron transition absorption of the indole ring

Widmo emisji tryptofanu jest bardzo wrażliwe na tworzenie wiązań wodorowych do grupy iminowej. W rozpuszczalnikach niepolarnych, np. w cykloheksanie, pasmo emisji tryptofanu jest niemal odbiciem lustrzanym pasma absorpcji przejścia 1L_b . W przypadku rozpuszczalników polarnych, np. etanolu, pasmo emisji wykazuje cechy pasma absorpcyjnego przejścia 1L_a . Powodem tego efektu, jest fakt, że duży wpływ na przejście 1L_a ma polarność rozpuszczalnika, które obniża poziom jego stanu energetycznego. W cykloheksanie, dominuje przejście 1L_b , ponieważ jego stan ma niższą energię w porównaniu z 1L_a [23, 25, 28].

Podobna zależność między emisją Trp a polarnością jego otoczenia ma miejsce w przypadku wodnych roztworów białek. Gdy łańcuch boczny tryptofanu jest zamknięty wewnętrz cząsteczki w tzn. hydrofobowym pudle, utworzonym przez apolarne reszty aminokwasowe, położenie i struktura jego pasma emisyjnego jest zdominowana przez wkład od przejścia 1L_b . Wraz ze wzrostem polarności otoczenia Trp, np. w wyniku ekspozycji na cząsteczki wody lub polarne łańcuchy boczne, pasmo emisji Trp przesuwa się w kierunku dłuższych fal (ang. *red-shift effect*). Należy jednak podkreślić, że w przypadku białek wielo-trypotfanowych obserwowana fluorescencja obrazuje uśrednione warunki otoczenia wszystkich reszt tryptofanowych [23, 26, 29].

Burstein i współpracownicy przedstawili model stanów dyskretnych Trp wraz z pięcioma najbardziej prawdopodobnymi formami spektralnymi [23, 26, 29, 30]:

- Klasa A ($\lambda_{\max} = 308 \text{ nm}$) odpowiada fluoroforowi w izolowanym hydrofobowym wnętrzu cząsteczki białka, bez możliwości tworzenia wiązań wodorowych.
- Klasa S ($\lambda_{\max} = 316 \text{ nm}$) obejmuje reszty Trp w apolarnym wnętrzu białka, które tworzą eksipleksy w stochiometrii 1:1.
- Klasa I ($\lambda_{\max} = 330\text{--}332 \text{ nm}$) reprezentuje reszty Trp w apolarnym wnętrzu białka, zdolne do formowania eksipleksów w stochiometrii 2:1.
- Klasa II ($\lambda_{\max} = 340\text{--}342 \text{ nm}$) obejmują reszty Trp częściowo wyeksponowane w kierunku polarnego rozpuszczalnika lub innych polarnych reszt aminokwasowych.
- Klasa III ($\lambda_{\max} = 350\text{--}353 \text{ nm}$) zawiera całkowicie wyeksponowane reszty Trp, otoczone przez wysoce mobilne cząsteczki wody generujące efekt relaksacji rozpuszczalnikowej, co skutkuje przesunięciem maksimum emisji w kierunku dłuższych fal.

Intensywność fluorescencji tryptofanu, podobnie jak położenie jego maksimum, jest równie często monitorowane w badaniach nad zmianami strukturalnymi białek wywołanych, np. zmianą pH czy oddziaływaniem z błoną lipidową. Trp ukryty we wnętrzu natywnej cząsteczki białka może znajdować się w kontakcie z restami aminokwasowymi, które powodują gaszenie statyczne jego fluorescencji [31]. Chen i współpracownicy [32] sklasyfikowali reszty aminokwasowe w dwie grupy według mechanizmu bezpromienistej dezaktywacji stanu wzbudzonego. Najbardziej powszechnym procesem jest przeniesie elektronu w stanie wzbudzonym (ang. *excited-state electron transfer*) katalizowane przez grupy: amidową resztę glutaminowych i asparaginowych, karboksylową resztę kwasów glutaminowego i asparaginowego, tiolową cysteiny i imidazolową histydynę. W tej klasie gaszenie może wystąpić nawet przy odległości powyżej 10 Å. Drugim mechanizmem bezpromienistym dezaktywacji stanu wzbudzonego jest przeniesienie protonu (ang. *excited-state proton transfer*). W ten proces zaangażowane są grupy $-NH_2$ i $-OH$ reszt lisyny i tyrozyny, które znajdują się w odległości nie większej niż 8 Å od pierścienia indolowego [33, 34].

Ponadto, gaszenie może następować pomiędzy restami tryptofanów oddalonych nawet o 16 Å przez wzajemne fluorescencyjne rezonansowe przeniesienie energii oznaczane jako homo FRET (ang. *homo-fluorescence resonance energy transfer*) [23, 31, 5]. Co więcej, osłabienie fluorescencji może następować poprzez oddziaływanie $NH \cdots \pi$ ilekroć reszty fenyloalaniny lub tyrozyny znajdują się w odległości mniejszej niż 7 Å od łańcucha bocznego tryptofanu [36, 37].

2.2. Efekt czerwonego przesunięcia fali wzbudzenia

Efekt czerwonego przesunięcia fal wzbudzenia (ang. *red edge excitation shift*, REES) obserwowany jest głównie w przypadku aromatycznych fluoroforów w polarnych roztworach o dużej lepkości lub w skondensowanych fazach. Polega on na przesunięciu maksimum fluorescencji w kierunku dłuższy fal na skutek wzrostu długości linii wzbudzenia [37, 38], co jest przykładem odstępstwa od reguły Kashy [23, 39]. U podstaw efektu REES leży zmiana oddziaływania fluorofor rozpuszczalnik w podstawowym i wzbudzonym stanie, która wymusza reorientację cząsteczek rozpuszczalnika wokół wzbudzonego fluorofora [23, 37–39].

Tory oraz Merrill [38] wyjaśnili efekt czerwonego przesunięcia na podstawie dwustanowego modelu relaksacji rozpuszczalnikowej. Wzbudzenie układu w maksymum absorpcji powoduje przejście fluoroforu do stanu wzbudzonego F. Jeśli w trakcie jego trwania nie nastąpi reorientacja cząsteczek rozpuszczalnika w otoczeniu fluoroforu, emisja zachodzi ze stanu wzbudzonego F. Natomiast, jeśli dojdzie do reorientacji wówczas energia stanu wzbudzonego F może ulec obniżeniu do stanu wzbudzonego R. Czas tej relaksacji jest zdeterminowany przez naturę oddziaływań fluorofor rozpuszczalnik oraz przez szybkość z jaką to oddziaływanie jest modyfikowane przez moment dipolowy nowego stanu wzbudzenia.

W wyniku wzbudzenia układu do stanu F i R odpowiednio promieniowaniem o długościach fali λ_1 i λ_2 przy relacji $\lambda_2 >> \lambda_1$, emisja może nastąpić według trzech mechanizmów w zależności od właściwości rozpuszczalnika. W przypadku, gdy fluorofor znajduje się w otoczeniu cząsteczek rozpuszczalnika o niskiej lepkości lub w podwyższonej temperaturze, czas życia stanu wzbudzonego F jest znacznie dłuższy od czasu reorientacji cząsteczek rozpuszczalnika. W tej sytuacji, cząsteczki rozpuszczalnika ulegają przeorganizowaniu zanim nastąpi fluorescencja, a obserwowana emisja nie zależy od długości fali wzbudzenia. W konsekwencji, pasma emisji ze stanu F jak również ze stanu R leżą przy tej samej długości fali λ_2 .

W warunkach pośredniej lepkości rozpuszczalnika lub temperatury, czas życia stanu wzbudzonego jest porównywalny z szybkością relaksacji rozpuszczalnika. W tych okolicznościach, wzbudzenie promieniowaniem o wyższej energii prowadzi do fluorescencji zarówno ze stanu F jak i ze stanu R, co skutkuje wyraźnie poszerzonym pasmem z maksimum pomiędzy λ_1 a λ_2 .

Gdy fluorofor znajduje się w rozpuszczalnikach o dużej lepkości lub w niskich temperaturach, szybkość fizycznej reorientacji dipoli rozpuszczalnika drastycznie maleje i jest znacznie dłuższa od czasu życia stanu wzbudzonego F. W tym przypadku, po wzbudzeniu układu promieniowaniem o długości λ_1 nie następuje relaksacja do stanu R i fluorescencja następuje z wyżej energetycznego stanu F. Z tej przyczyny, pasmo emisji przesuwa się w kierunku krótszych fal (ang. *blue-shift*). Natomiast, naświetlenie układu promieniowaniem o niższej energii (Ex(R)) powoduje fotoselektywne wzbudzenie tylko tej części populacji fluoroforów, w sąsiedztwie których orientacja dipoli rozpuszczalnika obniża różnicę energetyczną między stanem podstawowym i wzbudzonym. W związku z tym, ich pasma absorpcji i emisji są przesunięte w stronę dłuższych fal i obserwujemy efekt REES.

Sledzenie efektu czerwonego przesunięcia fali wzbudzenia daje możliwość monitorowania lokalnego środowiska i dynamiki fluoroforu [31]. Dostarcza informacji o względnej dynamice relaksacji cząsteczek rozpuszczalnika np. wody, która jest „optycznie cicha” w tej technice pomiarowej. Jest to szczególnie istotne w badaniach nad układami biologicznymi, gdzie hydratacja odgrywa kluczową rolę w wielu procesach biologicznych w tym fałdowaniu białek i ich oddziaływaniu z błoną lipidową [31, 39, 40].

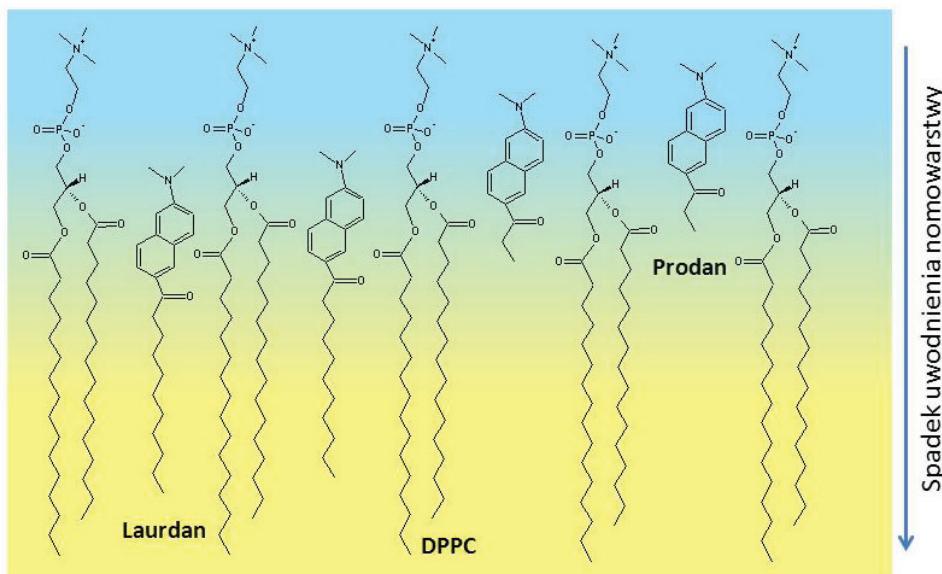
2.3. SONDY FLUORESCENCYJNE JAKO MARKERY BŁON LIPIDOWYCH

Lipidy w przeciwieństwie do białek, nie wykazują inherentnej fluorescencji [23]. Dlatego zastosowanie spektroskopii fluorescencyjnej w badaniach błon lipidowych wymaga użycia fluoroforów zewnętrznych [41], które dają możliwość monitorowania mikroskopowej lepkości, polarności, stopnia hydratacji jak również uporządkowania cząsteczkowego, relaksacji rozpuszczalnikowej i potencjału elektrostatycznego miejsca, gdzie znacznik jest ulokowany [42].

Aby fluorofor mógł pełnić rolę sondy fluorescencyjnej, jego emisja powinna cechować się wysoką wydajnością kwantową, która zapewni widmo „dobrzej jakości” przy niskim stężeniu sondy. Musi także wykazywać się wysoką „czułością”, co oznacza, że zmiana właściwości spektralnych znacznika koreluje z przemianami zachodzącymi w jego otoczeniu poprzez zmiany intensywności, położenia maksimum fluorescencji czy wartości anizotropii wzbudzenia. Ponadto, ich struktura powinna zapewnić specyficzne rozmieszczenie w danym rejonie błony [42, 43].

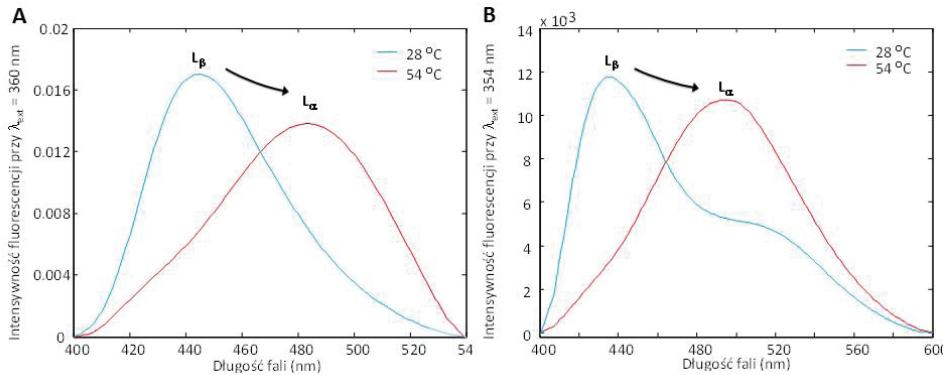
Najbardziej powszechnymi sondami stosowanymi w badaniach błon lipidowych są dwie pochodne naftalu: Laurdan (6 dodekanoylo 2 dimetyloaminonaftalen) i Prodan (6 propionyl 2 dimetyloaminonaftalen), których fluorescencja jest niezwykle czuła na zmianę polarności otoczenia (Rysunek 8) [44, 45]. Fluoryzującym elementem tych sond jest pierścień naftalu, który posiada moment dipolowy postawy w wyniku częściowej separacji ładunku pomiędzy grupą 2 dimetyloaminową a 6 karbonylową, zachodzącej m.in. w satnie wzbudzonym w polarnym otoczeniu. Podczas wzbudzenia wzrasta moment dipolowy, który może powodować reorientację dipoli polarnych cząsteczek rozpuszczalnika. Energia wymagana na przeorganizowanie rozpuszczalnika obniża stan wzbudzenia znacznika, co jest widoczne na widmie jako przesunięcie maksimum emisji w kierunku dłuższych fal. Natomiast w przeciwnym przypadku, gdy sonda znajduje się w rozpuszczalniku apolarnym, maksimum fluorescencji jest przy falach krótszych [43–45].

W błonie lipidowej położenie maksimum emisji Laurdanu i Prodanu silnie zależy od stopnia uwodnienia dwuwarstwy, która ulega zmianie, np. podczas głównego przejścia fazowego [45] (Rys. 9). W fazie żelowej, błona lipidowa jest zhydrowana w małym stopniu i relaksacja rozpuszczalnikowa nie zachodzi. Maksimum pasma emisji omawianych sond w dwuwarstwie lipidowej w fazie L_β występuje przy ~440 nm. Wzrost temperatury powoduje rozluźnienie dwuwarstwy, co ułatwia penetrację cząsteczek wody w region występowania sondy fluorescencyjnej. Dochodzi wówczas do przekazania energii stanu wzbudzonego na reorientację dipoli wody wokół fluoroforu i pasmo jego emisji ulega przesunięciu w kierunku dłuższych fal [43–45]. Do ilościowej charakterystyki przesunięcia emisji sondy fluorescencyjnej stosowany jest parametr zwany „generalną polaryzacją” [46].



Rysunek 8. Specyficzne rozlokowanie cząsteczek Laurdanu i Prodanu w uwodnionej monowarstwie lipidowej
Figure 8. Specific deployment of Laurdan and Prodan molecules in a hydrated lipid monolayer

Pomimo opisanych powyżej podobieństw, Laurdan i Prodan różnią się pod względem miejsca rozmieszczenia w błonie lipidowej. Laurdan dzięki dwunastowęglowemu łańcuchowi alifatycznemu wbudowuje się w apolarne wnętrze dwuwarstwy, a jego grupa fluoryzująca znajduje się wówczas na poziomie grup estrowych lipidów. Natomiast, krótki propylowy łańcuch Prodanu uniemożliwia zakotwiczenie sondy w części hydrofobowej, i część cząsteczek Prodanu pozostaje w wodzie. Ich pasmo emisyjne leży w pobliżu 520 nm. Dodatkowo, w porównaniu z Laurdanem, Prodan jest ulokowany bliżej grup fosforanowych lipidów w bardziej polarnym otoczeniu. Dzięki temu jest zdolny do wykrycia subtelniejszych zmian uwodnienia części hydrofilowej błony spowodowanych np. przedprzejściem lub zmianą polarności wywołanej inkorporacją białka w dwuwarstwę lipidową [43, 45].



Rysunek 9. Widma emisjne Laurdanu (A) i Prodanu (B) wbudowanego w dwuwarstwy liposomów DPPC w fazie żelowej (kolor niebieski) i ciekłokrystalicznej (kolor czerwony)

Figure 9. Emission spectra of Laurdan (A) and Prodan (B) incorporated into a bilayer wall of DPPC liposomes in the gel phase (blue color) and the liquid-crystal phase (red color)

2.4. ANIZOTROPIA FLUORESCENCJI

Anizotropia fluorescencji pozwala śledzić zmiany uporządkowania i sztywności lokalnego otoczenia fluoroforu spowodowanych procesem denaturacji, przejściem fazowym lub asocjacją [23, 47, 48]. W wyniku wzbudzenia światłem spolaryzowanym, w wielu przypadkach emisja jest także spolaryzowana, a jej stopień jest określany przez anizotropię (RFL). Źródłem anizotropii jest wystąpienie absorpcyjnego i emisyjnego momentu przejścia wzdłuż określonych kierunków w strukturze fluoroforu. Pomiar anizotropii opiera się na fotoselektywnym wzbudzeniu fluoroforów wywołanym naświetlaniem spolaryzowaną wiązką. W roztworach jednorodnych fluorofory w stanie podstawowym są losowo zorientowane. Jeśli na taki układ pada światło spolaryzowane, wzbudzane będą preferencyjnie te fluorofory, których wektor momentu przejścia jest równoległy do wektora elektrycznego promieniowania wzbudzającego. Relaksacja promienista może odbywać się poprzez emisję światła spolaryzowanego wzdłuż określonej osi cząsteczki fluoroforu [23].

Pomiar RFL wymaga użycia dwóch polaryzatorów: wzbudzenia i emisji umiejscowionych odpowiednio przed i za próbką. Wartość anizotropii fluorescencji wyznacza się stosując następujący wzór [23, 47, 48]:

$$R = \frac{I_v - I_h}{I_v + 2I_h}$$

gdzie, I_v to intensywność fluorescencji mierzona z polaryzatorem wzbudzenia i emisji zorientowanymi wertykalnie, I_h – intensywność fluorescencji zarejestrowana z użyciem polaryzatora wzbudzenia skierowanego wertykalnie, a emisji horyzontalnie.

Najczęściej występującym zjawiskiem, który obniża zmierzona wartość RFL jest dyfuzja rotacyjna. Polega na zmianie orientacji wektora momentu przejścia emisji podczas trwania stanu wzbudzonego. Rotacja dyfuzyjna jest uwarunkowana sztywnością otoczenia wzbudzonego fluoroforu. Jeśli znajduje się on w środowisku ograniczającym ruchliwość, wówczas emisja jest także spolaryzowana równolegle do kierunku wektora elektrycznego promieniowania padającego. Natomiast, gdy fluorofor ma dużą swobodę rotacji i może przeorientować się wielokrotnie podczas stanu wzbudzonego, to kierunek światła emitowanego będzie zrandomizowany, a anizotropia fluorescencji bliska零 [23]. Zatem, wartość RFL odzwierciedla względne przemieszczenie się fluoroforu w czasie trwania stanu wzbudzonego.

Z powodu przedstawionej zależności między anizotropią fluorescencji a dyfuzją rotacyjną wzbudzonego fluoroforu, spektroskopia fluorescencyjna jest techniką chętnie stosowaną w charakterystyce przemian zachodzących w układach biologicznych. Pomiar widma anizotropii oraz emisji fluorescencji pozwala uzyskać koherencyjny opis lokalnych zmian w wzbudzanym układzie [48].

UWAGI KOŃCOWE

Pomiar widm FTIR-ATR pozwalały na śledzenie zmian strukturalnych zachodzących na trzech poziomach molekularnych błon lipidowych, tj. w rejonie występowania polarnych grup lipidowych, w hydrofobowym wnętrzu błony utworzonym przez apolarne łańcuchy węglowodorowe cząsteczek lipidowych, oraz pomiędzy obszarem hydrofilowym i hydrofobowym reprezentowanym przez lipidowe grupy estrowe. Z kolei, widma fluorescencyjne są źródłem informacji o uwodnieniu, sztywności i upakowaniu cząsteczek budujących systemy błon lipidowych. Badanie struktur drugorzędowych cząsteczek białek i peptydów jest domeną spektroskopii FTIR. W zdobywaniu informacji o agregacji i foldingu białek i peptydów kluczową rolę pełni również spektroskopia fluorescencyjna. Na podstawie analizy wyników z obu metod pomiarowych, uzyskuje się komplementarny i spójny obraz zmian strukturalnych na poziomie molekularnym białka, modelowej błony lipidowej i mieszanych układów białkowo-lipidowych.

PODZIĘKOWANIE

Autorzy pracy pragną podziękować Narodowemu Centrum Nauki za wsparcie finansowe otrzymane w ramach dwóch grantów OPUS o numerach 2015/17/B/ST4/03717 i 2012/05/B/ST4/02029.

PIŚMIENIICTWO CYTOWANE

- [1] H. Fabian, C.P. Schultz, *Fourier transform infrared spectroscopy of peptide and protein analysis* [w:] *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, R.A. Meyers (Red.), John Wiley & Sons, Inc, 2001.
- [2] L.K. Tamm, S.A. Tatulian, Q. Rev. Biophys., 1997, **30**, 365.
- [3] K.A. Oberg, A.L. Fink, Anal. Biochem., 1998, **256**, 92.
- [4] J.L.R. Arrondo, F.M. Goñi, Chem Phys Lipids, 1998, **96**, 53.
- [5] E. Goormaghtigh, V. Raussens, J.-M. Ruysschaert, Biochim Biophys Acta, 1999, **1422**, 105.
- [6] H.L. Casal, H.H. Mantsch, Biochim. Biophys. Acta, 1984, **779**, 381.
- [7] X. Bin, I. Zawisza, J.D. Goddard, J. Lipkowski, Langmuir, 2005, **21**, 330.
- [8] R.N.A.H. Lewis, R.N. McElhaney, Biochim. Biophys. Acta, 2013, **1828**, 2347.
- [9] T. Le Bihan, M. Pézolet, Chem. Phys. Lipids, 1998, **94**, 13.
- [10] P. Garidel, A. Blume, W. Hübner, Biochim. Biophys. Acta, 2000, **1466**, 245.
- [11] W. Hübner, H.H. Mantsch, Biophys. J., 1991, **59**, 1261.
- [12] J. Grdadolnik, J. Kidrič, D. Hadži, Chem. Phys. Lipids, 1991, **59**, 57.
- [13] A. Blume, W. Hübner, G. Messner, Biochemistry, 1988, **27**, 8239.
- [14] R.N.A.H. Lewis, R.N. McElhaney, W. Pohle, H.H. Mantsch, Biophys. J., 1994, **67**, 2367.
- [15] H. Binder, App. Spectrosc. Rev., 2003, **38**, 15.
- [16] H. Binder, A. Anikin, G. Lantzsch, G. Klose, J. Phys. Chem. B, 1999, **103**, 461.
- [17] D.C. Lee, D. Chapman, Bioscience Reports, 1986, **6**, 235.
- [18] J. Grdadolnik, D. Hadži, Chem. Phys. Lipids, 1993, **65**, 121.
- [19] A. Barth, Ch. Zscherp, Q. Rev. Biophys., 2002, **35**, 369.
- [20] A. Barth, Progr. Biophys. Mol. Biol., 2000, **74**, 141.
- [21] H.H.J. de Jongh, E. Goormaghtigh, J.-M. Ruysschaert, Anal. Biochem., 1996, **242**, 95.
- [22] A. Adochitei, G. Drochioiu, Rev. Roum. Chim., 2011, **56**, 783.
- [23] J.R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer, 2006.
- [24] C.A. Royer, Chem. Rev., 2006, **106**, 1769.
- [25] D.W. Pierce, S.G Boxer, Biophys. J., 1995, **68**, 1583.
- [26] A.S. Ladokhin, *Fluorescence Spectroscopy in Peptide and Protein Analysis* [w:] *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, R.A. Meyers (Red.), John Wiley & Sons, Inc, 2006.
- [27] B. Valeur, G. Weber, Photochem. Photobiol., 1977, **25**, 441.
- [28] P.R. Callis, B.K. Burgess, J. Phys. Chem. B, 1997, **101**, 9429.
- [29] C. Shen, R. Menon, D. Das, N. Bansal, N. Nahar, N. Guduru, S. Jaegle, J. Peckham, Y.K. Reshetnyak, Proteins, 2008, **71**, 1744.
- [30] Y.K. Reshetnyak, Y. Koshernik, E.A. Burstein, Biophys. J., 2001, **81**, 1735.
- [31] D.A. Kelkar, A. Chaudhuri, S. Haldar, A. Chattopadhyay, Eur. Biophys. J., 2010, **39**, 1453.
- [32] Y. Chen, M.D. Barkley, Biochemistry, 1998, **37**, 9976.
- [33] A. Chaudhuri, S. Halder, A. Chattopadhyay, Biochem. Biophys. Res. Comm., 2010, **394**, 1082.
- [34] P.S. Antonini, W. Hillen, N. Ettner, W. Hinrichs, P. Fantucci, S.M. Doglia, J.-A. Bousquet, M. Chabbert, Biophys. J., 1997, **72**, 1800.
- [35] A. Squire, P.J. Verveer, O. Rocks, P. I.H. Bastiaens, J. Struct. Biol., 2004, **147**, 62.
- [36] V. Nanda, L. Brand, Proteins, 2000, **40**, 112.
- [37] S.K. Burley, G.A. Petsko, Science, 1985, **229**, 23.
- [38] M.C. Tory, A.R. Merrill, Biochim. Biophys. Acta, 2002, **1564**, 435.
- [39] H. Raghuraman, D.A. Kelkar, A. Chattopadhyay, *Novel insights into protein structure and dynamics utilizing the red edge excitation shift approach* [w:] *Reviews in Fluorescence*, Ch.D. Geddes, J.R. Lakowicz (Red.), Springer 2005.
- [40] A. Chattopadhyay, Chem. Phys. Lipids, 2003, **122**, 3.

- [41] O. Maier, V. Oberle, D. Hoekstra, *Chem. Phys. Lipids*, 2002, **116**, 3.
- [42] A.P. Demchenko, Y. Mély, G. Duportail, A.S. Klymchenko, *Biophys. J.*, 2009, **96**, 3461.
- [43] K.A. Kozyra, J.R. Heldt, G. Gondek, P. Kwiek, J. Heldt, *Z. Naturforsch.*, 2004, **59a**, 809.
- [44] E.K. Krasnowska, E. Gratton, T. Parasassi, *Biophys. J.*, 1998, **74**, 1984.
- [45] T. Parasassi, E.K. Krasnowska, L. Bagatolli, E. Gratton, *J. Fluor.*, 1998, **8**, 365.
- [46] T. Parasassi, G. De Stasio, A. d'Ubaldo, E. Gratton, *Biophys. J.*, 1990, **57**, 1179.
- [47] F. Yang Jr., M. Zhang, J. Chen, Y. Liang, *Biochim. Biophys. Acta*, 2006, **1764**, 1389.
- [48] D. Canet, K. Doering, C.M. Dobson, Y. Dupont, *Biophys. J.*, 2001, **80**, 1996.
- [49] L. Stryer, *Biochemia*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2003.

Praca wpłynęła do Redakcji 7 lutego 2017

NOWE WYDAWNICTWA



Praca zbiorowa pod redakcją Kamili Żelechowskiej, *Nanotechnologia w praktyce*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2016, wyd. pierwsze, oprawa miękka s. 265.

W roku 2016 ukazała się nakładem Wydawnictwa naukowego PWN książka pt. „Nanotechnologia w praktyce” pod redakcją Kamili Żelechowskiej. Książka, jak to napisano w notce na okładce, może być przydatna w przygotowaniu ćwiczeń dla studentów oraz, moim zdaniem w przypadku przynajmniej niektórych ćwiczeń, dla uczniów szkół średnich. Wiele z tych opisów jest stosunkowo prostych. Podają one na przykład sposób otrzymywania grafenu w różnych formach chemicznych, nanocząstek metali i tlenków metali, a także tzw. kropek kwantowych i struktur supramolekularnych. Mimo to wydaje się, że zaproponowany tytuł jest trochę nieadekwatny, właściwie lepszy byłby „Właściwości fizykochemiczne nanocząstek”. Nanomateriały opisane w książce „Nanotechnologia w praktyce” są przecież bez wątpienia otrzymywane w skali makroskopowej. Również ich właściwości fizykochemiczne określane są na poziomie makroskopowym, za wyjątkiem może mikrofotografii z mikroskopu elektronowego SEM (Scanning Electron Microscope). Opisane są takie właściwości makroskopowe nanocząstek, jak przewodnictwo elektryczne, spektroskopie UV-Vis, podczerwień i Raman oraz na poziomie poniżej 1 µm – mikrofotografie otrzymywane za pomocą mikroskopu optycznego.

Książka „Nanotechnologia w praktyce” składa się z 12 rozdziałów: 1. Tlenek grafenu i redukowany tlenek grafenu, 2. Nanocząstki metaliczne. Otrzymywanie i właściwości, 3. Otrzymywanie nanokrzemionki (SiO_2) metodą zol-żel, 4. Kropki kwantowe. Synteza i właściwości optyczne nanokryształów półprzewodnikowych, 5. Fotokatalityczne właściwości TiO_2 , 6. Zachwycające nanostruktury ZnO , 7. Otrzymywanie i właściwości nanocząstek magnetycznych, 8. Nanorurki węglowe, 9. Chemia powierzchni, 10. Struktury supramolekularne, 11. Otrzymywanie nanostruktur na drodze samoorganizacji, 12. Związki funkcyjonalne; dendrymetry, rotaksany, hydrozele (kapsuły molekularne).

Treści zawarte w książce są na różnym poziomie ogólności. Szczegółowo opisane są proste metody otrzymywania materiałów, co rzeczywiście może być przydatne w przygotowaniu ćwiczeń na pracowni studenckiej. Pytanie tylko, na jakim poziomie kształcenia – podstawowym czy specjalizacyjnym – student miałby wykonywać te eksperymenty. Rozpatrując treść podręcznika z tego punktu widzenia należy zauważyc, że materiał w nim prezentowany jest nadmiernie szeroki. Na wydziałach chemii uniwersytetów wykłada się przecież osobno chemię organiczną, nieorganiczną i fizyczną. Tutaj mamy zagadnienia odpowiadające wszystkim tym trzem dziedzinom. Skutkuje to bardzo powierzchownym i skrótnym potraktowaniem niektórych tematów, inne zagadnienia z kolei potraktowane są bardzo szczegółowo. Bardzo powierzchownie na przykład potraktowano opis modelu pasmowego dla monokryształów półprzewod-

nikowych oraz nie wspomniano o wytwarzaniu kropek kwantowych metodami epitaksji i elektronolitografii. Bardziej szczegółowo potraktowano struktury samoorganizujące się.

Przedstawione charakterystyki fizykochemiczne, oprócz prostych przyrządów, takich jak kieszonkowy multimetru, wymagają także użycia zaawansowanego sprzętu, np. spektrometrów UV-Vis, FT-IR, Ramana czy mikroskopów optycznych i mikroskopu elektronowego. Istotną zaletą książki jest przedstawienie szczegółowych opisów eksperymentów, które, jak wszystko na to wskazuje, zostały przerobione przez Autorów. Daje to gwarancje wykonalności prezentowanych prostych ćwiczeń laboratoryjnych. Choć charakterystyki dotyczą w dużej części fazy ciekłej lub mieszanin w fazie stałej, można również znaleźć fragmenty dotyczące fazy krystalicznej czystych związków.

W ostatnim czasie znaczenie słowa nanotechnologia uległo znacznemu poszerzeniu. Wcześniej nanotechnologia wiązana była ze znacznym zmniejszeniem wymiarów przyrządów półprzewodnikowych wytwarzanych w technologii układów scalonych wielkie skali integracji – VLSI (ang. *Very Large Scale of Integration*). Chodzi głównie o tranzystory MOSFET – tranzystory polowe wykonywane w technologii metal-tlenek-półprzewodnik, które mają obecnie wymiary bramek poniżej 50 nm. Zatem pierwotne znaczenie słowa nanotechnologia dotyczyło technologii elektronowej, gdzie wytwarza się w sposób zamierzony i kontrolowany przyrządy elektroniczne, głównie tranzystory, które później działają, np. w procesorach czy pamięciach komputerowych. Należy tu też wspomnieć o tzw. dyskach twardych, których współczesne komórki mają wymiary nanometryczne. Z drugiej strony obecnie uważa się, że wszystkie materiały składające się przynajmniej w połowie z częstek o wymiarach poniżej 100 nm są wytwarzane w procesach nanotechnologicznych. Książka ma tę zaletę, że wymienia większość materiałów wytwarzanych w Polsce w ramach tzw. nanotechnologii. Przydałoby się jednak trochę więcej informacji o osiągnięciach światowych w tej dziedzinie. Tak rozumiałabym poziom akademicki tej książki. Brakuje mi opisów otrzymywania cienkich warstw, tak powszechnych w nanotechnologii czy metod otrzymywania kontaktów elektrycznych, będących jednymi z podstawowych etapów w technologii nanometrycznej układów elektronicznych. Szkoda, że nie wyjaśniono dokładnie wymagań stawianych materiałom, zwłaszcza tych dotyczących ich zastosowania w nanoelektronice. Usprawiedliwieniem może być fakt, że w Polsce praktycznie nie ma przemysłu związanego z nanoelektroniką, oprócz może kilku laboratoriów badawczych.

Na koniec należy podkreślić, że książka jest bardzo ładnie wydana, zawiera wiele wykresów, rysunków, zdjęć i tabel. W mojej ocenie może stanowić całkiem niezły podręcznik dla studentów wydziałów chemicznych politechnik, w tym takich kierunków kształcenia, jak technologia chemiczna czy inżynieria materiałowa.

*Grażyna Bator
Wydział Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego*

INFORMACJE

PATRONAT MEDIALNY

„Wiadomości Chemiczne” objęły patronatem medialnym ostatnie publikacje książkowe Wydawnictwa Naukowego PWN SA, które mogą być niezwykle interesujące i przydatne dla społeczności polskich chemików:

Wiktor Kubiński

„Wybrane metody badania materiałów. Badanie metali i stopów.”

Praca zbiorowa pod redakcją Kamilli Małek

„Spektroskopia oscylacyjna. Od teorii do praktyki.”

Zdzisław Migaszewski, Agnieszka Gałuszka

„Geochemia środowiska”

Robert J. Whitehurst, Marten Van Oort

„Enzymy w technologii spożywczej”

Jan F. Rabek

„Współczesna wiedza o polimerach. Tom 1. Budowa strukturalna polimerów i metody badawcze.”

Jan F. Rabek

„Współczesna wiedza o polimerach. Tom 2. Polimery naturalne i syntetyczne, otrzymywanie i zastosowania.”

Praca zbiorowa pod redakcją Anny Swiderskiej-Środy, Witolda Wojkowskiego,

Małgorzaty Lewandowskiej i Krzysztofa J. Kurzydłowskiego

„Świat nanocząstek”

Praca zbiorowa pod redakcją Kamili Żelechowskiej

„Nanotechnologia w praktyce”

W najbliższych numerach czasopisma ukażą się recenzje wyżej wspomnianych książek.

6 LIAZD NAUKOWY POLSKIEGO TOWARZYSTWA CHEMICZNEGO

17-21 IX 2017
WROCŁAW

w mieście spotkania
C₆₀

www.60PTChem.ch.pwr.edu.pl

UNIWERSYTET
PRZYRODNICZY
WE WROCŁAWIU

UNIWERSYTET
IM. PAŠTÓW ŚLĄSKICH WE WROCŁAWIU

Uniwersytet
Wrocławski

Politechnika Wrocławska

III Konferencja Naukowa Doktorantów i Młodych Naukowców

MŁODZI DLA TECHNIKI 2017

Płock, 7-8 września 2017 roku

KONFERENCJA NAUKOWA MŁODZI DLA TECHNIKI 2017 EDYCJA TRZECIA

Organizator:	Politechnika Warszawska Wydział Budownictwa, Mechaniki i Petrochemii w Płocku
Data:	7–8 września 2017.
Miejsce:	Politechnika Warszawska Filia w Płocku ul. Łukasiewicza 17, Płock

Konferencja Młodzi dla Techniki 2017 stanowi integralną część obchodów 50-lecia Filii Politechniki Warszawskiej w Płocku.

Celem Konferencji jest prezentacja dorobku naukowego młodych pracowników nauki, doktorantów i studentów. Konferencja dedykowana jest nie tylko początkującym, ale także doświadczonym młodym badaczom, działającym w szerokim obszarze budownictwa i inżynierii lądowej, inżynierii środowiska, inżynierii mechanicznej i materiałowej, jak również inżynierii chemicznej i petrochemicznej.

Założeniem organizatorów jest stworzenie okazji do wymiany doświadczeń, poglądów, jak również integracji środowiska zainteresowanego współczesnymi problemami techniki.

Tematyka Konferencji Młodzi dla Techniki 2017 obejmuje następujące zagadnienia:

- konstrukcje budowlane i inżynierskie
- technologia i organizacja budowy
- mechanika budowli
- fizyka budowli
- ciepłownictwo, ogrzewnictwo, wentylacja, gazownictwo
- inżynieria wodna i sanitarna
- konwencjonalne i alternatywne źródła energii

- technologia chemiczna i petrochemiczna
- inżynieria mechaniczna i materiałowa
- urządzenia i systemy mechaniczne,
- budowa maszyn,
- ochrona środowiska.

Terminarz konferencji

- 1 grudnia 2016–31 stycznia 2017: rejestracja, przesłanie abstraktu on-line (wyłącznie po rejestracji)
- 10 lutego 2017: akceptacja abstraktów
- 31 marca 2017: ostateczny termin nadsyłania prac
- 05 maja 2017: ostateczna kwalifikacja referatów
- 15 maja 2017: termin uiszczenia opłaty konferencyjnej
- 7–8 września 2017: KONFERENCJA

Przewodnicząca Komitetu Organizacyjnego – dr inż. Anna Krawczyńska-Piechna
Przewodniczący Komitetu Naukowego – prof. nzw. dr hab. inż. Roman Marcinkowski

Kontakt: mdt2017@pw.plock.pl

Więcej informacji na: www.mdt2017.pw.plock.pl



XLVI Ogólnopolska Szkoła Chemii „Potęga pierwiastków”



Jachranka

29.04-03.05.2017r.



INFORMACJE REDAKCJI „WIADOMOŚCI CHEMICZNYCH”

CENY PRENUMERATY NA ROK 2017

Redakcja miesięcznika PTChem „Wiadomości Chemiczne” zawiadamia, że wysokość prenumeraty rocznej „Wiadomości Chemicznych” za 2017 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”
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 2017 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

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 mezoporowe*, red. B. Burczyk, cena 18 zł
Skorygowana nomenklatura rodników, jonów, jonorodników i podobnych indywidualów 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 strzżeń spinowo-spinowych. Teobald Kupka cena 20,00 zł.

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

REGULAMIN I INFORMACJE DLA AUTORÓW PUBLIKUJĄCYCH W CZASOPISMIE „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 stanowi seria, „Biblioteka Wiadomości Chemicznych”, gdzie publikowane są dłuższe artykuły przeglądowe lub monografie poświęcone ważnym i aktualnym problemom współczesnej chemii. Autorzy, którzy chcieliby takie prace napisać, powinni wcześniej skontaktować się z Redakcją, a następnie przesyłać 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”. 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 przesyłający 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 wynierane 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/20110216_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. „ghostwriting” (któro 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, łamania i naruszania zasad etyki obowiązującej w nauce będą ujawniane, włącznie z powiadomieniem jednostek zatrudniających autorów.
- Autorzy mają prawo do zaproponowania co najmniej trzech niezależnych recenzentów, jednak ostatecznego wyboru 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 stronę 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”, 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 zamieszować 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 marginami 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 umieszczenymi 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 tytułem naukowym (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 hasel 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 spisem treści.
- **Tabele, rysunki, fotografie**
Tabele i rysunki powinny być zamieszczone w przesyłanym tekście oraz dodatkowo (po zatwierdzeniu pracy do druku, na etapie przygotowywania szczotki) 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 przesyłać w postaci plików zapisanych w formacie tif, jpg lub podobnym, każdą zapisać w oddzielnym pliku o rozdzielcości 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: iniciały 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: iniciały 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: iniciały 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 przesyłać jeden plik kompletnej pracy zredagowany zgodnie z wymaganiami Redakcji.

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

- 1 plik tekstu zredagowanego 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, przesyłanie 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 szczotki, w przypadku przesyłania prac z kolorowymi stronami prosimy o zaznaczenie stron, które w formie druku mają być kolorowe. Brak tej czynności będzie skutkował **czarno-białym wydrukiem wersji papierowej**. W przypadku zmian w wersji drukowanej kolorowych rysunków na czarno-białe, prosimy o przesyłanie dostosowanych do tego celu rysunków.

Prace prosimy przesyłać 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

70-lecie „Wiadomości Chemicznych”	1
Daria KUPCZYK, Aleksandra KARCZMARSKA-WÓDZKA, Renata STUDZIŃSKA, Joanna SIKORA: Antyoksydacyjne właściwości i przeciwmiażdżycowe działanie paraoksonazy 1	3
Justyna SAMASZKO-FIERTEK, Barbara DMOCHOWSKA, Rafał Ślusarz, Janusz MADAJ: Wybrane antybiotyki nukleozydowe	15
Małgorzata SOBOCIŃSKA, Elżbieta KAMYSZ: Potencjalne zastosowanie enkefalin w diagnostyce i terapii różnych chorób	33
Stanisław RYNG, Izabela JĘŚKOWIAK: Nowoczesne metody pozyskiwania substancji biologicznie aktywnych przy zastosowaniu reakcji wieloskładnikowych ze szczególnym uwzględnieniem reakcji Ugi	45
Karol SIKORA, Justyna SAMASZKO-FIERTEK, Rafał ŚLUSARZ, Beata LIBEREK, Janusz MADAJ, Barbara DMOCHOWSKA: Alditole i anhydroalditole	65
Andrzej GÜNTHER, Jacek A. SOROKA: Główne metody syntezy soli piryliowych	87
Adriana LITWIŃCZUK-MAMMADOVA, Katarzyna CIEŚLIK-BOCZULA, Maria ROSPENK: Badania FTIR-ATR i fluorescencyjne układów białkowo-lipidowych	109
Nowe wydawnictwa	133
Informacje	135

W NASTĘPNYCH ZESZYTACH UKAŻĄ SIĘ:

Agnieszka PIOTROWSKA, Joanna DRZEŻDŻON, Dagmara JACEWICZ, Lech CHMURZYŃSKI: Właściwości antyoksydacyjne, antybakterijne i przeciwrzybicze związków kompleksowych miedzi(II)
Iwona E. GŁOWACKA, Anna ZDZIENICKA: Nukleozydy 8-azapurynowe – synteza i aktywność biologiczna
Monika RETAJCZYK, Agnieszka Wróblewska: Biomasa – źródło cennych związków organicznych
Renata KOŁODZIEJSKA, Agnieszka TAFELSKA-KACZMAREK, Renata STUDZIŃSKA: Atroposelektywna synteza naturalnych chiralnych osiowo związków biarylowych. Część I.
Agata CHABERSKA, Piotr ROSIAK, Zbigniew J. KAMIŃSKI, Beata KOLESIŃSKA: Rusztowania (scaffolds) stosowane w medycynie regeneracyjnej