

WIADOMOŚCI *chemiczne*



2018

(72)

1-2

(847-848)



CZASOPISMO POLSKIEGO TOWARZYSTWA CHEMICZNEGO

Publikacja dotowana ze środków 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 Chemiczne”
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 Chemiczne”, Wrocław 2017
pISSN 0043-5104
eISSN 2300-0295

Maszynopis niniejszego numeru przekazano Wydawcy w lutym 2018

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

BIOKONIUGATY ANTYBIOTYKÓW JONOFOROWYCH – CELE, STRATEGIE SYNTEZY I WŁAŚCIWOŚCI

BIOCONJUGATES OF IONOPHORE ANTIBIOTICS – GOALS, SYNTHESIS STRATEGIES AND PROPERTIES

Michał Antoszczak*, Marta Kordylas, Adam Huczyński

*Pracownia Chemii Bioorganicznej, Wydział Chemii,
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza
ul. Umultowska 89b, 61-614 Poznań
e-mail: michant@amu.edu.pl

Abstract

Wprowadzenie

1. Aktywność biologiczna monenzyny i salinomycyny

1.1. Aktywność przeciwbakteryjna

1.2. Aktywność przeciwnowotworowa

2. Biokoniugaty jonoforów

2.1. Biokoniugaty z aminokwasami serii L

2.2. Biokoniugaty z alkaloidami kory chinowca

2.3. Biokoniugaty z flawonoidami

2.4. Biokoniugaty z nukleozydami

Uwagi końcowe

Podziękowanie

Piśmiennictwo cytowane



Dr Michał Antoszczak – w 2016 roku uzyskał stopień doktora (promotor – dr hab. Adam Huczyński). Od 2017 roku zatrudniony na stanowisku adiunkta na Wydziale Chemii UAM w Poznaniu. Laureat stypendiów naukowych, między innymi stypendium Narodowego Centrum Nauki w programie Etiuda, Prezydenta Miasta Poznania dla młodych badaczy, Fundacji UAM, stypendium im. Jana Kulczyka. Autor 20 publikacji naukowych z zakresu chemii medycznej oraz chemii bioorganicznej, a także 4 rozdziałów w książkach o zasięgu krajowym oraz międzynarodowym.



Marta Kordylas – magistrantka w Pracowni Chemii Bioorganicznej Wydziału Chemii UAM (promotor – dr hab. Adam Huczyński). W ramach pracy magisterskiej zajmuje się syntezą nowego rodzaju biokoniugatów 5-fluorouracylu ze związkami pochodzenia naturalnego.



Dr hab. Adam Huczyński w 2008 roku uzyskał stopień doktora (promotor – prof.dr hab. Bogumił Brzezinski), w 2013 roku habilitował się, od 2016 roku zatrudniony na stanowisku profesora nadzwyczajnego na Wydziale Chemii UAM. Jego zainteresowania naukowe związane są z chemiczną modyfikacją związków pochodzenia naturalnego, badaniami natury wiązań wodorowych i procesu kompleksowania kationów metali. Nagrodzony między innymi nagrodą im. Wiktora Kemuli przyznawaną przez Polskie Towarzystwo Chemiczne za najlepszą pracę habilitacyjną, uzyskał stypendium Ministra Nauki

i Szkolnictwa Wyższego dla wybitnych młodych naukowców, stypendium Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej dla młodych uczonych, stypendium naukowe Miasta Poznania. Autor ponad 100 publikacji z listy JCR.

ABSTRACT

Polyether ionophore antibiotics (ionophores) represent a large group of naturally-occurring lipophilic compounds which are able to form complexes with the metal cations and transport them across the lipid membranes. This process disturbs the intercellular Na^+/K^+ concentration gradient and intracellular pH, and leads to the mitochondrial damages, cell swelling, vacuolization and finally to apoptosis process. For this reason, ionophores are commonly used in veterinary medicine as the non-hormonal growth-promoting as well as coccidiostatic agents.

In this group particularly interesting are monensin and salinomycin (Fig. 1) because of their proved anti-tumour activity, including efficiency against multidrug-resistant cancer cells and cancer stem cells of different origin. Improved synthetic derivatives of both polyether ionophores are thus of considerable current interest. Selective derivatization of these structures whose display multiple reactive functional groups and, in the case of salinomycin, a sensitive tricyclic spiroketal ring system is however non-trivial. Even so, semi-synthetic analogs reported to date includes *i.a.* selective derivatization of the carboxyl group, the three hydroxyl groups, the ketone group, the alkene, and epimerization of the characteristic tricyclic salinomycin unit (for more details see: M. Antoszczak, A. Huczyński, B. Brzezinski, Wiad. Chem., 2017, **71**, 629).

On the other hand, as part of the original program to develop innovative anti-cancer pro-drugs and prompted by the idea that cancer cells may be individually effectively killed by monensin and salinomycin, a very interesting direction of research is bioconjugation of these ionophores. In this context, our review article is focused on the possible role of hybrids of both ionophore antibiotics with other biologically active substances (natural amino acids, *Cinchona* alkaloids, flavonoids, nucleosides) in anti-bacterial and anti-cancer treatment, and gives an overview of their properties.

Keywords: ionophore antibiotics; ionophores; bioconjugation; hybrids; antibacterial activity; anticancer activity

Słowa kluczowe: antybiotyki jonoforowe; jonofory; biokoniugacja; hybrydy; aktywność przeciwbakterialna; aktywność przeciwnowotworowa

WPROWADZENIE

Choroby nowotworowe obejmują dużą grupę schorzeń, które charakteryzują się niekontrolowanym przez mechanizmy fizjologiczne mnożeniem się komórek. Do najbardziej niepożądanych cech chorób nowotworowych należy niewątpliwie zdolność do tworzenia przerzutów do węzłów chłonnych lub odległych narządów, a także naciekanie do okolicznych tkanek. Według danych Światowej Organizacji Zdrowia ponad osiem milionów ludzi umiera każdego roku z powodu tychże chorób. Co więcej, przewiduje się, że liczba osób, u których zdiagnozuje się nowotwór, będzie systematycznie wzrastać [1].

Pomimo że w ostatnich latach onkologowie i naukowcy pokonali wiele trudności w walce z nowotworami, pacjenci ciągle czekają na opracowanie efektywnych metod zwalczania tej grupy chorób. Chemiczna terapia, której działanie opiera się na zahamowaniu podziału i wzrostu komórek nowotworowych, jest skuteczna w zwalczaniu wielu rodzajów nowotworów, jednak nadal pozostaje szerokie spektrum chorób nowotworowych, wobec których metoda ta jest nieskuteczna [2, 3].

Co więcej, pacjenci z chorobą nowotworową mają zwykle upośledzony system odpornościowy i z tego powodu są szczególnie podatni na wszelkiego rodzaju infekcje, między innymi infekcje bakteryjne. Onkologowie, jako druga grupa lekarzy po chirurgach, bardzo często stykają się z opornością na działanie antybiotyków, która występuje u co czwartego pacjenta leczonego za pomocą chemioterapii [7]. W związku z napotykanymi trudnościami w leczeniu nowotworów poszukiwanie nowych i skutecznych leków w zwalczaniu chorób nowotworowych stanowi wciąż wyzwanie dla naukowców.

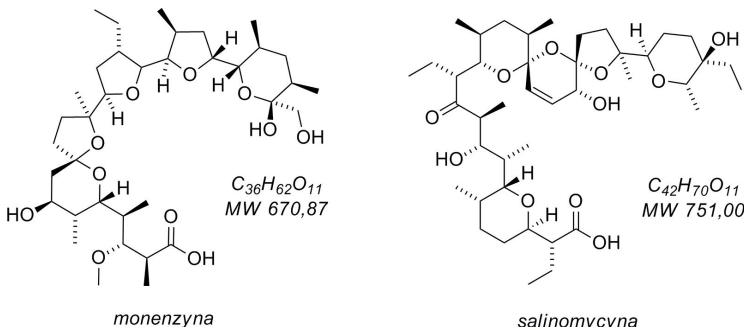
W ostatnich dziesięcioleciach w leczeniu nowotworów stosowano naturalne związki zarówno w niezmodyfikowanej chemicznie postaci, jak i różne ich pochodne uzyskane przez chemiczną modyfikację grup funkcyjnych. Przykładem takich związków są: bleomycyna, daunorubicyna, doktorubicyna, kombretastatyna A-4, winblastyna i winkrystyna, na uwagę zasługują również kamptotecyna i taksol, które stosuje się jako leki działające między innymi przeciwko nowotworom okrężnicy, jajników oraz piersi [4–6].

Historia odkryć nowych leków chemioterapeutycznych jasno pokazuje, że najłatwiejszą drogą do odkrycia nowych środków przeciwnowotworowych jest chemiczna modyfikacja związków pochodzenia naturalnego. W grupie tej szczególnie interesujące są antybiotyki jonoforowe, wśród których na uwagę zasługują zwłaszcza dwa z nich – monenzyna oraz salinomycyna.

1. AKTYWNOŚĆ BIOLOGICZNA MONENZYNY I SALINOMYCYNY

Monenzyna (Rys. 1) została wyizolowana pierwszy raz w 1967 roku ze *Streptomyces cinnamonesis* i była pierwszym związkiem z grupy jonoforów, którego chemiczną strukturę dokładnie opisano i wyjaśniono [8]. Natomiast w 1979 roku po raz pierwszy przeprowadzono syntezę totalną tego związku [9]. Jak dotąd są znane trzy homologi monenzyny, zaś najczęściej spotykaną formą jest monenzyna A.

Drugim z opisywanych związków należących do antybiotyków jonoforowych jest salinomycyna (Rys. 1), która została wyizolowana pierwszy raz ze *Streptomyces albus* w 1974 roku [10]. W 1981 roku opisano pierwszą syntezę totalną [11], którą z powodzeniem rozwijano w kolejnych latach [12]. W 2012 roku zaproponowano ścieżkę biosyntezy salinomycyny [13].



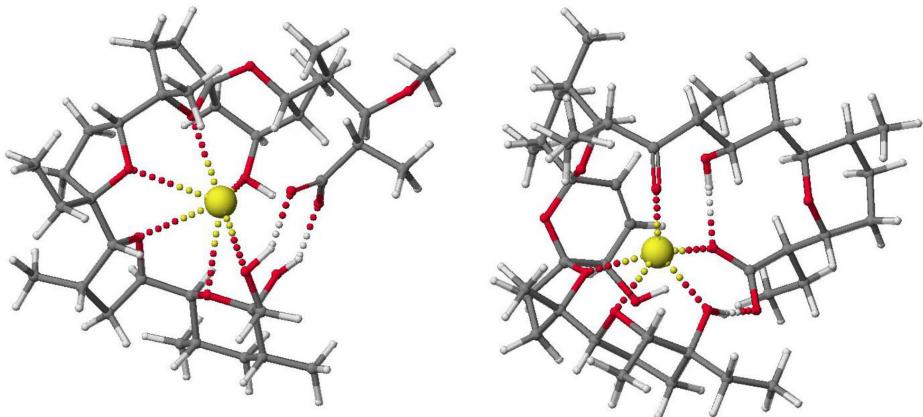
Rysunek 1. Struktura chemiczna monenzyny i salinomycyny
Figure 1. The chemical structure of monensin and salinomycin

Obie biocząsteczki w swojej strukturze zawierają jedenaście atomów tlenu, które wchodzą w skład różnych grup funkcyjnych. W strukturze salinomycyny występuje ponadto charakterystyczny 6-6-5 bis-spiroketalowy system pierścieni usztywniający całą cząsteczkę (Rys. 1), który rzadko występuje wśród innych naturalnie występujących związków [14, 15].

Zarówno monenzyna, jak i salinomycyna występują w formie otwartołańcuowej. Warto jednak zauważyć, że dzięki obecności grupy karboksylowej na jednym końcu cząsteczki i grupy hydroksylowej na drugim możliwe jest utworzenie wewnętrzcząsteczkowych wiązań wodorowych typu „głowa do ogona”. Proces ten prowadzi do utworzenia pseudocyklicznej struktury, w której atomy tlenu skierowane są do jej wnętrza, dzięki czemu związki te mogą łatwo kompleksować kationy (głównie Na^+ i K^+). Z drugiej strony, zewnętrzna część cząsteczek pozostaje hydrofobowa, co pozwala na łatwe przenikanie utworzonych kompleksów przez błony biologiczne (Rys. 2) [16, 17].

Właściwość ta pozwala na zaklasyfikowanie monenzyny i salinomycyny do dużej grupy naturalnie występujących związków, tzw. antybiotyków jonoforowych (jonoforów). Charakterystyczną cechą tych związków jest zdolność do wiązania

kationów i przenoszenia ich przez dwuwarstwy lipidowe ze środowiska zewnętrzkomórkowego do wnętrza komórki zgodnie z elektroneutralnym bądź elektrogenicznym (elektrogennym) mechanizmem transportu [18–20].



Rysunek 2. Struktura soli sodowej monenzyny (po lewej stronie) i soli sodowej salinomycyny (po prawej stronie)

Figure 2. The structure of monensin sodium salt (on the left side) and salinomycin sodium salt (on the right side)

1.1. AKTYWNOŚĆ PRZECIWBAKTERYJNA

Sole sodowe monenzyny i salinomycyny są powszechnie używane w weterynarii jako dodatki do paszy, pełniąc rolę niehormonalnych promotorów wzrostu bydła oraz kokcydiostatyków [17]. Wysoką aktywność przeciwbakteryjną tych związków można解释ać wpływem na wewnętrzną komórkową homeostazę sodowo-potasową i komórkowe pH, co prowadzi do znaczących zaburzeń procesów komórkowych skutkujących śmiercią bakterii [21, 22].

Potwierdzono, że oba związki są aktywne przeciw bakteriom Gram-dodatnim, między innymi bakteriom z rodzaju *Bacillus*, *Micrococcus* oraz *Staphylococcus* [23]. Jednocześnie aktywność wobec bakterii Gram-dodatniczych jest o wiele większa niż wobec Gram-ujemnych. Może to być wyjaśnione różnicą w budowie pomiędzy tymi bakteriami – ściana komórkowa bakterii Gram-ujemnych ma bardziej złożoną budowę i więcej warstw niż ściana komórkowa bakterii Gram-dodatniczych [24].

Monenzyna i salinomycyna wykazują również ograniczoną aktywność przeciw niektórym rodzajom grzybów, np. *Candida albicans*, *Colletotrichum gleosporioides*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* i *Saccharomyces cerevisiae* [25, 26].

Dodatkowo ustalono, że oba jonofory wykazują interesujące właściwości przeciwvirusowe. Udoskonalono na przykład, że monenzyna hamuje replikację wirusów odpowiedzialnych za pęcherzykowe zapalenie jamy ustnej i wirusa Sindbis (ang. *Sindbis virus*, SINV) [27, 28]. W innych badaniach potwierdzono, że monenzyna

hamuje penetrację wirusa gorączki lasu Semliki (ang. *Semliki Forest virus*, SFV) do komórek docelowych [29]. Z drugiej strony udokumentowano, że salinomycyna wykazuje silną aktywność przeciwko ludzkiemu wirusowi niedoboru odporności (HIV) [30].

Testy *in vitro* wykazały, że monenzyna jest aktywna wobec *Plasmodium falciparum*, jednego z głównych czynników wywołujących malarię u ludzi, i jednocześnie wykazuje w tych badaniach zdecydowanie większą aktywność w porównaniu do aktywności leku przeciwmalarycznego – chlorochiny. Z kolei testy *in vivo* na myszach zakażonych *Plasmodium vivax petteri* udowodniły, że monenzyna wyleczyła wszystkie zainfekowane myszy, gdy ją zastosować w dawce 10 mg kg^{-1} [31, 32].

Stwierdzono również, że obydwa jonofory są silnymi lekami przeciw kokcydiozie, chorobie pasożytniczej wywołanej przez kokcydia z rodzaju *Eimeria*. Są efektywne wobec *Eimeria acervulina*, *Eimeria brunetti*, *Eimeria maxima*, *Eimeria necatrix* i *Eimeria tenella*, zaś ich aktywność jest większa od aktywności powszechnie używanych leków kokcydiostatycznych [33].

Dodatkowo, poza weterynaryjnym zastosowaniem monenzyny i salinomycyny jako środków przeciw kokcydiozie oraz jako promotorów wzrostu drobiu i bydła, wykazano, że obydwa jonofory efektywnie i selektywnie hamują właściwości najróżniejszych komórek nowotworowych. Te interesujące odkrycia zostaną opisane w kolejnym podrozdziale ninejszego artykułu.

1.2. AKTYWNOŚĆ PRZECIWNOWOTWOROWA

Przeprowadzone w ostatnich latach badania wykazały, że monenzyna zapobiega wzrostowi komórek raka prostaty. W badaniach przesiewowych został zbadany efekt niemal 5000 dobrze znanych leków i związków lekopodobnych. Cztery z nich, w tym monenzyna, selektywnie hamowały wzrost komórek nowotworowych prostaty w nanomolowych stężeniach, nie wykazując znaczącego wpływu na wzrost zdrowych ludzkich komórek nabłonka prostaty. Dalsze badania wykazały, że monenzyna powoduje śmierć komórek nowotworowych prostaty poprzez redukowanie poziomu receptorów i białek androgenowych mRNA, zwiększając tym samym produkcję reaktywnych form tlenu i powodując uszkodzenia DNA. Ponadto stwierdzono, że efekty te nasilają się dzięki skojarzonemu leczeniu z użyciem środków przeciwandrogennych, zapobiegając wzrostowi komórek nowotworu prostaty [34].

Udowodniono, że monenzyna hamuje proces namnażania się komórek wielu innych rodzajów nowotworów, włączając w to nieprawidłowe komórki okrężnicy, chłoniaka i szpiczaka, poprzez zatrzymanie cyklu komórkowego, ale także przez utratę mitochondrialnego potencjału transbłonowego [35–37]. Stwierdzono również, że połączona terapia monenzyny z TRAIL, innym aktywnym przeciwnowotworowo środkiem, powoduje przezwyciężenie lekooporności w komórkach glejaka [38].

Ze względu na dużą lipofilowość cząsteczki monenzyny zaprojektowane zostały odpowiednie systemy dla efektywnego dostarczania i wykorzystania tego jonoforu. W tej grupie szczególnie interesujące wydaje się zastosowanie jako transporterów nanocząstek i modyfikowanych liposomów. Wykazano, że monenzyna włączona do liposomów wywołuje apoptozę *in vitro* i *in vivo* w opornym na doksorubicynę gruczołakoraku (nowotworze gruczołowym) piersi, nowotworze jelita grubego, złośliwym międzybłoniaku i komórkach glejaka, gdy ją stosować w skojarzonym leczeniu z innymi specyficznymi substancjami [39, 40].

Jednym z najtrudniejszych problemów, które musi rozwiązać współczesna medycyna onkologiczna, jest skuteczna walka z macierzystymi komórkami nowotworowymi, a więc prekursorami innych komórek nowotworowych, odgrywającymi kluczową rolę w powstawaniu nowotworów. Teoria macierzystych komórek nowotworowych zakłada, że wśród populacji komórek nowotworowych znajduje się niewielka subpopulacja komórek macierzystych, które odpowiedzialne są za nawrotы choroby, a także za jej rozsiew (metastazę) [41].

W standardowej terapii najczęściej stosowane chemioterapeutyki eliminują komórki będące w cyklu rozwojowym, ale macierzyste komórki nowotworowe nie są w tym cyklu, są oporne zarówno na chemioterapię, ponieważ zawierają między innymi większe ilości białek odpowiedzialnych za usuwanie leków z komórek, jak również na radioterapię z powodu znacznej ilości w ich wnętrzu zredukowanego glutationu i białek odpowiedzialnych za ochronę przed reaktywnymi formami tlenu powstającymi podczas napromieniania [41]. Przez tę oporność macierzyste komórki nowotworowe powodują nawrót choroby nowotworowej.

W tym kontekście badania z użyciem salinomycyny zaczęły cieszyć się wzmożonym zainteresowaniem od 2009 roku, w którym to roku badania przesiewowe przeprowadzone na około 16000 substancji biologicznie czynnych (w tym wielu lekach przeciwnowotworowych) wykazały, że tylko 32 badane związki zdolne były uśmiercać macierzyste komórki nowotworu piersi, a wśród nich najbardziej aktywna okazała się wspomniana salinomycyna. Związek ten eliminował komórki macierzyste nowotworu piersi *in vitro* i hamował wzrost guza sutka *in vivo* ze 100-krotnie większą selektywnością w porównaniu z powszechnie stosowanym lekiem przeciwnowotworowym – taksolem [42].

W ostatnich latach udokumentowano, że salinomycyna wywołuje apoptozę wielu ludzkich komórek nowotworowych, włączając w to komórki białaczkowe, kostniaka zarodkowego, komórki nowotworowe płuc, jelita grubego, żołądka, wątroby, jamy nosowo-gardłowej i prostaty. Ponadto udowodniono uwrażliwiające działanie salinomycyny na komórki nowotworowe w połączeniu z radioterapią lub różnymi środkami chemioterapeutycznymi, w tym: kolchicyną, gemcytabiną, imatinibem, tamoksyfenem i winblastyną [43].

Należy podkreślić, że w 2012 roku potwierdzono terapeutyczny efekt stosowania salinomycyny wśród chorych z inwazyjnym nowotworem głowy, szyi, piersi i jajników. Monoterapia z użyciem salinomycyny, stosowanej w dawce 200–250 µg kg⁻¹

podawanej dożylnie co drugi dzień przez trzy tygodnie, powodowała zahamowanie postępu choroby bez wystąpienia poważnych, długotrwałych działań niepożądanych często spotykanych przy zastosowaniu standardowych chemioterapeutyków, takich jak: mielosupresja (zmnieszenie liczby komórek szpiku kostnego), neutropenia (zmnieszenie liczby granulocytów), problemy żołądkowo-jelitowe, zakrzepowo-zatorowe i neurologiczne. Nie odnotowano również takich skutków ubocznych, jak łysienie, nudności i wymioty.

Chociaż minęło blisko dziesięć lat od odkrycia właściwości przeciwnowotworowych salinomycyny, do tej pory dokładny mechanizm jej działania wobec komórek nowotworowych i macierzystych komórek nowotworowych nie został w pełni wyjaśniony. Proponowane mechanizmy obejmują między innymi wpływ na takie procesy, jak: hamowanie szlaku sygnałowego Wnt/β-katenina, sygnalizacji Hedgehog i systemów wyrzutu leków, indukowanie wzmożonej produkcji reaktywnych form tlenu, uszkodzenie DNA, rozszczepienie polimerazy poli(ADP-rybozy), a także wiele innych procesów [43].

Do tej pory opublikowano ponad 2000 artykułów naukowych opisujących wyjątkowe właściwości salinomycyny, z tego prawie połowę po przełomowym 2009 roku. Podstawowe dane dotyczące właściwości fizykochemicznych monenzyny i salinomycyny (oraz ich soli sodowych) zebrane w Tabeli 1.

Tabela 1. Charakterystyka monenzyny i salinomycyny, a także ich soli sodowych
Table 1. Characterization of monensin and salinomycin as well as their sodium salts

Parametr	Monenzyna	Sól sodowa monenzyny	Salinomycyna	Sól sodowa salinomycyny
Numer CAS	17090-79-8	22373-78-0	53003-10-4	55721-31-8
Wzór sumaryczny	C ₃₆ H ₆₂ O ₁₁	C ₃₆ H ₆₁ NaO ₁₁	C ₄₂ H ₇₀ O ₁₁	C ₄₂ H ₆₉ NaO ₁₁
Masa molowa	670,87 g mol ⁻¹	692,85 g mol ⁻¹	751,00 g mol ⁻¹	772,98 g mol ⁻¹
Temperatura topnienia	103,0–105,0°C	267,0–269,0°C	112,5–113,5°C	140,0–142,0°C
pKa	6,6 (DMF)	–	6,5 (DMF)	–
Skręcalność optyczna	[α] _D ²⁵ + 47,7 (c = 1,00 MeOH)	[α] _D ²⁵ + 57,2 (c = 1,00 MeOH)	[α] _D ²⁵ – 63,0 (c = 1,00 EtOH)	[α] _D ²⁵ – 37,0 (c = 1,00 EtOH)

2. BIOKONIUGATY JONOFORÓW

Proces biokoniugacji, w którym dwie lub więcej bioaktywnych cząsteczek wiąże się za pomocą wiązania kowalencyjnego, jest jedną z najczęściej stosowanych strategii w opracowywaniu nowych leków (hybryd) o wyższej skuteczności biologicznego działania w porównaniu do komponentów wyjściowych. Biokoniugaty mogąostać utworzone poprzez połączenie w jednej cząsteczce tylko biomolekuł lub mogą być

połączeniami biomolekuł z syntetycznymi małymi cząsteczkami, a powstałe w ten sposób hybrydy mogą zostać wykorzystane do badań interakcji biologicznych, testów biochemicznych, obrazowania *in vitro*, badań diagnostycznych lub przemysłowych [45, 46].

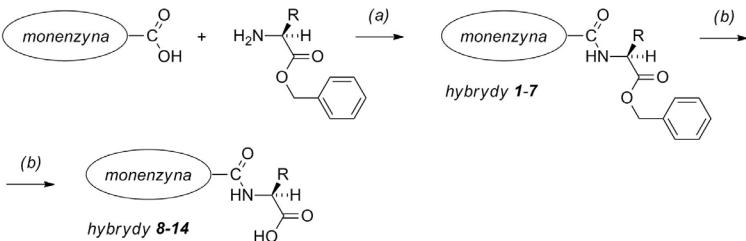
Należy jednak w tym miejscu podkreślić, że chemiczna modyfikacja antybiotyków jonoforowych nie należy do zadań łatwych. Cząsteczka salinomycyny ulega na przykład nieodwracalnemu procesowi rozpadu w kontakcie z silnymi kwasami lub zasadami, a także w przypadku nadmiernego ogrzewania [12]. Dlatego też modyfikacja chemiczna jonoforów, w tym ich biokoniugacja, musi zachodzić w łagodnych warunkach.

Do tej pory w literaturze naukowej opisano syntezę oraz aktywność biologiczną biokoniugatów monenzyny i salinomycyny z aminokwasami serii *L* [47–49], alkaloидami kory chinowca [50], wybranymi flavonoidami [51] i nukleozydami [52, 53], z czego większość prac opublikowano w ostatnich pięciu latach. Synteza i aktywność biologiczna wymienionych hybryd została opisana w kolejnych podrozdziałach tego artykułu.

2.1. BIOKONIUGATY Z AMINOKWASAMI SERII *L*

Po raz pierwszy syntezę biokoniugatów monenzyny z *L*-aminokwasami oraz struktury krystaliczne ich kompleksów z kationem sodu przedstawiono w 1988 roku [47]. Synteza tego typu hybryd jest interesującym obszarem badań z kilku powodów. Wykazano mianowicie, że aminokwasowe proleki, jak również ich pochodne, poprawiają słabą przepuszczalność przez błony biologiczne i rozpuszczalność, przedłużają uwalnianie, dystrybucję, ukierunkowanie i stabilność metaboliczną materiałów wyjściowych [54].

Cząsteczka monenzyny została skoniugowana z estrami benzylowymi wybranych aminokwasów serii *L* w obecności DCC (*N,N'*-dicykloheksylokarbodiimidu), który pełnił funkcję czynnika sprzęgającego i HOBr (1-hydroksybenzotriazolu) jako aktywatora tych reakcji (Schemat 1, związki 1–7, wydajność 90–97%). Usunięcie benzylowej blokady estrowej osiągnięto z dobrą wydajnością w atmosferze wodoru i w obecności aktywnego 5% palladu na węglu drzewnym jako katalizatora (Schemat 1, związki 8–14, wydajność 83–99%). Analiza rentgenograficzna struktury kompleksu amidu monenzyny z *L*-tyrozyną (Schemat 1, związek 12) z bromkiem sodu wykazała, że konformacja pochodnej różni się od konformacji kompleksu monenzyny z tą solą [47].



Bloki budulcowe (reszty aminokwasowe R):

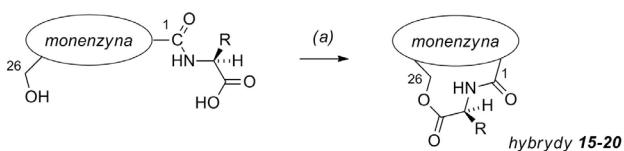
glicyna	R = H	hybryda 1 lub 8
alanina	R = CH ₃	hybryda 2 lub 9
seryna	R = CH ₂ OH	hybryda 3 lub 10
fenojoalanina	R = CH ₂ Ph	hybryda 4 lub 11
tyrozyna	R = CH ₂ PhOH	hybryda 5 lub 12
kwas asparaginowy	R = CH ₂ COOR'	hybryda 6 (R' = Bn) lub 13 (R' = H)
kwas glutaminowy	R = CH ₂ CH ₂ COOR'	hybryda 7 (R' = Bn) lub 14 (R' = H)

Schemat 1. Synteza biokoniugatów monenzyny z *L*-aminokwasami. Reagenty i warunki: (a) monenzyna (1,0 ekw.), HOBT (1,2 ekw.), DCC (1,2 ekw.), ester benzylowy aminokwasu (1,3 ekw.), *N*-metylomorfolina (1,3 ekw.), THF, 5°C przez 12 godz.; (b) hybryda monenzyny z blokowanym aminokwasem (1,0 ekw.), H₂, Pd 5%(C) (kat.), EtOH, 15–40 min. [47]

Scheme 1. Synthesis of monensin bioconjugates with *L*-amino acids. Reagents and conditions: (a) monensin (1.0 eq.), HOBT (1.2 eq.), DCC (1.2 eq.), amino acid benzyl ester *p*-toluenesulfonic acid (or HCl) salt (1.3 eq.), *N*-methylmorpholine (1.3 eq.), THF, 5°C for 12 h; (b) appropriate monensin hybrid with amino acid benzyl ester (1.0 eq.), H₂, Pd 5%(C) (cat.), EtOH, 15–40 min. [47]

Testy *in vivo* związków 8–14 (Schemat 1) na ich aktywność kokcydiostatyczną były przeprowadzone na kurczakach zarażonych *Eimeria tennella*. Wyniki badań pokazały, że wszystkie hybrydy są całkowicie nieaktywne wobec tych wysoce patogennych pasożytów [47].

W roku 1991 w tej samej grupie badawczej otrzymana została seria makrocyklicznych laktonów monenzyny z aminokwasami serii *L* (Schemat 2, związki 15–20, wydajność 67–84%). Biokoniugat monenzyny z glicyną zsyntezowano przy użyciu reakcji Coreya-Nicolaou, podczas gdy pozostałe makrolaktony otrzymano z dobrą wydajnością, wykorzystując efekt templatowy poprzez dodanie chlorku potasu do odczynników Coreya (Schemat 2) [48].



Bloki budulcowe (reszty aminokwasowe R):

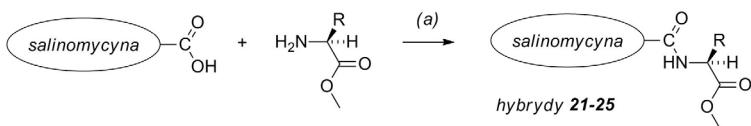
glicyna	R = H	hybryda 15
alanina	R = CH ₃	hybryda 16
fenyloalanina	R = CH ₂ Ph	hybryda 17
tyrozyna	R = CH ₂ PhOH	hybryda 18
kwas asparaginowy	R = CH ₂ COOH	hybryda 19
kwas glutaminowy	R = CH ₂ CH ₂ COOH	hybryda 20

Schemat 2. Laktonizacja biokoniugatów monenzyny z *L*-aminokwasami. Reagenty i warunki: (a) hybryda monenzyny z odblokowanym aminokwasem (1,0 ekw.), 2,2'-ditiopirydyna (10,0 ekw.), PPh₃ (10,0 ekw.), KCl w MeOH (1,0 ekw., za wyjątkiem biokoniugatu monenzyny z naturalną glicyną), benzen, rt (temperatura pokojowa) przez 8 godz., następnie wrzenie przez kolejne 4 godz. [48]

Scheme 2. Lactonization of monensin bioconjugates with *L*-amino acids. Reagents and conditions: (a) monensin hybrid with unblocked amino acid (1.0 eq.), 2,2'-dithiodipyridine (10.0 eq.), PPh₃ (10.0 eq.), KCl in MeOH (1.0 eq., except for monensin hybrid with natural glycine), benzene, rt (room temperature) for 8h, then boiling for next 4h [48]

Testy na aktywność przeciwbakterijną przeciwko różnym bakteriom beztlenowym, w tym: *Eubacterium lentum*, *Clostridium perfringens*, *Lactobacillus acidophilus*, *Peptococcus anaerobius*, *Peptostreptococcus anaerobius* i *Propionibacterium acnes*, wykazały słabą aktywność tych związków. Co więcej, otrzymane makrolaktony nie wykazały aktywności kokcydiostatycznej na kurczakach zainfekowanych *Eimeria tennella*, prawdopodobnie z powodu niskiej lipofilowości i tym samym obniżonej rozpuszczalności w błonach biologicznych [48].

Z kolei w 2015 roku została otrzymana seria pięciu biokoniugatów salinomycyny z estrami metylowymi *L*-aminokwasów. Jednocześnie po raz pierwszy wykazano aktywność przeciwnowotworową tego typu hybryd. Wydajna procedura syntetyczna opierała się na reakcji pomiędzy salinomycyną i odpowiednim estrem metylowym *L*-aminokwasu w obecności DCC i HOBr (Schemat 3, związki 21–25, wydajność 51–75%) [49].



Bloki budulcowe (reszty aminokwasowe R):

glicyna	R = H	hybryda 21
seryna	R = CH ₂ OH	hybryda 22
fenyloalanina	R = CH ₂ Ph	hybryda 23
tyrozyna	R = CH ₂ PhOH	hybryda 24
histydyna	R = CH ₂ C ₆ H ₃ N ₂	hybryda 25

Schemat 3. Synteza biokoniugatów salinomycyny z *L*-aminokwasami. Reagenty i warunki: (a) salinomycyna (1,0 ekw.), DCC (1,2 ekw.), HOBT (0,5 ekw.), ester metylowy aminokwasu (2,5 ekw.), Et₃N (2,5 ekw., jeżeli aminokwas jest w postaci chlorowodorku), DMF, 0°C przez 1 godz., następnie tp przez kolejne 24 godz. [49]

Scheme 3. Synthesis of salinomycin bioconjugates with *L*-amino acids. Reagents and conditions: (a) salinomycin (1.0 eq.), DCC (1.2 eq.), HOBT (0.5 eq.), amino acid methyl ester (2.5 eq.), Et₃N (2.5 eq., if the amino acid methyl ester hydrochloride is used), DMF, 0°C for 1h, then rt for next 24 h [49]

Salinomycyna i jej biokoniugaty zostały zbadane pod kątem ich aktywności przeciwnowotworowej wobec trzech ludzkich linii komórek nowotworowych: lekowrażliwego (LoVo) i lekoopornego (LoVo/DX) gruczolakoraka okreźnicy oraz białaczki mielomonocytowej (MV4-11). Ponadto wyznaczona została toksyczność tych związków względem normalnych mysich embrionalnych fibroblastów (BALB/3T3) (Tab. 2) [49].

Trzy z pięciu otrzymanych biokoniugatów (Schemat 3, związki 21, 23 i 25) wykazały wysoką aktywność przeciwproliferacyjną, a aktywność ta była porównywalna z wykazywaną przez dwa powszechnie stosowane leki przeciwnowotworowe – cisplatynę i doksorubicynę. Najbardziej aktywnymi związkami były te, które zawierały alifatyczno-aromatyczne podstawniki, tj. hybrydy 23 i 25 (Schemat 3). Należy w tym miejscu podkreślić, że związek 25 (Schemat 3) jest jedną z najbardziej biologicznie aktywnych pochodnych salinomycyny otrzymanych przez chemiczną modyfikację grupy karboksylowej tego jonoforu. Aktywność przeciwnowotworowa wszystkich hybryd wzrasta przeciwko lekoopornym komórkom LoVo/DX, w tym przypadku aktywność związku 25 ($IC_{50} = 0,85 \mu M$, Tab. 2) jest kilkakrotnie wyższa od aktywności zaobserwowanej dla obu leków referencyjnych [49]. Dane te są ważne, ponieważ każda komórka nowotworowa podczas długotrwałej monochemioterapii może nabywać oporności na stosowane leki, co powoduje nawrót choroby i złe rokowania dla pacjentów [55].

Z tego powodu dużym wyzwaniem rzuconym współczesnym naukowcom jest poszukiwanie nowych związków charakteryzujących się wysoką skutecznością przeciwproliferacyjną zarówno przeciwko komórkom nowotworowym, które wykazują wrażliwość na stosowane leki, jak i komórkom lekoopornym. Wysoka zdolność aminokwasowych biokoniugatów salinomycyny do przełamywania lekooporności badanych komórek nowotworowych została potwierdzona przez niskie wartości współczynnika lekooporności (ang. *Resistance Index*, RI) (Tab. 3). Wartość RI

wskazuje, jak bardzo lekooporna nowotworowa linia komórkowa jest podatna na działanie danej substancji w porównaniu z lekowrażliwą linią komórkową; RI w zakresie 0–2 oznacza, że komórki nowotworowe są bardzo wrażliwe na działanie użytego związku [56]. Wartości współczynników RI potwierdziły, że wszystkie biokoniugaty aminokwasowe silnie przełamywały lekooporność komórek rakowych (RI w zakresie 0,23–1,00, Tab. 3), znacznie silniej niż chemicznie niezmodyfikowana salinomycyna (RI = 2,11), jak również oba leki referencyjne (RI = 1,41 dla cisplatyny i RI = 36,40 dla doksorubicyny) [49].

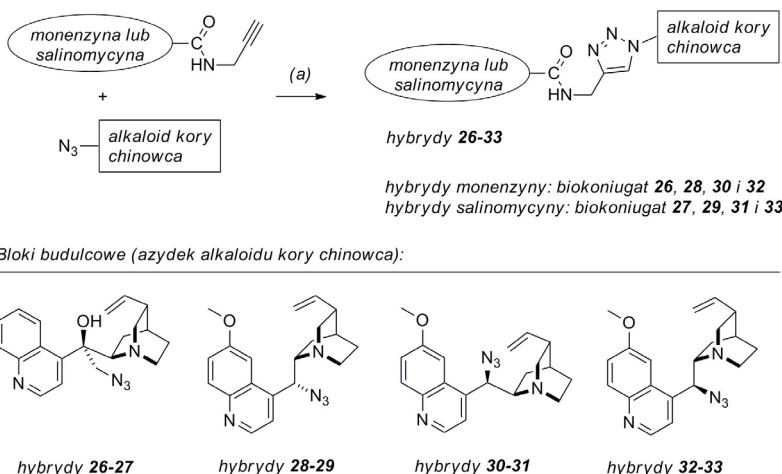
Ponadto wszystkie hybrydy były mniej toksyczne wobec prawidłowych mysich fibroblastów (BALB/3T3) niż cisplatyna i doksorubicyna, co potwierdziły wysokie wartości współczynników IC_{50} (Tab. 2), ale także współczynników selektywności (ang. *Selectivity Index, SI*) (Tab. 3). Wyznaczone wartości współczynników SI, niezwykle ważnego parametru farmaceutycznego, który ułatwia oszacowanie możliwości przyszłego zastosowania klinicznego badanych substancji [57], jednoznacznie dowiodły, że biokoniugaty salinomycyny z aminokwasami serii L są wysoce specyficznymi i selektywnymi środkami przeciwnowotworowymi ($SI > 4,00$ w większości przypadków) (Tab. 3) [49].

Salinomycyna transportuje kationy przez błony lipidowe zgodnie z mechanizmem elektroneutralnym [18–20], który nie może być skutecznie realizowany w komórkach nowotworowych. Jak wykazał Otto Warburg [58], komórki rakowe są zakwaszone, a więc grupa karboksylowa antybiotyków jonoforowych w takich warunkach (niskie pH) nie może ulegać deprotonacji. Z tego powodu chemiczna modyfikacja grupy karboksylowej salinomycyny nie powinna wpływać na mechanizm transportu kationów w komórkach nowotworowych, zaś preferowanym rodzajem transportu będzie transport biomimetyczny, który jest skutecznie realizowany przez jonofory z chemicznie zmodyfikowaną grupą karboksylową [18–20]. Fakt ten może wyjaśniać wysoką aktywność przeciwnowotworową biokoniugatów salinomycyny [49].

2.2. BIOKONIUGATY Z ALKALOIDAMI KORY CHINOWCA

Spośród tysięcy produktów naturalnych tylko niewielka ich część wywołała szeroki oddźwięk społeczny czy też ekonomiczny. W tej grupie związków znajdują się alkaloidy kory chinowej, z których najpopularniejsze są chinina oraz chinidyna. Alkaloidy kory drzewa chinowego są unikatową grupą naturalnie występujących związków, które były używane przez wieki jako leki przeciwmalaryczne i przeciwarytmiczne [59]. Udokumentowano również, że chinina i cynchonina są skutecznymi lekami przełamującymi lekooporność komórek nowotworowych pacjentów leczonych przy użyciu etyloprednizolonu, doksorubicyny, paklitakselu lub winblastyny [60]. Co więcej, udowodniono, że biokoniugaty alkaloidów kory chinowej z AZT wykazują bardzo interesujące właściwości przeciwnowotworowe w badaniach *in vitro* [61].

W 2015 roku przedstawiono syntezę serii biokoniugatów monenzyny i salinomycyny z czterema różnymi alkaloidami kory chinowej (Schemat 4). Procedura syntezy oparta była na 1,3-dipolarnej cykloaddycji Huisgena katalizowanej jonami miedzi(I) pomiędzy amidem propargilowym monenzyny lub salinomycyny i odpowiednim azydkiem alkaloidu kory drzewa chinowego. Pomimo wielofunkcyjnego charakteru obu antybiotyków jonoforowych reakcje przebiegły bez problemów, czego rezultatem było otrzymanie serii ośmiu hybryd z dobrą wydajnością (Schemat 4, związki 26–33, wydajność 50–82%) [50].



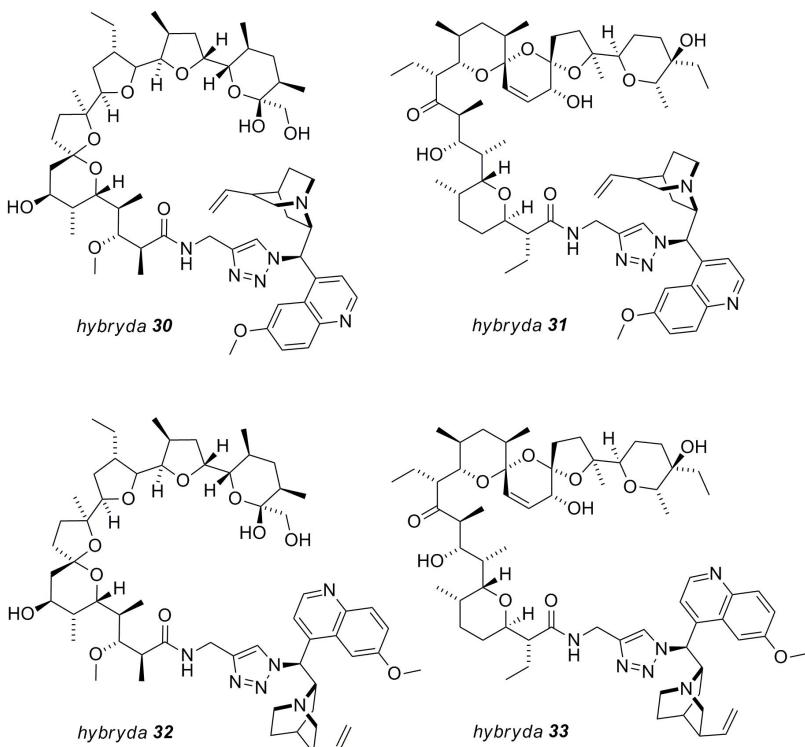
Schemat 4. Syntea biokoniugatów monenzyny i salinomycyny z alkaloidami kory chinowej. Reagenty i warunki: (a) amid propargilowy monenzyny lub salinomycyny (1,0 ekw.), azydek alkaloidu (1,0 ekw.), CuSO₄ aq. (0,5 ekw., 1,0 M), askorbinian sodu (1,0 ekw.), mieszanina MeOH/H₂O (1:1), tp, 24–48 godz. [50]

Scheme 4. Synthesis of monensin and salinomycin bioconjugates with Cinchona alkaloids. Reagents and conditions: (a) monensin or salinomycin N-propargyl amide (1.0 eq.), Cinchona alkaloid azide (1.0 eq.), aq. CuSO₄ (0.5 eq., 1.0 M), sodium ascorbate (1.0 eq.), MeOH/H₂O mixture (1:1), rt, 24–48 h [50]

Wszystkie zsyntetyzowane hybrydy poddano badaniom aktywności przeciwwirusowej na trzech ludzkich liniach komórek nowotworowych: lekowrażliwego i lekoopornego gruczołakoraka okrężnicy (odpowiednio LoVo i LoVo/DX) oraz nowotworu wątroby (HepG2). Ich toksyczność została sprawdzona wobec normalnych mysich embrionalnych fibroblastów (BALB/3T3) (Tab. 2) [50].

Najbardziej aktywnym związkiem w tych badaniach okazała się niezmodyfikowana chemicznie monenzyna. Co należy w tym miejscu podkreślić, aktywność monenzyny była około dziesięciokrotnie wyższa niż aktywność salinomycyny. Spółród wszystkich zsyntetyzowanych związków biokoniugaty monenzyny i salinomycyny z 9-epichinidyną (Rys. 3, związki 30–31) oraz 9-epichininą (Rys. 3, związki 32–33) wykazały działanie przeciwnowotworowe w zakresie stężeń mikromolowych ($IC_{50} < 3,00 \mu\text{M}$, Tab. 2), a jednocześnie hybrydy te były mniej toksyczne

wobec prawidłowych komórek od dwóch leków referencyjnych użytych w testach. Co ciekawe, pięć z ośmiu otrzymanych biokoniugatów wykazało wysoką aktywność wobec lekoopornej linii komórkowej LoVo/DX, co zostało potwierdzone przez wartości współczynników RI niższych niż 1,00 (Tab. 3). Jak dotąd dokładny mechanizm biologiczny działania tych wielofunkcyjnych cząsteczek pozostaje niejasny [50].



Rysunek 3. Struktura najbardziej aktywnych przeciwnowotworowo biokoniugatów monenzyny oraz salinomycyny z 9-epichinidyną i 9-epichininą [50]

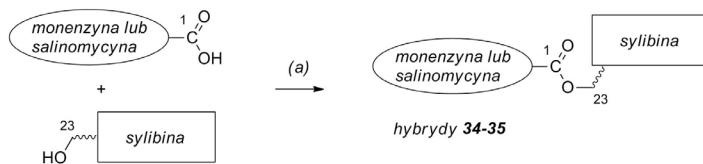
Figure 3. The structure of the most anti-cancer active bioconjugates of monensin and salinomycin with 9-epiquinidine and 9-epiquinine [50]

2.3. BIKONIUGATY Z FLAWONOIDAMI

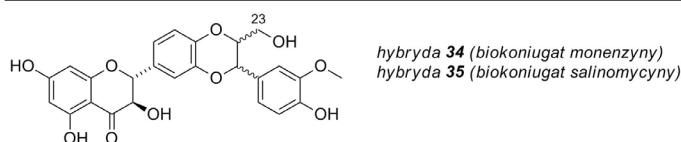
W 2015 roku zaproponowano również procedurę syntezy biokoniugatów monenzyny i salinomycyny z sylibiną (Schemat 5) [51]. Sylibina jest głównym składnikiem (około 50%) silymaryny – wykorzystywanego w lecznictwie kompleksu flavonolignanów pochodzenia roślinnego. Sylibina izolowana z nasion ostropęstu plamistego występuje w naturze jako mieszanina dwóch diastereoizomerów (sylibina A i B), które tworzą kompleks zwany sylibininą [62]. Udowodniono, że sylibina wykazuje silne właściwości przeciwnowotworowe, przeciwtłuszczające, hepatochronne,

przeciwzapalne, zapobiega marskości i zwłóknieniu wątroby, nerek i serca, chroni przed wolnymi rodnikami [63, 64]. Wykazano ponadto, że biokoniugaty sylibiny z mono- i disacharydami, a także kwasami thuszczowymi charakteryzują się właściwościami przeciwtleniającymi i neuroochronnymi, a przy tym mogą być skutecznymi środkami przeciwko wirusowi grypy [65, 66].

Oba biokoniugaty otrzymano w reakcji typu one-pot pomiędzy monenzyną lub salinomycyną a sylibiną w obecności DCC, PPy (4-pirolidynopirydyny) i katalitycznej ilości kwasu *p*-toluenosulfonowego będącego aktywatorem DCC. Zaprezentowana łagodna procedura estryfikacji doprowadziła do otrzymania diastereoizomerycznych hybryd estrowych z umiarkowaną wydajnością (Schemat 5, związki 34–35, wydajność 35–43%) [51].



Blok budulcowe (sylibina):



Schemat 5. Synteza biokoniugatów monenzyny i salinomycyny z sylibiną. Reagenty i warunki: (a) monenzyna lub salinomycyna (1,0 ekw.), sylibina (2,5 ekw.), DCC (1,5 ekw.), PPy (0,5 ekw.), kwas *p*-toluenosulfonowy (0,23 ekw.), THF, od 0°C do tp, 24 godz. [51]

Scheme 5. Synthesis of monensin and salinomycin bioconjugates with silybin. Reagents and conditions: (a) monensin or salinomycin (1.0 eq.), silybin (2.5 eq.), DCC (1.5 eq.), PPy (0.5 eq.), *p*-toluenesulfonic acid (0.23 eq.), THF, 0°C to rt, 24 h [51]

Badania aktywności przeciwproliferacyjnej wykazały jednoznacznie, że oba biokoniugaty były aktywne w stężeniach mikromolowych (IC_{50} od 0,57 do 14,01 μ M, Tab. 2) wobec testowanych komórek nowotworowych, a jednocześnie wykazały niską toksyczność wobec prawidłowych mysich fibroblastów BALB/3T3 (IC_{50} > 30,00 μ M i wysokie wartości SI, Tab. 2 i Tab. 3), przy czym bardziej aktywna była hybryda sylibiny z monenzyną. Ponadto, oba biokoniugaty były bardziej aktywne niż cisplatyna wobec linii komórkowych LoVo i LoVo/DX (RI około 1,00) i stosunkowo mniej aktywne niż doksorubicyna wobec komórek nowotworowych HepG2 (Tab. 2 i Tab. 3) [51].

Przyjmuje się, że wiązania estrowe obecne w strukturze obu hybryd powinny być stabilne w układzie krążenia, ale po wniknięciu do wnętrza komórek rakowych owe wiązania powinny być łatwo hydrolizowane przez obecne tam karboksyesterazy – enzymy standardowo zaangażowane w aktywację wielu proleków estrowych [67].

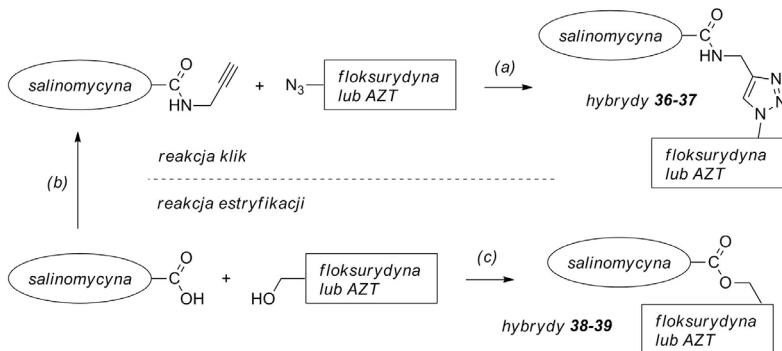
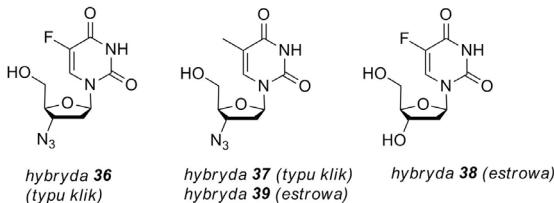
Proces hydrolizy w komórkach i tkankach powinien zatem skutkować „odtworzeniem” dwóch aktywnych biokomponentów, tj. wysoce skutecznej przeciwnowotrowo monenzyny lub salinomycyny oraz sylibiny o udowodnionych właściwościach chemoochronnych i przeciwtleniających [51].

2.4. BIOKONIUGATY Z NUKLEOZYDAMI

Ostatnią grupę biokoniugatów stanowią hybrydy antybiotyków jonoforowych z nukleozydami. W 2015 roku zaproponowano syntezę dwóch różnych biokoniugatów salinomycyny z 5-fluoro-2'-deoksurydyną (floksurydyną) [52], która jest znaną pochodną 5-fluorouracylu, zaś w 2017 roku dwóch innych hybryd salinomycyny z AZT (Schemat 6) [53].

Floksurydyna była stosowana w leczeniu różnych ludzkich guzów, ale jej działanie chemioterapeutyczne jest ograniczone z powodu niskiej biodostępności, skuteczności wychwytu komórkowego oraz wysokiej toksyczności [68]. Z drugiej strony zaobserwowano synergiczne działanie przeciwnowotworowe pomiędzy salinomycyną i floksurydyną wobec komórek nowotworu wątroby [69]. Z tego powodu interesującym kierunkiem badań było sprawdzenie, w jaki sposób proces biokoniugacji z salinomycyną wpłynie na właściwości biologiczne floksurydyny. Z kolei głównym ograniczeniem terapeutycznym pochodnych AZT jest ich toksyczność, która obejmuje supresję szpiku kostnego, nieprawidłowości wątrobowe, a także miopatię [70]. Jedną z obiecujących strategii „stłumienia” wspomnianych toksycznych efektów ubocznych może być biokoniugacja AZT z wysoce selektywnymi związkami, takimi jak salinomycyna.

Biokoniugaty salinomycyny z nukleozydami były otrzymywane za pomocą dwóch różnych procedur opisanych już wcześniej (podrozdział 2.2 i 2.3). Pierwsza metoda opierała się na 1,3-dipolarnej cykloaddycji Huisgena katalizowanej jonami miedzi(I), gdzie substratami były: amid propargilowy salinomycyny i odpowiedni komponent azydkowy (Schemat 6, związek **36–37**, wydajność 55–61%), przy czym amid propargilowy salinomycyny został zsyntezowany w reakcji pomiędzy salinomycyną i propargiloaminą w obecności DCC i HOBr (Schemat 6). Druga metoda opierała się na łagodnej reakcji estryfikacji salinomycyny z pierwszorzędową grupą hydroksylową floksurydyny bądź AZT w obecności DCC, PPy i kwasu *p*-toluenosulfonowego, która doprowadziła do powstania oczekiwanych produktów reakcji z dobrą wydajnością (Schemat 6, związki **38–39**, wydajność 67–73%) [52, 53].

*Blok budulcowe (floksurydyna i jej azydka, AZT):*

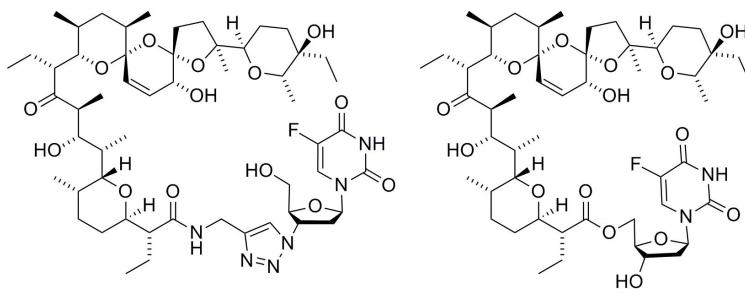
Schemat 6. Synteza biokoniutatów salinomycyny z nukleozydami. Reagenty i warunki: (a) amid propargilowy salinomycyny (1,0 ekw.), 3'-deoksy-3'-azydofloksurydyna lub AZT (1,0 ekw.), CuSO₄ aq (0,08 ekw., 1,0 M), askorbinian sodu (0,3 ekw.), dioksan/H₂O (3:1), tp przez 12 godz.; (b) salinomycyna (1,0 ekw.), DCC (1,5 ekw.), HOBr (0,5 ekw.), propargyloaminy (3,0 ekw.), DCM/THF (3:1), 0°C przez 1 godz., następnie tp przez kolejne 24 godz.; (c) salinomycyna (1,0 ekw.), floksurydyna lub AZT (1,2 ekw.), DCC (1,5 ekw.), PPy (0,5 ekw.), kwas *p*-toluenosulfonowy (0,23 ekw.), DCM, 0°C przez 6 godz., następnie tp przez kolejne 18 godz. [52, 53]

Scheme 6. Synthesis of salinomycin bioconjugates with nucleosides. Reagents and conditions: (a) salinomycin propargyl amide (1.0 eq.), 3'-deoxy-3'-azidofloxuridine or AZT (1.0 eq.), aq. CuSO₄ (0.08 eq., 1.0 M), sodium ascorbate (0.3 eq.), dioxane/H₂O (3:1), rt for 12 h; (b) salinomycin (1.0 eq.), DCC (1.5 eq.), HOBr (0.5 eq.), propargylamine (3.0 eq.), DCM/THF (3:1), 0°C for 1 h, then rt for next 24 h; (c) salinomycin (1.0 eq.), floxuridine or AZT (1.2 eq.), DCC (1.5 eq.), PPy (0.5 eq.), *p*-toluenesulfonic acid (0.23 eq.), DCM, 0°C for 6 h, then rt for next 18 h [52, 53]

Hybrydy salinomycyny z floksurydyną były w pierwszej kolejności testowane pod względem ich właściwości przeciwbakteryjnych wobec różnorodnych Gram-dodatnich szczepów bakteryjnych, włącznie ze szpitalnymi, antybiotykoopornymi szczepami gronkowca złocistego, których obecność stanowi obecnie jeden z największych problemów w szpitalach na całym świecie [71]. Udowodniono, że biokoniutat estrowy z floksurydyną (Rys. 4, związek 38) hamuje wzrost antybiotykoopornych szczepów gronkowca złocistego w stężeniach mikromolowych (MIC = 8,2–2,7 μM) i jednocześnie aktywność ta była kilkakrotnie wyższa niż wykazywana przez antybiotyk referencyjny – cyprofloksacynę (MIC = 96,7–193,4 μM). Hybryda 36 (Rys. 4, była praktycznie nieaktywna w tych badaniach [52, 53].

W przypadku wszystkich biokoniutatów salinomycyny z nukleozydami określono ich aktywność przeciwnowotworową wobec różnych linii komórek nowotwo-

rowych, w tym dwóch opornych na cytostatyki. Badania te przeprowadzono wobec komórek ludzkiej białaczki promielocytowej wrażliwej (HL-60) i opornej na działanie leków (HL-60/vinc), lekowrażliwego (LoVo) i lekoopornego gruczołakoraka okrężnicy (LoVo/DX), jak również trzech innych linii komórkowych ludzkiego raka okrężnicy o różnej charakterystyce, tj. HT-29, LS-180 i SW707. Dodatkowo obydwie hybrydy z AZT przetestowano na ich aktywność wobec komórek ludzkiej białaczki mielomonocytowej (MV4-11). Biokoniugaty estrowe (Schemat 6, związki 38–39) wykazały wielokrotnie wyższą aktywność przeciwproliferacyjną w porównaniu z hybrydami 36–37 (Schemat 6) (Tab. 2). Należy podkreślić, że związek 38 (Rys. 4) wykazał znacznie lepsze właściwości biologiczne niż jego prekursor – floksurydyna, jak również dwa referencyjne leki chemioterapeutyczne – cisplatyna i dokosorubicyna (Tab. 2). Jednocześnie aktywność ta była porównywalna do wykazywanej przez niezmodyfikowaną salinomycynę, przy czym warto zauważyć, że wartość współczynnika SI była wyższa dla związku 38 (Rys. 4) ($SI = 22,11\text{--}34,71$) niż dla jonoforu wyjściowego ($SI = 12,28\text{--}25,92$). Jak pokazano w Tab. 3, związek 38 (Rys. 4) silnie przełamywał oporność lekową linii komórkowej LoVo/DX (RI = 0,64) [52, 53].



Rysunek 4. Struktura biokoniugatów salinomycyny z floksurydyną [52]
Figure 4. The structure of salinomycin bioconjugates with flouxuridine [52]

Przeprowadzone analizy HPLC wyraźnie wykazały, że wszystkie biokoniugaty były stabilne w 0,1 M buforze fosforowym (pH 7,2). Jednak olbrzymie różnice w aktywności biologicznej między hybrydami estrowymi i hybrydami 36–37 sugerowały występowanie różnic w stabilności enzymatycznej pomiędzy wiązaniami estrowymi i amidowymi występującymi w tych strukturach. Ponadto w strukturze biokoniugatów 36–37 obecny jest stabilny enzymatycznie układ triazolowy. Jak wspomniano wcześniej, po wniknięciu do komórek nowotworowych wiązanie estrowe w związkach 38–39 (Schemat 6) powinno być stosunkowo łatwo zrywane przez karboksysterazy [67]. Z drugiej strony wiązanie amidowe, a także układ triazolowy obecne w strukturach 36–37 (Schemat 6) są bardziej stabilne chemicznie i enzymatycznie, przez co najprawdopodobniej nie może być skutecznie hydrolizowane przez amidazy komórkowe z utworzeniem biologicznie aktywnej formy salinomycyny [72]. Ponadto pierścienie triazolowe są typowymi pasywnymi łącznikami

[67, 72], które nie są w stanie ulegać hydrolizie w warunkach fizjologicznych ani pod wpływem specyficznych enzymów komórkowych [52, 53].

Innym wyjaśnieniem dużych różnic we właściwościach biologicznych pomiędzy biokoniugatami estrowymi a hybrydami **36–37** jest fakt, że produktami hydrolyzy związków **36–37** (Schemat 6) mogą być pochodne tetrazolowe odpowiednio 3'-deoksyfloksurydyny bądź AZT, które prawdopodobnie nie wykazują wysokiej aktywności biologicznej. Jednocześnie biokoniugaty **38–39** (Schemat 6) wykazały wyższą aktywność, ponieważ te hybrydy są rzeczywistymi prolekami dwóch skoniugowanych i biologicznie czynnych substancji, tj. salinomycyny i floksurydyny lub AZT [52, 53].

Tabela 2. Aktywność przeciwproliferacyjna biokonjugatów monenzyjnych i salinomycyny w porównaniu z aktywnością wyjściowych antybiotyków jonoforowych, a także dwóch leków referencyjnych – cisplatynę i doktorubicynę. Wynik przedstawiono w postaci wartości współczynnika IC_{50} wyrażonych w μM . Ciągłe linie oddzielają poszczególne serie hybryd [49–53]

Anti-proliferative activity of monensin and salinomycin bioconjugates compared to that of the starting ionophore antibiotics as well as two reference drugs – cisplatin and doxorubicin. Results are given as IC_{50} in μM . Continuous lines separate the individual series of hybrids [49–53]

Table 2.

Związek	Komórki nowotworowe							Komórki normalne
	HL-60	HL-60/vinc	MV4-11	HepG2	LoVo	LoVo/DX	HT-29	
34 z biokoniugatami	nie badano	nie badano	nie badano	4,43 ± 0,83	0,59 ± 0,18	0,57 ± 0,04	nie badano	nie badano
35 z biokoniugatami	nie badano	nie badano	nie badano	14,01 ± 5,39	3,63 ± 0,27	3,93 ± 0,04	nie badano	nie badano
36 z biokoniugatami	28,65 ± 2,51 ba ^{a)}	ba ^{a)}	nie badano	nie badano	41,25 ± 10,02	70,42 ± 12,29	30,06 ± 0,11	32,81 ± 4,05
37 z biokoniugatami	14,88 ± 4,94 ba ^{a)}	ba ^{a)}	nie badano	nie badano	31,73 ± 8,90 ba ^{a)}	30,61 ± 1,21	29,41 ± 1,00	30,44 ± 0,36
38 z biokoniugatami	0,37 ± 0,11	2,82 ± 1,25	nie badano	nie badano	1,46 ± 0,57	0,93 ± 0,19	2,02 ± 0,41	1,99 ± 0,23
39 dokosubicyna	0,46 ± 0,15	3,12 ± 1,19	2,38 ± 0,04	nie badano	3,61 ± 0,17	2,69 ± 0,18	1,60 ± 0,45	1,77 ± 0,21
cisplatyna	1,00 ± 0,23	6,87 ± 1,63	2,33 ± 0,60	8,93 ± 1,37	3,70 ± 1,20	5,20 ± 1,93	10,70 ± 1,27	6,30 ± 1,33
dokosubicyna	0,04 ± 0,04	0,88 ± 0,26	0,05 ± 0,02	0,77 ± 0,22	0,15 ± 0,06	5,46 ± 1,56	0,89 ± 0,09	0,09 ± 0,04
								0,18 ± 0,02
								0,18 ± 0,07

Ludzka białaczka promielocytowa wrażliwa (HL-60) i oporna na działanie leków (HL-60/vinc), ludzka białaczka bifenotypowa (MV4-11), ludzki nowotwór wątroby (HepG2), ludzkie lekowrażliwy (LoVo) oraz lekooporny (LoVo/DX) nowotwór okrężny, ludzki nowotwór różnicę charakterystyczne (HT-29, LS-180, SW707), prawidłowe mysie fibroblasty (BALB/3T3), ^{a)} ba – brak aktywności.
 Human promyelocytic leukemia (HL-60/vinc), human biphenotypic myelomonocytic leukemia (MV4-11), human liver cancer (HepG2), human colon adenocarcinoma (LoVo) and its drug-resistant subline (LoVo/DX), human colorectal adenocarcinoma with different characteristics (HT-29, LS-180, SW707), normal murine embryonic fibroblasts (BALB/3T3), ^{a)} ba – no activity.

Tabela 3. Wyznaczone współczynniki lekooporności (RI) i selektywności (SI) biokonjugatów monenzyny i salinomycyny dla wybranych nowotworowych linii komórkowych. Ciągłe linie oddzielają poszczególne serie hybryd [49–53]

Table 3. The calculated values of the indexes of resistance (RI) and selectivity (SI) of monensin and salinomycin bioconjugates for selected cancer cell lines. Continuous lines separate the individual series of hybrids [49–53]

Związek	MV4-11	HepG2	LoVo	LoVo/DX	
	SI	SI	SI	SI	RI
monenzyna	brak danych	8,61	109,00	93,43	1,17
salinomycyna	28,27	0,75	25,92	12,28	2,11
21	biokonjugaty z naturalnymi aminokwasami	11,64	brak danych	8,03	10,81
22		6,90	brak danych	2,27	5,16
23		5,89	brak danych	4,87	4,87
24		12,22	brak danych	2,95	6,09
25		46,26	brak danych	10,08	43,54
26	biokonjugaty z alkaloidami kory chinowca	brak danych	6,40	4,98	7,58
27		brak danych	1,74	2,93	2,04
28		brak danych	8,03	3,72	6,88
29		brak danych	2,71	1,56	0,23
30		brak danych	2,74	2,79	2,50
31		brak danych	1,08	1,12	1,37
32		brak danych	1,96	1,72	2,26
33		brak danych	1,16	1,42	1,36
34	biokonjugaty z sylbiną	brak danych	7,13	53,53	55,40
35		brak danych	2,15	8,29	7,66
36	bioko-niugaty z nukleozydami	brak danych	brak danych	0,72	0,42
37		---	brak danych	1,04	---
38		brak danych	brak danych	22,11	34,71
39		6,77	brak danych	4,46	5,99
cisplatyna		2,27	0,59	1,43	1,02
doksorubicyna		3,60	0,23	1,20	0,03
					36,40

Indeks lekooporności RI oznacza, jak bardzo wrażliwa na działanie danego związku jest lekooporna nowotworowa linia komórkowa (LoVo/DX) w porównaniu do lekowrażliwej sublinii (LoVo). RI w zakresie 0–2 oznacza wysoką wrażliwość, w zakresie 2–10 umiarkowaną wrażliwość, natomiast RI powyżej 10 oznacza wysoką oporność komórek na działanie badanego związku. Indeks selektywności SI wyznaczono według wzoru: $SI = IC_{50}$ wyznaczone dla prawidłowych komórek organizmu (BALB/3T3) / IC_{50} wyznaczone dla odpowiednich komórek nowotworowych. SI powyżej 1,00 oznacza wyższą selektywność działania badanego związku wobec komórek nowotworowych niż komórek prawidłowych.

The RI index indicates how many times a given drug-resistant subline (LoVo/DX) is chemoresistant relative to its parental cell line (LoVo). When RI is 0–2 the cells are sensitive to tested compounds, RI from the range 2–10 means that the cells show moderate sensitivity to a drug, RI above indicates strong drug-resistance. The SI index was calculated for each compound from the formula: $SI = IC_{50}$ for normal cell line (BALB/3T3) / IC for respective cancerous cell line. A beneficial $SI > 1.00$ indicates a drug with efficacy towards cancer cells greater than toxicity against normal cells.

UWAGI KOŃCOWE

Strategia syntezy biokoniugatów, w ramach której antybiotyki jonoforowe będą kowalencyjnie związane z innymi biologicznie aktywnymi związkami, jest niezwykle atrakcyjnym kierunkiem badań. Jej rezultatem jest tworzenie hybryd o najróżniejszych strukturach chemicznych. Wszystkie opisane w tym artykule biokoniugaty można otrzymać ze stosunkowo dobrą wydajnością przy użyciu standardowych procedur syntetycznych, takich jak: reakcja amidowania lub esteryfikacji w łagodnych warunkach czy też reakcja 1,3-dipolarnej cykloaddycji Huisgena katalizowana jonami miedzi(I).

Wyniki badań aktywności biologicznej otrzymanych hybryd wyraźnie wskazują, że właściwości przeciwbakteryjne i przeciwnowotworowe biokoniugatów monenzyny oraz salinomycyny ściśle zależą od budowy uzyskanych hybryd, na przykład od stabilności chemicznej i enzymatycznej wiązań tworzących się pomiędzy dwoma biokomponentami.

Racjonalne projektowanie biokoniugatów antybiotyków jonoforowych zaowocować może otrzymaniem wysoce aktywnych biologicznie hybryd, które mogą być niezwykle skuteczne w walce z infekcjami bakteryjnymi oraz nowotworami. Większość tego typu związków selektywnie przełamuje lekooporność komórek nowotworowych, gdy zastosować je w mikromolowych stężeniach, co pokazuje ich wysoki potencjał terapeutyczny. Ponadto, hybrydy antybiotyków jonoforowych hamują wzrost bakterii Gram-dodatnich, w tym tych opornych na działanie innych antybiotyków, co jednoznacznie dowodzi, że tego typu związki mogą być stosowane w najbliższej przyszłości nie tylko w medycynie weterynaryjnej, ale również jako środki chemioterapeutyczne i przeciwbakteryjne w leczeniu ludzi.

Naszym zdaniem, strategia tworzenia funkcjonalnych hybryd w procesie biokoniugacji będzie odgrywać w najbliższej przyszłości coraz większą rolę. Racjonalne projektowanie i synteza różnorodnych biokoniugatów, w tym wybór optymalnych struktur wyjściowych (biokomponentów), może prowadzić między innymi do skutecznej ochrony labilnych produktów przed enzymatyczną degradacją, do wydłużenia czasu ich przebywania w organizmie czy też do znalezienia wysoce specyficznych środków diagnostycznych i terapeutycznych. Niezwykle obiecujące wyniki opisanych w tym artykule badań sprawiają, że nowe metody biokoniugacji będą z pewnością dalej intensywnie realizowane w naszej grupie badawczej.

PODZIĘKOWANIE

Michał Antoszczak pragnie podziękować Narodowemu Centrum Nauki (NCN) za wsparcie finansowe udzielone w ramach grantu Sonata 12 o numerze 2016/23/D/ST5/00242.

Nasze badania koniugatów antybiotyków jonoforowych realizowane były w ramach projektu pt. „Synteza, badania strukturalne, aktywność przeciwbakterijna oraz przeciwnowotworowa biokoniugatów antybiotyków jonoforowych” (projekt Iuventus Plus o numerze IP2012013272 finansowany przez MNiSW).

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] World Health Organization – Cancer, [dostęp: 2018-01-31]. Dostępny w Internecie: <http://www.who.int/cancer/en/>
- [2] V.T. DeVita Jr., E. Chu, *Cancer Res.*, 2008, **68**, 8643.
- [3] B.A. Chabner, T.G. Roberts, *Nat. Rev. Cancer*, 2005, **5**, 65.
- [4] The Center for Disease Dynamics, Economics & Policy – raporty, [dostęp: 2018-01-31]. Dostępny w Internecie: <http://www.cddep.org>
- [5] B. Das, G. Satyalakshmi, *Mini-Rev. Org. Chem.*, 2012, **9**, 169.
- [6] G.M. Cragg, P.G. Grothaus, D.J. Newman, *Chem. Rev.*, 2009, **109**, 3012.
- [7] D.J. Newman, G.M. Cragg, K.M. Snader, *J. Nat. Prod.*, 2003, **66**, 1022.
- [8] A. Agtarap, J.W. Chamberlin, M. Pinkerton, L. Steinrauf, *J. Am. Chem. Soc.*, 1967, **89**, 5737.
- [9] T. Fukuyama, K. Akasaka, D.S. Karanewsky, C.L.J. Wang, G. Schmid, Y. Kishi, *J. Am. Chem. Soc.*, 1979, **101**, 262.
- [10] Y. Miyazaki, M. Shibuya, H. Sugawara, O. Kawaguchi, C. Hirsoe, *J. Antibiot.*, 1974, **27**, 814.
- [11] Y. Kishi, S. Hatakeyama, M.D. Lewis, *Total synthesis of polyether antibiotics narasin and salinomycin*, [w:] *Frontiers of Chemistry*, [w:] Plenary and Keynote Lectures Presented at the 28th IUPAC Congress, K.J. Laidler (Red.), Oxford 1982, str. 287.
- [12] P.J. Kocieński, R.C.D. Brown, A. Pommier, M. Procter, B. Schmidt, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, 1998, **1**, 9.
- [13] M.E. Yurkovich, P.A. Tyrakis, H. Hong, Y. Sun, M. Samborskyy, K. Kamiya, P.F. Leadley, *Chem. Bio. Chem.*, 2012, **13**, 66.
- [14] M. Suzuki, R. Ueoka, K. Takada, S. Okada, S. Ohtsuka, Y. Ise, S. Matsunaga, *J. Nat. Prod.*, 2012, **75**, 1192.
- [15] D.H Berg, R.L. Hamill, *J. Antibiot.*, 1978, **31**, 1.
- [16] J. Rutkowski, B. Brzezinski, *BioMed. Res. Int.*, 2013, **2013**, 31
- [17] M. Antoszczak, J. Rutkowski, A. Huczyński, *Structure and biological activity of polyether ionophores and their semi-synthetic derivatives*, [w:] *Bioactive Natural Products. Chemistry and Biology*, G. Brahmachari (Red.), 1st Edition, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim 2015, s. 107.
- [18] Y.N. Antonenko, T.I. Rokitskaya, A. Huczyński, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.*, 2015, **1848**, 995.
- [19] A. Huczyński, J. Janczak, D. Łowicki, B. Brzezinski, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.*, 2012, **1818**, 2108.
- [20] A. Huczyński, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2012, **22**, 7002.
- [21] S. Zhou, F. Wang, E.T. Wong, E. Fonkem, T.-C. Hsieh, J.M. Wu, E. Wu, *Curr. Med. Chem.*, 2013, **20**, 4095.

- [22] D.A. Kevin II, D.A.F. Meujo, M.T. Hamann, *Exp. Opin. Drug Disc.*, 2009, **4**, 109.
- [23] J.W. Westley, *Adv. Appl. Microbiol.*, 1977, **22**, 177.
- [24] J. Guyot, G. Jeminet, M. Prudhomme, M. Sancelme, R. Meinier, *Lett. Appl. Microbiol.*, 1993, **16**, 192.
- [25] M. Mimouni, F.Z. Khardli, I. Warad, M. Ahmad, M.S. Mubarak, S. Sultana, T.B. Hadda, J. Mater. Environ. Sci., 2014, **5**, 207.
- [26] G.K. Podila, E. Rosen, M.J.D. San Fransisco, P.E. Kolattukudy, *Phytopathology*, 1995, **85**, 238.
- [27] D.C. Johnson, P.G. Spear, J. Virol., 1982, **43**, 1102.
- [28] R. Schlegel, M. Willingham, I. Pastan, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1981, **102**, 992.
- [29] M. Marsh, J. Wellsteed, H. Kerm, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1982, **79**, 5297.
- [30] M. Nakamura, S. Kunimoto, Y. Takahashi, H. Naganawa, M. Sakaue, S. Inoue, T. Ohno, T. Takeuchi, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1992, **36**, 492.
- [31] C. Gumila, M.L. Ancelin, G. Jeminet, A.M. Delort, G. Miquel, H.J. Vial, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1996, **40**, 602.
- [32] J. Adovelande, J. Schrevel, *Life Sci.*, 1996, **59**, 309.
- [33] C.M. Liu, T.E. Hermann, A. Downey, B.T. Prosser, E. Schildknecht, H.J. Palleroni, J.W. Westley, P.A. Miller, *J. Antibiot.*, 1983, **36**, 343.
- [34] K. Ketola, P. Vainio, V. Fey, O. Kallioniemi, K. Iljin, *Mol. Cancer Ther.*, 2010, **9**, 3175.
- [35] W.H. Park, E.S. Kim, B.K. Kim, Y.Y. Lee, *Int. J. Oncol.*, 2003, **23**, 197.
- [36] W.H. Park, E.S. Kim, C.W. Jung, B.K. Kim, Y.Y. Lee, *Int. J. Oncol.*, 2003, **22**, 377.
- [37] W.H. Park, J.G. Seol, E.S. Kim, W.K. Kang, Y.H. Im, C.W. Jung, B.K. Kim, Y.Y. Lee, *Br. J. Haematol.*, 2002, **119**, 400.
- [38] M.J. Yoon, Y.J. Kang, I.Y. Kim, E.H. Kim, J.A. Lee, J.H. Lim, T.K. Kwon, K.S. Choi, *Carcinogenesis*, 2013, **34**, 1918.
- [39] M.S. Shaik, A. Chatterjee, M. Singh, *J. Pharm. Pharmacol.*, 2004, **56**, 899.
- [40] M. Singh, A.J. Ferdous, N. Kanikkannan, G. Faulkner, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2001, **52**, 13.
- [41] L.V. Nguyen, R. Vanner, P. Dirks, C.J. Eaves, *Nat. Rev. Cancer*, 2012, **12**, 133.
- [42] P.B. Gupta, T.T. Onder, G. Jiang, K. Tao, C. Kuperwasser, R.A. Weinberg, E.S. Lander, *Cell*, 2009, **138**, 645.
- [43] M. Antoszczak, A. Huczyński, *Anticancer Agents Med. Chem.*, 2015, **15**, 575.
- [44] C. Naujokat, R. Steinhart, *R. J. Biomed. Biotechnol.*, 2012, **2012**, 950968.
- [45] J.E. Lutz, Z. Zarafshani, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2008, **60**, 958.
- [46] G.R. Zimmermann, J. Lehra, C.T. Keith, *Drug Discovery Today*, 2007, **12**, 34.
- [47] J. Sakakibara, A. Nakamura, S.-I. Nagai, T. Ueda, T. Ishida, *Chem. Pharm. Bull.*, 1988, **36**, 4776.
- [48] A. Nakamura, S.-I. Nagai, T. Ueda, N. Murakami, J. Sakakibara, H. Shibuya, I. Kitagawa, *Chem. Pharm. Bull.*, 1991, **39**, 1726.
- [49] M. Antoszczak, M. Sobusiaik, E. Maj, J. Wietrzyk, A. Huczyński, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2015, **25**, 3511.
- [50] I. Skiera, M. Antoszczak, J. Trynda, J. Wietrzyk, P. Boratyński, K. Kacprzak, A. Huczyński, *Chem. Biol. Drug Des.*, 2015, **86**, 911.
- [51] M. Antoszczak, G. Klejborowska, M. Kruszyk, E. Maj, J. Wietrzyk, A. Huczyński, *Chem. Biol. Drug Des.*, 2015, **86**, 1378.
- [52] A. Huczyński, M. Antoszczak, N. Kleczewska, D. Baraniak, E. Maj, J. Stefańska, J. Wietrzyk, J. Janczak, L. Celewicz, *Eur. J. Med. Chem.*, 2015, **93**, 33.
- [53] M. Antoszczak, E. Maj, N. Kleczewska, J. Wietrzyk, L. Celewicz, A. Huczyński, *Med. Chem.*, 2017, **13**, 127.
- [54] B.S. Vig, K.M. Huttunen, K. Laine, J. Rautio, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2013, **65**, 1370.
- [55] Y. Zhou, C. Liang, F. Xue, W. Chen, X. Zhi, X. Feng, X. Bai, T. Liang, *T. Oncotarget*, 2015, **6**, 10350.

- [56] W.G. Harker, D.L. Slade, W.S. Dalton, P.S. Meltzer, J.M. Trent, *Cancer Res.*, 1989, **49**, 4542.
- [57] R.B. Badisa, S.F. Darling-Reed, P. Joseph, J.S. Cooperwood, L.M. Latinwo, C.B. Goldman, *Anticancer Res.*, 2009, **29**, 2993.
- [58] O. Warburg, *Science*, 1956, **123**, 309.
- [59] K. Kacprzak, *Chemistry and biology of Cinchona alkaloids*, [w:] *Handbook of Natural Products – Phytochemistry, Botany, Metabolism*, K.G. Ramawat, J.M. Merillon (Red.), Heidelberg: Springer Berlin 2013, s. 605.
- [60] E. Solary, L. Mannone, D. Moreau, D. Caillot, R.O. Casasnovas, H. Guy, M. Grandjean, J.E. Wolf, F. André, P. Fenaux, P. Canal, B. Chauffert, A. Wotawa, M. Bayssas, P. Genne, *Leukemia*, 2000, **14**, 2085.
- [61] D. Baraniak, K. Kacprzak, L. Celewicz, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2011, **21**, 723.
- [62] D.Y. Lee, Y. Liu, *J. Nat. Prod.*, 2003, **66**, 1171.
- [63] G. Serviddio, F. Bellanti, E. Stanca, P. Lunetti, M. Blonda, R. Tamborra, L. Siculella, G. Vendemiale, L. Capobianco, A.M. Giudetti, *Free Radic. Biol. Med.*, 2014, **73**, 117.
- [64] R. Gázaák, D. Walterová, V. Křen, *Curr. Med. Chem.*, 2007, **14**, 315.
- [65] A. Zarelli, V. Romanucci, C. Tuccillo, A. Federico, C. Loguercio, R. Gravante, G. Di Fabio, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2014, **24**, 5147.
- [66] R. Gazák, K. Purchartová, P. Marhol, L. Živná, P. Sedmera, K. Valentová, N. Kato, H. Matsumura, K. Kaihatsu, V. Křen, *Eur. J. Med. Chem.*, 2010, **45**, 1059.
- [67] M. Rooseboom, J.N. Commandeur, N.P. Vermeulen, *Pharmacol. Rev.*, 2004, **56**, 53.
- [68] D.G. Power, N.E. Kemeny, *Mol. Cancer Ther.*, 2009, **8**, 1015.
- [69] F. Wang, W. Dai, Y. Wang, M. Shen, K. Chen, P. Cheng, Y. Zhang, C. Wang, J. Li, Y. Zheng, J. Lu, J. Yang, R. Zhu, H. Zhang, Y. Zhou, L. Xu, C. Guo, *PLoS One*, 2014, **9**, e97414.
- [70] R. Yarchoan, H. Mitsuya, C.E. Myers, S.N. Broder, *Eng. J. Med.*, 1989, **232**, 726.
- [71] C. Carbon, *Clin. Microbiol. Infect.*, 2000, **6**, 17.
- [72] A.L. Simplicio, J.M. Clancy, J.F. Gilmer, *Molecules*, 2008, **13**, 519.

Praca wpynęła do Redakcji 5 lutego 2018

PODZIAŁ KLEJÓW ROZPUSZCZALNYCH W WODZIE ZE WZGLĘDU NA POCHODZENIE

CLASSIFICATION OF WATER-SOLUBLE ADHESIVES ACCORDING TO ORIGIN

Karolina Mozelewska*, Zbigniew Czech

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

Abstract

Wstęp

1. Rozpuszczalne w wodzie polimery naturalne i syntetyczne

2. Kleje naturalne rozpuszczalne w wodzie

3. Kleje syntetyczne rozpuszczalne w wodzie

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane



Mgr inż. Karolina Mozelewska w roku 2017 ukończyła studia na Wydziale Technologii i Inżynierii Chemicznej Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie. Obecnie jest doktorantką w Instytucie Technologii Chemicznej Organicznej ZUT w Szczecinie. Specjalność – akrylanowe kleje samoprzylepne.

Prof. dr hab. inż. Zbigniew Czech jest kierownikiem Międzynarodowego laboratorium Klejów i Materiałów Samoprzylepnych Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie. Jest absolwentem Politechniki Szczecińskiej, doktorat ukończył w 1981 r. Od tego czasu zatrudniony w Firmach: Lohmann (Niemcy), UCB (Belgia), oraz Chemitec (Niemcy). Habilitację otrzymał w 2004 r.

ABSTRACT

Self-adhesive adhesives have been known since 1935. Since then, many categories of their division have been distinguished, depending on their origin, state of aggregation, operating conditions, obtaining, chemical base or binding mechanism, as well as many other properties. The main is their application in natural and synthetic adhesives, that is due to the origin of the high molecular weight compounds used for their production. The following work describes the types of water-soluble natural and synthetic adhesives. In recent centuries, there has been a decline in the use of natural polymers for the synthesis of water-soluble pressure sensitive adhesives. This is due to the spread of cheaper products from petrochemical resources, but also better properties that they characterize. For their polymerization, synthetic monomers which hydrophilic groups (hydroxyl, amide or carboxyl) are used. These groups, in the further reaction stage, after polymerisation, give the possibility of cross-linking of the pressure-sensitive adhesive.

Polyacrylate based adhesives are among the most commonly used adhesives. It is forecasted that the demand for such adhesives will increase on average by 2.9% per annum. Dispersive, water-soluble, self-adhesive adhesives and those in which the solvent is water also play an increasingly important role. This happens as a result of legal requirements, but also greater public awareness of ecology.

Keywords: pressure-sensitive adhesives, natural and synthetic adhesives, water-soluble adhesives

Słowa kluczowe: kleje samoprzylepne, kleje naturalne i syntetyczne, kleje rozpuszczalne w wodzie

WSTĘP

Kleje samoprzylepne znane są już od lat 30. ubiegłego wieku. Od tamtej pory wyodrębniono wiele kategorii ich podziału ze względu na pochodzenie, stan skupienia, warunki eksploatacji, sposób otrzymywania, bazę chemiczną oraz mechanizm wiązania. Zasadniczo kleje dzieli się na naturalne i syntetyczne, co związane jest z pochodzeniem związków wielkocząsteczkowych stosowanych do ich produkcji. Można sklasyfikować je również jako organiczne i nieorganiczne, a z tych z kolei można wyodrębnić kleje, biorąc pod uwagę rodzaj monomerów. Kleje dzieli się także ze względu na stan skupienia tj. ciekłe i stałe oraz ze względu na mechanizm wiązania - sieciujące fizycznie i chemicznie. Wiązanie fizyczne może odbywać się poprzez odparowanie rozpuszczalnika organicznego o niskiej temperaturze wrzenia (np. octan etylu, heksan, aceton), a chemiczny mechanizm wiązania polega na tworzeniuwiązań chemicznych w wyniku reakcji polimeryzacji wolnorodnikowej, oraz polimeryzacji stopniowej: poliaddycji lub polikondensacji. Kleje samoprzylepne powinny zachowywać niezmienne właściwości klejące zarówno w temperaturze pokojowej, jak i w podwyższonej, co pozwala na kolejną klasyfikację ze względu na warunki pracy. Bardzo często wyodrębnia się również kleje dyspersyjne, rozpuszczalnikowe oraz bezrozpuszczalnikowe, czyli dzieli się je ze względu na proces ich otrzymywania. W klejach dyspersyjnych cząsteczki polimeru zdyspergowane są w wodzie, a mechanizm utwardzenia może polegać na jej odparowaniu. Kleje rozpuszczalnikowe otrzymywane są w obecności rozpuszczalnika organicznego, który służy do regulacji lepkości i konsystencji kleju, a rozpuszczalnik odparowuje po naniesieniu kleju na podłoże. Samoprzylepne kleje bezrozpuszczalnikowe otrzymuje się z kleju rozpuszczalnikowego po oddestylowaniu części lotnych (głównie rozpuszczalnika) pod obniżonym ciśnieniem. W niniejszej pracy opisano rodzaje rozpuszczalnych w wodzie klejów naturalnych oraz syntetycznych [1, 2].

1. ROZPUSZCZALNE W WODZIE POLIMERY NATURALNE I SYNTETYCZNE

Polimery stosowane jako substancję klejotwórczą możemy podzielić ze względu pochodzenia na naturalne (zwierzęce i roślinne) oraz syntetyczne. Naturalnymi polimerami są: albumina, kazeina, wosk pszczeli, klej zwierzęcy, szelak, guma arabska, kalafonia, guma tragancka, balsam kanadyjski, oleje i woski, węglowodany, białka sojowe, woski i żywice mineralne, krzemiany, kauczuk naturalny i jego pochodne. Jednak nie wszystkie z nich rozpuszczają się w wodzie. Surowcami rozpuszczalnymi w wodzie są: albumina, glutyna, kazeina, skrobia, żelatyna, dekstryny i metyloceluloza [3].

Kleje na bazie surowców naturalnych rozpuszczalnych w wodzie, ze względu na niską wytrzymałość spoiny klejowej, niską odporność na starzenie oraz na warunki biologiczne i chemiczne. Słabą odporność na wodę oraz trudność aplikacji zostały

zastąpione surowcami syntetycznymi [4, 5]. Do najpopularniejszych należą: syntetyczne kauczuki, poliakrylany, silikony, poliestry, poliuretany, oraz kopolimery etylenu/octanu winylu (EVA). W przemyśle największą rolę odgrywają cztery pierwsze grupy wyżej wymienionych polimerów syntetycznych [6]. Co ważne, tylko nieliczne ze wskazanych polimerów syntetycznych są rozpuszczalne w wodzie. Niektóre z polimerów, mimo tego, że są rozpuszczalne w wodzie nie znalazły zastosowania na rynku klejów samoprzylepnych. Należą do nich poli(eter winylowo-metylowy) oraz poliwinylopirolidon [7]. Znany jest również klej termotopliwy, otrzymany poprzez zmieszanie polimeru rozpuszczalnego w wodzie i nierozpuszczalnego w wodzie z co najmniej jednym alkoholem sacharydowym [8]. Znane są także kleje rozpuszczalne w wodzie na bazie mieszaniny polimerów naturalnych (dekstryny i skrobi) z polimerami syntetycznymi (karboksymetylocelulozą i poli(alkoholem winylowym)) lub na bazie polietylooksazoliny [9 10]. W skali laboratoryjnej badane są również mieszaniny katecholu, czyli *o*-dihydroksybenzenu z różnymi związkami, np. chitonanem [11, 12].

2. KLEJE NATURALNE ROZPUSZCZALNE W WODZIE

Kleje kazeinowe, albuminowe i glutynowe są klejami pochodzenia zwierzęcego. Substancją wiążącą jest w tym przypadku białko zwierzęce, zapewniające im dobre właściwości (wysoką wytrzymałość, trwałość, elastyczność i odporność na obciążenia). W porównaniu do klejów syntetycznych posiadają one wysoką wytrzymałość, której nie obniża nawet większa grubość złącza. Są one natomiast podatne na korozję i posiadają niską odporność na wodę. Stosowane są one głównie przy renowacjach zabytkowych mebli [5].

Klej zwierzęcy opiera się na kolagenie. Można go otrzymać z kości lub ze skóry zwierząt. Poprzez ekstrakcję białka wodą, a następnie jego suszenie można otrzymać różne mieszanki kleju. Kolagen jest zbudowany z 19 różnych kwasów L-amino-karboksylowych które zakończone są grupą karboksylową lub aminową [13]. Klej zwierzęcy jest nierozpuszczalny w rozpuszczalnikach organicznych, natomiast rozpuszczalny w wodzie. Wyroby wykonane z jego użyciem nie mogą być jednak przechowywane w pomieszczeniach wilgotnych, ponieważ kleje te nie wykazują wysokiej odporności na wilgoć, której efektem może być pleśń [5].

Kleje glutynowe zbudowane są na bazie glutyny i w związku z jej pochodzeniem wyróżnia się kleje kostne, rybie oraz skórne. Glutyna nie rozpuszcza się w zimnej wodzie, jednak po ogrzaniu jest w niej rozpuszczalna. Po utracie rozpuszczalnika i ochłodzeniu zestala się. Klej glutynowy otrzymuje się w dwóch etapach: stały klej moczy się przez 24 h w zimnej wodzie, następnie w celu rozpuszczenia białka roztwór podgrzewa się do 60°C.

Klej jest aplikowany na ciepło, ponieważ jego lepkość rośnie wraz ze spadkiem temperatury. Kleje tego typu degradują w stosunkowo niskiej temperaturze (60–70°C), nie są odporne na wilgoć i wodę, ale nie starzeją się i mają dobre właści-

wości akustyczne. Stosowane są do konserwacji mebli oraz do produkcji instrumentów muzycznych [5].

Klej kazeinowy wytwarzany jest z białka, które występuje w mleku zwierzęcym w formie kazeinianu wapnia. Z uwagi na silne wiązania wodorowe wolna kazeina nie rozpuszcza się w wodzie i w związkach z tym, podczas przygotowania rozpuszcza się ją w roztworze wodorotlenków lub zasadowych soli. Roztwory te mają dobre właściwości wiążące, dużą lepkość, natomiast nie są odporne na wilgoć, a jeżeli są, to z kolei są mało trwałe. W związkach z tym stosuje się mieszaniny kazeinianu wapnia z węglanem sodu, lub wodorotlenkiem. Kleje te można stosować zarówno na zimno, jak i w podwyższonej temperaturze [5, 14].

Zaletami tych klejów jest to, że można je stosować w temperaturze nieznacznie powyżej 0°C oraz ich wysoka wytrzymałość mechaniczna i termiczna. Mankamentem jest jednak ich mała odporność na mikroorganizmy oraz wysoka zawartość wody. Są one stosowane do klejenia drewna, papieru, produktów z tekstury, do etykietowania szklanych opakowań oraz przy produkcji farb [5, 14].

Kolejnym rodzajem kleju zwierzęcego jest klej albuminowy, otrzymany z krwi zwierzęcej. Przygotowując tego typu klej, moczy się sproszkowaną krew w wodzie, a następnie dodaje wodorotlenek wapnia. Oprócz tego albumina jest stosowana przy produkcji klejów fenolowo-formaldehydowych, co ma na celu obniżenie ich temperatury utwardzania [5, 15].

Kleje pochodzenia roślinnego są stosowane w technologii klejenia materiałów porowatych, przykładowo do tkanin czy papieru. Z roślin wydzielane są substancje wielkocząsteczkowe tworzące koloidy i roztwory o wysokiej lepkości [16].

Klej skrobiowy oparty jest na skrobi, czyli na bazie polisacharydu, występującego w dużych ilościach w zbożach (ziarna kukurydzy, ryżu, pszenicy) oraz ziemniakach. Skrobia modyfikowana termicznie to dekstryna. Naturalna skrobia istnieje w postaci granulek, które nie rozpuszczają się w zimnej wodzie. W związkach z tym przeprowadza się pęcznienie w temperaturze 40–45°C, a następnie proces kiełkowania w 65–80°C. Tak otrzymany żel skrobiowy jest rozpuszczalny w wodzie i ulega zestaleniu w temperaturze pokojowej [5, 17]. W celu otrzymania kleju dekstrynowego rozpuszcza się dekstrynę w wodzie o temperaturze 80–85°C. W stosunku do klejów skrobiowych, kleje dekstrynowe zawierają większą ilość części stałych, co powoduje krótszy czas zasychnania. Charakteryzują się wysoką adhezją w stosunku do materiałów porowatych, jednak są mało odporne na wodę. Kleje skrobiowe i dekstrynowe nie są odporne na działanie mikroorganizmów, w związku z tym dodaje się do nich środki zabezpieczające, np. kwas salicylowy lub benzoesowy [18]. Mimo tak dużej dominacji klejów syntetycznych, kleje naturalne są nadal stosowane w produkcji opakowań i w włókiennictwie [5]. Dekstryny prażone wykorzystuje się także do kopert i znaczków pocztowych. Skrobię często dodaje się również do klejów syntetycznych w celu poprawienia ich właściwości. Jest ona również stosowana jako rozcieńczalnik, nie tylko aby zmniejszyć koszty produkcji, ale także wpływając korzystnie na oddziaływanie pomiędzy cząsteczkami [19].

Celuloza jest liniowym, stereoregularnym polisacharydem, którego merem (pojedynczą jednostką powtarzalną) jest D-glukoza, z dużą ilością grup hydroksylowych oraz z wieloma wiązaniami wodorowymi między łańcuchami. W związku z tym, nie rozpuszcza się ona w większości rozpuszczalników, co powoduje, że w technologii klejów stosowane są jej pochodne, zazwyczaj są to estry alifatycznych bezwodników i kwasów. Estry te odznaczają się wysoką lepkością i wodorozpuszczalnością. Stosuje się je jako kleje topliwe oraz w przemyśle papierniczym i opakowaniowym [17, 20].

3. KLEJE SYNTETYCZNE ROZPUSZCZALNE W WODZIE

Ze względu na słabe właściwości klejów wykonanych z monomerów naturalnych w technologii produkcji klejów stosuje się głównie monomery syntetyczne. Na rynku międzynarodowym istnieje wiele klejów samoprzylepnych, o bardzo dobrych właściwościach, jednak nie są one rozpuszczalne w wodzie. Dzieje się tak, ponieważ przy otrzymywaniu kleju rozpuszczalnego w wodzie należy zastosować także monomer rozpuszczalny w wodzie, a tych jest stosunkowo niewiele. Oprócz obecności grup hydrofilowych (głównie hydroksylowej i aminowej), które w późniejszym etapie umożliwiają sieciowanie kleju, powinny one łatwo poddawać się procesowi modyfikacji. Właśnie dlatego do produkcji klejów rozpuszczalnych w wodzie stosuje się głównie akrylany, czyli poli(estry akrylanowe). Cechują się one wysoką kohezją i adhezją, dużą przyczepnością do metali i papieru, są odporne na starzenie i co najważniejsze, po modyfikacji rozpuszczalne w wodzie w szerokim zakresie pH. Poliakrylany są również odporne na działanie promieniowania ultrafioletowego, ozonu oraz tlenu. Oprócz dobrej przyczepności do skóry poliakrylany są biozgodne i kompatybilne z substancjami pomocniczymi w przemyśle farmaceutycznym, oraz z samymi farmaceutykami. Poliakrylany cechują się niską temperaturą zeszklenia (T_g), wynoszącą od -70 do -20°C . Dodatkowo są samoprzylepne z natury. Aby zapewnić przylepność, nie potrzebują zastosowania plastyfikatorów ani żywic. Ponadto, polimery akrylanowe dają się łatwo modyfikować w trakcie reakcji kopolimeryzacji. Pożądane właściwości fizyczne końcowego produktu, uzyskuje się poprzez wybór i proporcję monomerów użytych do syntezy. Łatwo można także kontrolować stopień usieciowania i masę cząsteczkową otrzymanego polimeru. Istnieje także możliwość polepszenia właściwości otrzymanych klejów, poprzez dodatek różnych związków chemicznych. Każdy z monomerów użytych do syntezy rozpuszczalnych w wodzie klejów samoprzylepnych spełnia określone funkcje i nadaje produktowi polimerowemu określone właściwości, przykładowo: alifatyczne akrylany, zawierające 4–12 atomów węgla i posiadające niską temperaturę zeszklenia nadają klejom samoprzylepne właściwości. Hydroksyakrylany dodawane są w celu zwiększenia wytrzymałości termicznej i mechanicznej, natomiast nienasycone kwasy karboksylowe tworzą centra aktywne, niezbędne podczas sieciowania oraz stanowią rozpuszczalną w wodzie część kopolimeru. W związku z tym liczba surow-

ców, które mogą zostać zastosowane do produkcji rozpuszczalnych w wodzie klejów samoprzylepnych jest ograniczona [21, 7]. Produkcja klejów samoprzylepnych na bazie poliakrylanów ma miejsce podczas kopolimeryzacji kwasu akrylowego oraz jego estrów [4, 22-25].

PODSUMOWANIE

W ciągu ostatnich stuleci obserwuje się spadek wykorzystania polimerów naturalnych do syntez rozpuszczalnych w wodzie klejów samoprzylepnych. Jest to spowodowane rozpowszechnieniem się tańszych produktów z zasobów petrochemicznych, ale również lepszymi właściwościami, którymi się one charakteryzują. Do ich polimeryzacji stosuje się więc monomery syntetyczne, które zawierają w swoim łańcuchu grupy hydrofilowe (hydroksylowa, amidowa czy też karboksylowa). Grupy te, w dalszym etapie reakcji, po polimeryzacji, dają możliwość sieciowania kleju samoprzylepnego.

Kleje na bazie poliakrylanów należą do najczęściej stosowanych klejów. Prognozuje się, że zapotrzebowanie na tego typu kleje wzrastać będzie średnio o 2,9% w skali roku. Coraz większą rolę odgrywają również kleje samoprzylepne dyspergowane w wodzie, rozpuszczalne w wodzie oraz te, w których rozpuszczalnikiem jest woda. Dzieje się tak w wyniku wymagań prawnych, ale także większej świadomości społeczeństwa dotyczącej ekologii.

Kleje wodorozpuszczalne na bazie poliakrylanów stosowane są jako etykiety, taśmy samoprzylepne, bioelektrody lub taśmy operacyjne. Ponadto, w przemyśle papierniczym służą do łączenia bel papieru.. Hydrofilowe nierożpuszczalne w wodzie kleje są często stosowane do produkcji superabsorbentów oraz hydrożeli.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] M. Polkowski, *Acta Poligraphica*, 2015, **6**, 19.
- [2] A. Antosik, Z. Czech, *Wiad. Chem.*, 2015, **1-2**, 111.
- [3] T. Spychaj, S. Spychaj, *Farby i kleje wodorozcieńczalne*, WNT, Warszawa 1996.
- [4] Z. Czech, H. Loclair, *Polimery*, 2005, **50**, 64.
- [5] J. Sedliačík, M. Mamiński, *Kleje i procesy klejenia*, SGGW, Warszawa 2016.
- [6] Z. Czech, A. Kowalczyk, J. Swiderska, *Wide Spectra Qual. Control*, 2011, **7**, 309.
- [7] Z. Czech, A. Malec. *Przem. Chem.*, 2006, **11**, 1488.
- [8] T. Möller, H. Buxhofer, D. Cavalli, Henkel KGaA, PL/EP1664229, 2006.
- [9] Z. Yuelong, CN101676345, 2010.
- [10] A. Hanrot, US8119732 B, 2012.
- [11] K. Kyuri, R. Ji Hyun, L. Dong Yun, L. Haeshin, *RSC*, 2013, **1**, 783.
- [12] A.M. Shabeer, C.S. Leton, J. Joonkyung, W. Lu, G. Xingfa, N. Shigeru, *J. Phys. Chem. C*, 2010, **114** (48), 20793.
- [13] W. Lasek, *Kolagen*, WNT, Warszawa 1978.
- [14] J.F. Rabek, *Polimery Otrzymywanie, metody badawcze, zastosowanie*, PWN, Warszawa 2013

- [15] J. Czaplicki, J. Ćwikliński, J. Godzimirski, P. Konar, *Klejenie tworzyw konstrukcyjnych*, WKŁ, Warszawa 1987.
- [16] M. Mamiński, R. Toczyłowska-Mamińska, *Handbook of composites from renewable materials*, Wiley, str. 151.
- [17] C.V. Cagle, *Kleje i klejenie poradnik inżyniera i technika*, WNT, Warszawa 1977.
- [18] L. Prawdzińska, H. Zygmunt, *Informator o klejach*, Biuro Wydawnicze Chemia, Warszawa 1972
- [19] T. Günther, *Skrobia i jej pochodne*, PTTŻ, Kraków 2010.
- [20] W. Szlezyniec, Z.K. Brzozowski, *Tworzywa Sztuczne, Tom 2: Polimery specjalne i inżynierijne*, Wyd. Oświatowe FOSZE, Rzeszów 2012.
- [21] B. Duncan, S. Abbott, R. Roberts, *Measurement good practice guide no. 26: Adhesive tack*, NPL, 1999.
- [22] Z. Czech, A. Kowalski, E. Madejska, U. Głuch, J. Ortyl, ABID, 2011, 2, 7.
- [23] Z. Czech, D. Sowa, *Adhesion of pressure-sensitive adhesives : especially of solvent-based acrylic PSA*, West Pomeranian University of Technology, Publishing House, Szczecin, 2016.
- [24] H. Tan, W. Pfister, PST, 1999, 2, 60.
- [25] J. Erwin, K. Massow, S. Zollner, US8519076 B2, 2013.

Praca wpłynęła do Redakcji 4 stycznia 2018

ELEKTROFOREZA SWOBODNA Z PRZEPŁYWEM HYDRODYNAMICZNYM – PODSTAWY TEORETYCZNE I ROZWIĄZANIA TECHNICZNE FREE FLOW ELECTROPHORESIS – THEORY AND TECHNOLOGY

Piotr Hoda*, Beata Polak, Tadeusz H. Dzido

*Zakład Chemii Fizycznej, Katedra Chemii, Uniwersytet Medyczny w Lublinie
ul. Chodźki 4A, 20-093 Lublin
e-mail: piotr.hoda@gmail.com

Abstract

Wprowadzenie

1. Podstawy teoretyczne
2. Rozwiązania techniczne

- 2.1. Pierwsze urządzenia do elektroforezy swobodnej z przepływem i ich dalszy rozwój
- 2.2. Urządzenia z recyrkulującym przepływem buforu podstawowego
- 2.3. Elektroforezery wieloprzedziałowe
- 2.4. Urządzenia o symetrii radialnej
- 2.5. Miniaturyzacja

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane

Piotr Hoda, absolwent kierunku farmacja (specjalność lek roślinny) Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Lublinie. W 2017 roku obronił z wyróżnieniem pracę magisterską „Rozdzielenie mikropreparatywne wybranych diastereoizomerów techniką ortogonalnej elektrochromatografii planarnej ciśnieniowej”.

Beata Polak, ukończyła studia na Wydziale Farmaceutycznym Akademii Medycznej (obecny Uniwersytet Medyczny) w Lublinie w 1990 roku, od tego roku też rozpoczęła pracę w Katedrze Chemii Nieorganicznej i Analytycznej na tymże Uniwersytecie. Uzyskała stopnie naukowe: doktora nauk farmaceutycznych – 1998 r., doktora habilitowanego nauk farmaceutycznych – 2017 r. Od 1999 roku jest adiunktem w Zakładzie Chemii Fizycznej Katedry Chemii. Jej zainteresowania naukowe to rozdzielenie związków wykazujących aktywność biologiczną ze szczególnym uwzględnieniem rozdzielania izomerów i stereoizomerów. Jej dorobek naukowy to około 40 artykułów naukowych i rozdziałów w książkach.

Tadeusz H. Dzido, prof. zw. Uniwersytetu Medycznego w Lublinie, ukończył studia chemiczne w Uniwersytecie Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie w 1973 r. Uzyskał stopnie naukowe: doktora n. chemicznych – 1980 r., doktora habilitowanego n. chemicznych – 2003 r., oraz tytuł profesora n. farmaceutycznych – 2012 r. Odbył staże naukowe w Uniwersytecie Wiedeńskim, 1981/82 jako stypendysta Fundacji SEA i w Uniwersytecie Saarbruecken, 1987-1989, jako stypendysta Fundacji Aleksandra von Humboldta. Jest kierownikiem Zakładu Chemii Fizycznej Katedry Chemii Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Analytyki Medycznej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie. Zainteresowania naukowe: mechanizm retencji i selektywności rozdzielenia substancji, głównie biologicznie aktywnych, w układach chromatografii cieczowej i elektrochromatografii, analiza chemiczna z wykorzystaniem technik chromatografii cieczowej i elektromigracyjnych, konstrukcje urządzeń/komór do technik chromatografii i elektrochromatografii planarnej/warstwowej. Autor/współautor ok. 140 prac naukowych, 30 patentów. Jest jednym z redaktorów *Journal of Planar Chromatography*, należy do Naukowego Komitetu Redakcyjnego *Acta Chromatographica*.

ABSTRACT

Free flow electrophoresis, or carrier-free electrophoresis, is a technique based upon the principle of mobility of chargeable species in the electric field. However, unlike more widespread gel electrophoresis, free flow electrophoresis does not utilise any kind of solid support medium. Instead, species to be separated move within the space filled with aqueous buffer, which is constantly pumped in the direction perpendicular to the direction of the applied electric field. Such set-up allows for continuous separation, as compounds of the sample being processed form separate bands and leave the separation system through several different outlets located along the edge of the chamber. Furthermore, the use of mild separation conditions increases the chance of biologically active compounds retaining their activity after the separation is finished. These qualities make free flow electrophoresis an excellent tool for protein research and cytology.

In this review, the basic theoretical aspects of the technique are outlined, with a special emphasis placed on various modes in which free flow electrophoresis can be operated. Besides, a review of milestone papers related to free flow electrophoresis technology is presented. Apart from the devices following the original concept of Barrolier and Hannig, an insight into the construction of recirculating instrumentation, multicompartment electrolyzers as well as radially-symmetric chambers is provided. A special focus is placed on patents and commercialized solutions. Finally, the challenges of scaling-down free flow electrophoresis to micro-dimensions are introduced.

Keywords: free flow electrophoresis, electromigration techniques, pseudo-two dimensional separation, preparative separation, micro free flow electrophoresis

Słowa kluczowe: elektroforeza swobodna z przepływem hydrodynamicznym, techniki elektromigracyjne, rozdzielanie pseudo-dwuwymiarowe, rozdzielanie preparatywne, mikro-elektroforeza swobodna z przepływem hydrodynamicznym

WPROWADZENIE

Pod względem środowiska, w którym prowadzony jest proces, techniki elektroforetyczne podzielić można na wykorzystujące nośnik (żel, bibuła) oraz jego pozbowione (elektroforeza swobodna, ang. *free electrophoresis, FE*). Elektroforeza swobodna z kolei prowadzona może być w U-rurce, w kapilarze (elektroforeza kapilarna), lub w komorze o innej geometrii. Anglojęzyczny termin *free flow electrophoresis, FFE*, najczęściej używany jest w odniesieniu do technik wykorzystujących płaskie komory oraz hydrodynamiczny przepływ buforu podstawowego. Nazwa tej techniki nie została uwzględniona w najnowszym słowniku chromatografii i technik elektromigracyjnych [1]. Dlatego w niniejszej pracy stosujemy nazwę elektroforeza swobodna z przepływem. Płaska konstrukcja komory do takiej elektroforezy umożliwia ortogonalne skrzyżowanie kierunku hydrodynamicznego przepływu buforu podstawowego z kierunkiem linii przyłożonego pola elektrycznego. Przy takiej konfiguracji, kierunek migracji składników próbki dostarczonej do układu jest wypadkową kierunku przepływu buforu podstawowego i ruchliwości elektroforetycznej rozdzielanych związków. Umożliwia to rozdzielenie składników dostarczanej mieszaniny w trybie ciągłym, co stwarza możliwość stosowania elektroforezy swobodnej w celach preparatywnych, przy zachowaniu wysokiej wydajności (brak konieczności okresowego zatrzymywania procesu w celu ponownego dostarczenia próbki do rozdzielania). Rezygnacja z porowatego nośnika zapewnia wysoki odzysk rozdzielanych związków, które dodatkowo, ze względu na najczęściej stosowane bufory wodne pozбавione modyfikatora organicznego, utrzymują swoją pierwotną strukturę, zachowując tym samym przydatność np. do badań aktywności biologicznej [2–4]. Wymienione cechy usposabiają elektroforezę swobodną do preparatywnego rozdzielania peptydów [5, 6], białek [7, 8], kwasów nukleinowych [9] komórek [10–12] i ich części [13, 14]. Ponadto, opisano zastosowania tej techniki do rozdzielania enancjomerów [15–17] i nanocząstek [18, 19]. Celem niniejszej pracy jest omówienie podstaw teoretycznych elektroforezy swobodnej z przepływem oraz przedstawienie kluczowych osiągnięć rozwoju tej techniki. Pokrótko opisane zostaną również najnowsze kierunki badań oraz postępy związane z miniaturyzacją stosowanych urządzeń.

1. PODSTAWY TEORETYCZNE

Istotą rozdzielania składników mieszaniny podczas procesu elektroforezy kapilarnej jest zróżnicowany dystans ich migracji w polu elektrycznym, zgodnie z równaniem:

$$d = \mu_{ep} E t \quad (1)$$

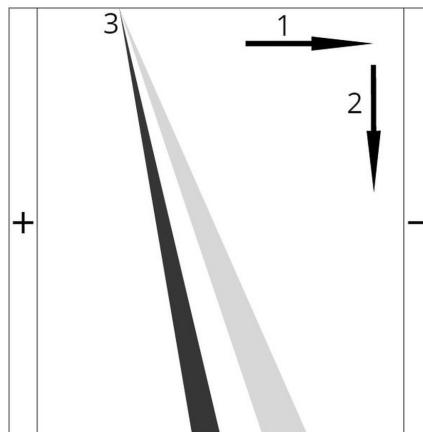
gdzie d – dystans migracji, μ_{ep} – ruchliwość elektroforetyczna, E – natężenie pola elektrycznego, t – czas trwania procesu.

Ruchliwość elektroforetyczna wyraża się z kolei wzorem:

$$\mu_{ep} = \frac{q}{6\pi r \eta} \quad (2)$$

gdzie q – ładunek cząstki lub jonu, r – promień cząstki lub jonu, η – lepkość buforu podstawowego.

Z powyższych zależności wynika więc, że w elektroforezie kapilarnej substancje są rozdzielane na podstawie różnic stosunku ładunku do wielkości (promienia) cząstek/jonów [20]. W technice elektroforezy swobodnej z przepływem na ruch cząstek/jonów w polu elektrycznym nakłada się hydrodynamiczny przepływ buforu podstawowego w kierunku prostopadłym. Proces ten odbywa się w płaskiej komorze, której dwie duże ściany naprzeciwległe są oddalone od siebie w zakresie od 0,035 do 0,7 mm. Zastosowane rozwiązań skutkuje odchyleniem się pasm substancji rozdzielanych od kierunku przepływu buforu podstawowego o kąt, którego wartość odzwierciedla relacje wynikające z właściwości substancji, natężenia pola elektrycznego, rozmiarów komory oraz prędkości liniowej przepływu buforu podstawowego [21]. Zasada działania techniki elektroforezy swobodnej z przepływem zilustrowana jest na schemacie (Rys. 1).



Rysunek 1. Zasada działania elektroforezy swobodnej z przepływem w trybie elektroforezy strefowej.
1 – kierunek pola elektrycznego, 2 – kierunek przepływu hydrodynamicznego, 3 – miejsce wprowadzania próbki, „+” – anoda, „-” – katoda

Figure 1. The principle of action of free flow electrophoresis in zone electrophoresis mode. 1 – direction of electric field, 2 – direction of hydrodynamic flow, 3 – sample introduction site, „+” – anode, „-” – cathode

Elektroforeza swobodna z przepływem jest więc techniką, która poszerza elektroforezę kapilarną o dodatkowy wymiar migracji rozdzielanych substancji, dzięki czemu umożliwia prowadzenie procesu w sposób ciągły. Szersze omówienie tematyki korelacji elektroforezy kapilarnej i elektroforezy swobodnej z przepływem znaleźć można w publikacjach [5, 6, 16, 22–27].

Tak jak w innych technikach separacji, szereg zjawisk fizyko-chemicznych utrudnia uzyskanie zadowalającej rozdzielczości. Poniższe równanie przedstawia zasadnicze składowe poszerzenia pasm rozdzielanych substancji w elektroforezie swobodnej z przepływem:

$$\sigma_T^2 = \sigma_{INJ}^2 + \sigma_D^2 + \sigma_{HD}^2 + \sigma_{ED}^2 + \sigma_{JH}^2 + \sigma_{EMD}^2 \quad (3)$$

gdzie σ_T^2 – całkowita wariancja pasma rozdzielanej substancji, σ_{INJ}^2 – wariancja związana z szerokością pasma próbki w miejscu dozowania, σ_D^2 – wariancja związana z dyfuzją w kierunku migracji w polu elektrycznym, σ_{HD}^2 – wariancja związana z przepływem hydrodynamicznym, σ_{ED}^2 – wariancja elektrodynamiczna, σ_{JH}^2 – wariancja związana z ciepłem Joule'a, σ_{EMD}^2 – wariancja elektrodispersyjna.

Część z powyższych składników wymaga dodatkowego omówienia:

- wariancja hydrodynamiczna (σ_{HD}^2): mechanicznie tłoczony elektrolit podstawowy przyjmuje paraboliczny profil przepływu, tzn. warstwy płynące w bezpośrednim sąsiedztwie górnej i dolnej pokrywy komory płyną wolniej niż warstwy znajdujące się w głębi roztworu. W rezultacie, cząstki/jony substancji, migrujące w pobliżu pokryw, będą opóźnione w kierunku przepływu hydrodynamicznego w stosunku do cząstek w głębi roztworu, co skutkuje deformacją pasma substancji [28, 29],
- wariancja elektrodynamiczna (σ_{ED}^2): w zależności od materiału, z jakiego wykonane są pokrywy komory, po przyłożeniu napięcia może powstać przepływ elektroosmotyczny buforu (ang. *electroosmotic flow*, EOF). Powoduje to przesunięcie pasm rozdzielanych substancji wraz z całą objętością buforu podstawowego w kierunku prostopadłym do kierunku przepływu hydrodynamicznego [30],
- wariancja wywołana ciepłem Joule'a (σ_{JH}^2): przepływ prądu elektrycznego przez przewodnik powoduje wydzielanie się ciepła zgodnie z równaniem:

$$Q = RI^2t \quad (4)$$

gdzie Q – wydzielone ciepło, R – opór elektryczny przewodnika, I – natężenie prądu, t – czas trwania procesu.

Wydzielające się ciepło powoduje spadek lepkości buforu podstawowego, szczególnie w głębi roztworu, gdyż ciepło wydzielające się w warstwach bezpośrednio sąsiadujących z pokrywami komory ulega bardziej efektywnemu rozproszeniu. Powoduje to powstanie gradientu temperatury w środowisku prowadzenia procesu, co skutkuje lokalnymi zmianami ruchliwości elektroforetycznej rozdzielanych substancji i wynikającym z nich rozmyciem [31, 32].

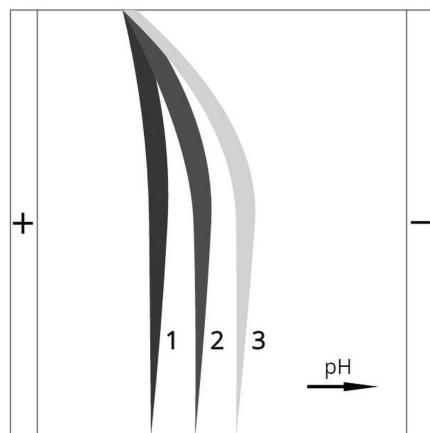
- wariancja elektrodispersyjna (σ_{EMD}^2): podłożem dla tego rodzaju rozmycia są różnice przewodności między roztworem próbki, a buforem podstawowym. W przypadku, gdy roztwór próbki charakteryzuje się wyższą przewodnością niż otaczający roztwór elektrolitu, dochodzi do poszerzenia strumienia

próbki (ruchliwość rozdzielanych cząstek/jonów jest większa w roztworze o mniejszej przewodności). Odwrotnie, zastosowanie roztworu próbki o przewodności mniejszej niż otaczającego elektrolitu spowoduje skupienie się pasma dozowanej próbki [33].

Proces FFE może być prowadzony w kilku trybach: elektroforeza strefowa (ang. *free flow zone electrophoresis*, FFZE), ogniskowanie izoelektryczne (ang. *free flow isoelectric focusing*, FFIEF), izotachoforeza (ang. *free flow isotachophoresis*, FFITP), elektroforeza ze skokowym gradientem pola (ang. *free flow field step electrophoresis*, FFFSE).

W trybie elektroforezy strefowej (Rys. 1) stosuje się bufor podstawowy, który w czasie prowadzonego procesu zachowuje możliwie jednolite pH oraz przewodność elektryczną. Dobór buforu podstawowego odbywa się z uwzględnieniem właściwości rozdzielanych substancji, np. gdy celem prowadzenia procesu jest oddzielenie substancji amfiprotycznej od rozpuszczalnych zanieczyszczeń, pH środowiska należy dobrąć w ten sposób, aby było ono równe wartości punktu izoelektrycznego oczyszczanej substancji, która migruje wtedy zgodnie z kierunkiem przepływu hydrodynamicznego, nie ulegając migracji w polu elektrycznym. Składniki zanieczyszczające natomiast będą wykazywać ładunek różny od zera i ulegną odchyleniu w kierunku anody lub katody. Można też zastosować odwrotną strategię i dobrąć pH buforu tak, by odpowiadało ono punktowi izoelektrycznemu głównego zanieczyszczenia [21]. Techniką elektroforezy strefowej wykonywane są przede wszystkim separacje organelli komórkowych [34–36].

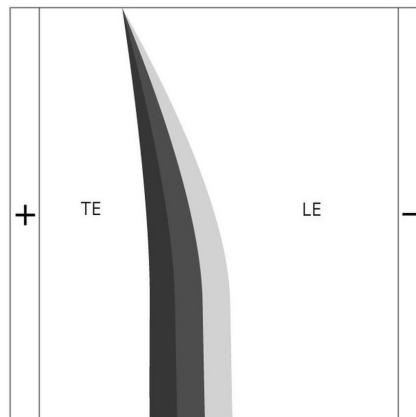
W metodzie ogniskowania izoelektrycznego (Rys. 2) istotą procesu jest zastosowanie gradientu pH w kierunku równoległym do linii sił pola elektrycznego, co w omawianej technice oznacza kierunek prostopadły do kierunku przepływu buforu podstawowego. Gradient taki można uzyskać na trzy różne sposoby: poprzez dodanie do buforu podstawowego mieszaniny amfolitów [7, 37–39], poprzez zastosowanie membran buforujących (p. niżej) oraz poprzez rozwiązania aparaturowe umożliwiające przedostawianie się do obszaru separacyjnego jonów wodorowych i wodorotlenkowych powstających w wyniku elektrolizy wody w przedziałach elektrodowych [40]. Ogniskowanie izoelektryczne szczególnie nadaje się do rozdzielenia związków o różnych wartościach pI, zwłaszcza peptydów i białek. W momencie dotarcia cząsteczek do obszaru komory o pH odpowiadającemu ich punktowi izoelektrycznemu tracą one swój sumaryczny ładunek różny od zera i przestają migrować w polu elektrycznym. Skutkuje to powstaniem wąskich pasm rozdzielanych substancji przy wyjściu z komory. Elektroforezę swobodną z przepływem i z ogniskowaniem izoelektrycznym białek przeprowadzać można zarówno w warunkach naturalnych, jak i denaturujących [41].



Rysunek 2. Ogniskowanie izoelektryczne. Wartości punktu izoelektrycznego substancji 1, 2 i 3 charakteryzuje relacja: $pI_1 < pI_2 < pI_3$

Figure 2. Isoelectric focusing. Isoelectric points of the substances 1, 2 and 3 are related as follows: $pI_1 < pI_2 < pI_3$

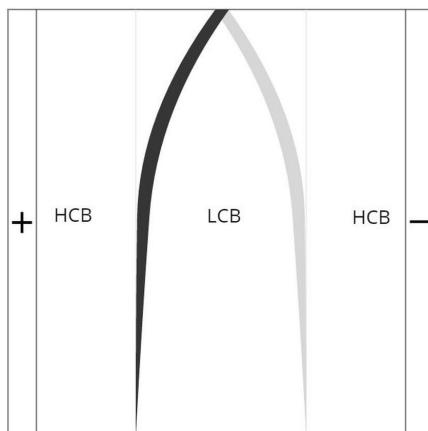
Natomiast w metodzie izotachoforezy (Rys. 3) stosuje się dwa różne bufory – jeden o ruchliwości jonów większej niż ruchliwość jonów próbki (elektrolit wiodący, ang. *leading electrolyte*, LE) i drugi o ruchliwości mniejszej od jonów próbki (elektrolit kończący, ang. *terminating electrolyte*, TE). Stosując tego rodzaju układ, rozdzielane substancje układają się w przylegające pasma od największej do najmniejszej ruchliwości elektroforetycznej [42]. Proces izotachoforezy swobodnej z przepływem opisano przede wszystkim dla celów rozdzielania białek [43–45], w tym lipoprotein [46, 47], a także organelli komórkowych [48].



Rysunek 3. Izotachoforeza swobodna z przepływem. LE – elektrolit wiodący, TE – elektrolit kończący

Figure 3. Free flow isotachophoresis. LE – leading electrolyte, TE – terminating electrolyte

W trybie elektroforezy ze skokowym gradientem pola (Rys. 4) wykorzystywane są różnice przewodności elektrycznej stosowanych buforów podstawowych – przez środkową część komory tłoczony jest bufor o stosunkowo niskiej przewodności, natomiast po obu jego stronach wprowadzany jest elektrolit o przewodności wysokiej. Zastosowanie takiego rozwiązania sprawia, że pasma rozdzielanych substancji ulegają skupieniu w momencie dotarcia do granicy dwóch układów buforowych, co wynika z nagłego obniżenia ich ruchliwości elektroforetycznej [21, 49].



Rysunek 4. Elektroforeza swobodna z przepływem ze skokowym gradientem pola. LCB – bufor o niskiej przewodności, HCB – bufor o wysokiej przewodności

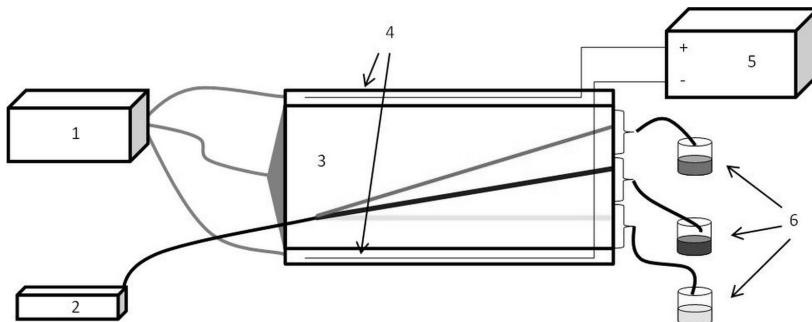
Figure 4. Free flow field step electrophoresis. LCB – low conductivity buffer, HCB – high conductivity buffer

Powyższe strategie scharakteryzowane zostały dla procesu prowadzonego w sposób ciągły. Istnieje jednak możliwość prowadzenia procesu w sposób interwałowy. Najpierw uruchamiany jest przepływ hydrodynamiczny i do układu wprowadzana jest próbka. Następnie tłoczenie buforu podstawowego jest zatrzymywane i uruchamiane jest pole elektryczne. Od tego momentu składniki próbki migrują w jednym kierunku zgodnie ze swoją ruchliwością elektroforetyczną. Po osiągnięciu zadowalającego rozdzielenia pole elektryczne jest wyłączane, ponownie uruchamiany jest przepływ hydrodynamiczny i rozdzielone substancje są wyprowadzane z układu separacyjnego. Jakkolwiek rozwiązanie to nie pozwala na wykorzystanie zalet płynących z ciągłego trybu rozdzielania, to jednak korzystnie przeciwiała przyczynom poszerzenia pasm substancji. Proces interwałowy opisano zarówno dla elektroforezy strefowej [15, 50], jak i izotachoforezy [51].

2. ROZWIĄZANIA TECHNICZNE

2.1. PIERWSZE URZĄDZENIA DO ELEKTROFOREZY SWOBODNEJ Z PRZEPŁYWEM I ICH DALSZY ROZWÓJ

W literaturze przedmiotu jako początek techniki elektroforezy swobodnej z przepływem zgodnie cytowane są prace Barrolliera [52] i Hanniga [53]. W pierwszej z nich zaprezentowano duże urządzenie (ok. 60×60 cm), skonstruowane z dwóch szklanych płyt, pomiędzy którymi znajdowała się szczelina szerokości ok. 0,5 mm. Po bokach tak utworzonej komory umieszczone były przedziały elektrodowe, oddzielone od właściwej przestrzeni separacyjnej paskami bibułowymi. W miejscu wejściowej krawędzi do komory tłoczony był bufor oraz roztwór próbki. Na przeciwnym końcu rozdzielone składniki spływały po paskach bibuły do kilkudziesięciu zbiorników. Zbliżone konstrukcyjnie urządzenie przedstawił Hannig, który zaprezentował jego wykorzystanie do rozdzielania barwników, aminokwasów, peptydów, białek surowicy, a także erytroцитów króliczych i ludzkich. W roku 1975 podobną konstrukcję opisał Wagner [54]. Ogólny schemat budowy tego typu urządzeń przedstawia Rysunek 5. W latach 80. firma Bender and Hobein wprowadziła na rynek aparaty bazujące na powyższych koncepcjach (modele Elphor Vap 5, 11, 21, 22, 220) [55].

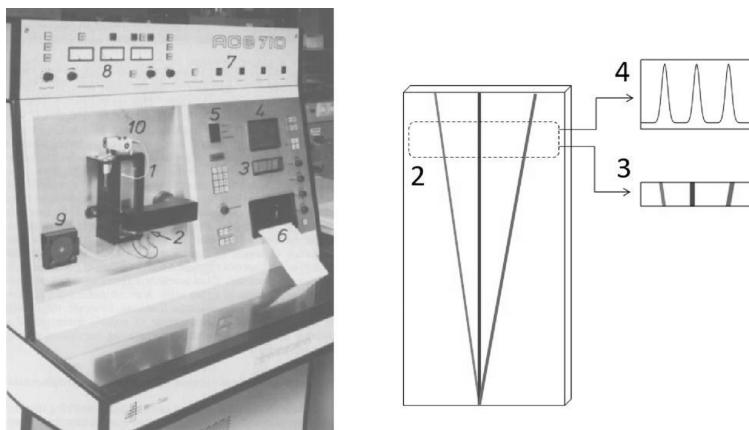


Rysunek 5. Budowa podstawowego urządzenia do elektroforezy swobodnej z przepływem. 1 – pompa elektrolitu podstawowego, 2 – pompa roztworu próbki, 3 – przestrzeń separacyjna, 4 – przedziały elektrodowe, 5 – zasilacz, 6 – zbiorniki frakcji

Figure 5. Basic free flow electrophoresis setup. 1 – background electrolyte pump, 2 – sample solution pump, 3 – separation area, 4 – electrode compartments, 5 – power supply, 6 – fraction containers

Inną koncepcję przedstawił Hannig w pracach z przełomu lat 70. i 80. [56, 57]. Zaprezentowana została konstrukcja aparatu typowo analitycznego, o rozmiarach komory separacyjnej $3 \times 18 \times 0,035$ cm. Jedna z pokryw wyposażona została w okienko kwarcowe, które stwarzało możliwość detekcji densytometrycznej przy użyciu specjalnie skonstruowanej głowicy skanującej. Urządzenie wyposażone było w układy elektroniczne umożliwiające cyfrowy zapis uzyskiwanych wyników. Średni czas pojedynczej analizy w tym urządzeniu wynosił 30–90 s. Autorzy zapre-

zentowali wyniki separacji m.in. białek surowicy ludzkiej oraz erytrocytów ludzkich i króliczych. Wykazano wysoką powtarzalność wyników uzyskiwanych w kolejno następujących po sobie analizach. Ma to szczególne znaczenie przy pomiarze ruchliwości elektroforetycznej rozdzielanych cząstek, co w przypadku analizy komórek pozwala na śledzenie subtelnych zmian ładunku powierzchniowego, powstałygo np. w przebiegu różnicowania. Opisane urządzenie zostało skomercjalizowane przez firmę Hirschmann jako ACE710 (Rys. 6).

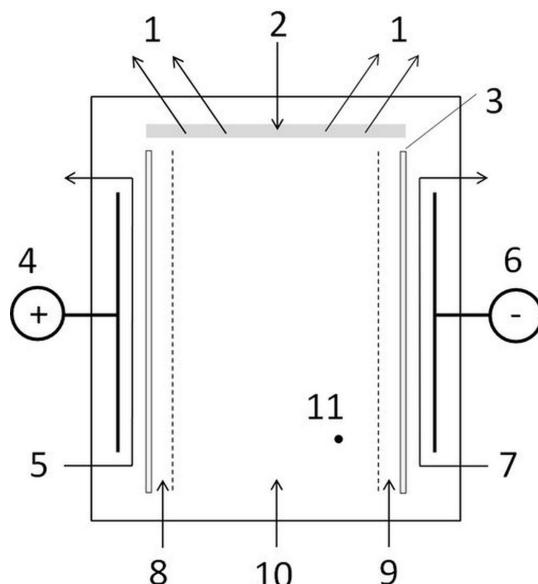


Rysunek 6. Urządzenie analityczne ACE710. 1 – komora separacyjna, 2 – okienko optyczne, 3 – wyświetlacz do obserwacji rozdzielanych pasm, 4 – wyświetlacz krzywej dystrybucji pasm, 5 – wyświetlacz wartości ruchliwości elektroforetycznych, 6 – drukarka, 7 – pomocnicze wskaźniki kontroli procesu, 8 – panel sterowania parametrami eksperymentu, 9 – pompa buforu podstawowego, 10 – pompa próbki. Przedruk za zgodą z [57].

Figure 6. ACE710 analytical apparatus. 1 – separation chamber, 2 – optical window, 3 – display of separated bands, 4 – display of components' distribution curves, 5 – electrophoretic mobility display, 6 – printer, 7 – timing values for process control, 8 – panel for control of experiment parameters, 9 – background electrolyte pump, 10 – sample pump. Reprinted with permission from [57].

Nową konstrukcję urządzenia do FFE zaprezentowali Weber i Boćek [58]. W odróżnieniu od klasycznych aparatów Hanniga i Barrolliera, przedstawiona przez nich komora o wymiarach części separacyjnej $50 \times 10 \times 0,05$ cm wyposażona została w rozwiązania techniczne umożliwiające przyspieszony przepływ buforu podstawowego wzdłuż krańców komory separacyjnej (w bezpośrednim sąsiedztwie membran ograniczających przedziały elektrodowe) oraz przepływ przeciwproudowy przy kapilarach odprowadzających produkty separacji z układu (Rys. 7). Pierwsze rozwiązanie zapobiega przedostawaniu się do medium separacyjnego produktów elektrolizy z przedziałów elektrodowych (przede wszystkim tlenu, wodoru, jonów H^+ i OH^-), drugie natomiast uniezależnia przepływ w kapilarach wyprowadzających od różnych gęstości i lepkości roztworów zbieranych frakcji. Opisano separacje przy użyciu tego urządzenia zarówno w trybie ZE, IEF, jak i ITP [36, 37, 51]. Dodatkowo, przedstawiono możliwość

prowadzenia procesu zarówno w trybie ciągłym, jak i interwałowym [15, 50, 51]. Urządzenie to pierwotnie zostało skomercjalizowane jako OCTOPUS przez Dr. Weber GmbH. Następnie produkcją i dystrybucją urządzenia opartego na tej technologii zajęła się firma TECAN (aparat ProTeam FFE, [59]), a później BD Diagnostics [60]. Obecnie, nowe generacje aparatu produkowane i sprzedawane są przez firmę FFE Services GmbH [61].



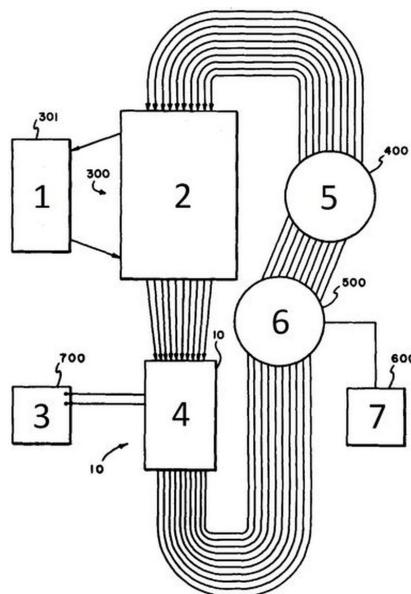
Rysunek 7. Schematyczna ilustracja komory do elektroforezy swobodnej skonstruowanej przez Webera i Boćka [58]. 1 – odpływy rozdzielanych frakcji, 2 – przepływ przeciwproudowy, 3 – membrana oddzielająca przedział elektrodowy od przestrzeni separacyjnej, 4 – anoda, 5 – przepływ anolitu w przedziale anodowym, 6 – katoda, 7 – przepływ katolitu w przedziale katodowym, 8 – przepływ brzegowy anolitu, 9 – przepływ brzegowy katolitu, 10 – mieszanina amfolytów, 11 – miejsce wprowadzania próbki do układu

Figure 7. A schematic illustration of a free flow electrophoresis chamber constructed by Weber and Boćek [58]. 1 – separated fractions outlets, 2 – countercurrent flow, 3 – membrane separating electrode compartment from separation bed, 4 – anode, 5 – anolyte flow within anode compartment, 6 – cathode, 7 – catholyte flow within cathode compartment, 8 – anolyte sheath flow, 9 – catholyte sheath flow, 10 – carrier ampholytes, 11 – sample introduction site

2.1. URZĄDZENIA Z RECYRKULUJĄCYM PRZEPŁYWEM BUFORU PODSTAWOWEGO

Powyzsze rozwiązania skoncentrowane są na rozdzieleniu ciągłym, tzn. próbka jest nieprzerwanie dostarczana i rozdzielana. W niektórych jednak przypadkach taka metodyka jest niezadowalająca z punktu widzenia uzyskiwanej rozdzieleności. Bier [62, 63] opatentował urządzenie recyrkulujące do ogniskowania izo-elektrycznego o następującej zasadzie działania: komora separacyjna podzielona została membranami o grubości 5–10 μm na kilka równoległych przedziałów,

z których każdy posiadał własny przewód wyprowadzający, który przed ponownym wejściem do komory separacyjnej przechodził przez wymiennik ciepła (Rys. 8). Tym sposobem można było zwiększyć całkowity czas ekspozycji próbki na działanie pola elektrycznego, nie ryzykując jednak nadmiernego ogrzania medium separacyjnego i związanej z tym dyspersji oraz degradacji produktów rozdzielania (w przypadku substancji termowrażliwych). Urządzenie to przez autorów zostało nazwane RIEF (ang. *recycling isoelectric focusing*). W przebiegu dalszych prac urządzenie to zostało zmodyfikowane – komora separacyjna pozbawiona została membran oraz zmniejszony został jej prześwit (do 0,7 mm) [64], pozostawiono natomiast bez znaczących zmian mechanizm recyrkulacyjny. W urządzeniu tym, oprócz IEF, możliwe były także separacje ITP [65]. Aparat ten, jako RF3 został skomercjalizowany przez Protein Technologies, Inc. [66].



Rysunek 8. Schemat urządzenia z recyrkulującym przepływem buforu podstawowego. 1 – źródło cieczy chłodzącej, 2 – wymiennik ciepła, 3 – zasilacz, 4 – komora do ogniskowania izoelektrycznego, 5 – pompa wielokanałowa, 6 – detektory, 7 – moduł zapisu danych oraz mikroprocesor. Przedruk za zgodą z [66]

Figure 8. Schematic view of the recycling apparatus. 1 – coolant source, 2 – heat exchanger, 3 – power supply, 4 – IEF apparatus, 5 – multi-channel pump, 6 – sensors, 7 – data recorder and logic. Reprinted with permission from [66]

Innowacyjnym przykładem połączenia przepływu recyrkulującego i podziału przestrzeni separacyjnej membranami było urządzenie Gradiflow [67]. Autorzy zaprezentowali zestaw, w którym komora separacyjna podzielona została membraną na dwa kanały. W zależności od szerokości porów, substancje rozdzielić można było jedynie na podstawie ich ruchliwości elektroforetycznej (szerokie pory w membra-

nie) lub dodatkowo ze względu na wielkość cząstki (wąskie pory). Przy odpowiednim doborze objętości przepływających przez poszczególne kanały można również było prowadzić zatężanie próbki. Autorzy scharakteryzowali także proces elektrodializy przy użyciu urządzenia Gradiflow [68].

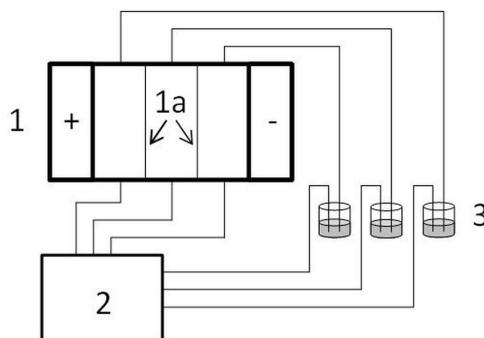
Inne urządzenie wykorzystujące ideę wielokrotnego przepływu rozdzielanej próbki przez komorę skonstruowali i opisali Kong i współpracownicy [69]. Zasada działania zaprezentowanej przez nich konstrukcji jest następująca: roztwór podstawowy zawierający mieszaninę amfolitów tłoczony jest wieloma kanałami do komory, z której rozdzielone frakcje wypływają do wielokanałowego kolektora. Po przekroczeniu zadanej poziomu cieczy w kolektorze, czujnik wysyła sygnał do modułu sterującego pompą, po czym kierunek przepływu buforu odwraca się (pompa przechodzi w tryb ssący). Cykl taki można powtórzyć wielokrotnie, aż do uzyskania zadowalającego zogniskowania pasm rozdzielanych substancji w roztworze o stabilnym gradiencie pH. Warto w tym miejscu nadmienić, że autorzy tego rozwiązania mają w swoim dorobku kilka innych prac związanych z elektroforezą swobodną, m.in. dotyczących innowacyjnych technik tłoczenia elektrolitu podstawowego i dozowania próbki [70–74].

2.3. ELEKTROFOREZERY WIELOPRZEDZIAŁOWE

Pierwszym tego rodzaju rozwiązaniem był Rotofor [75], który w 1987 roku został skomercjalizowany przez firmę Bio-Rad [66]. Komora separacyjna miała wydłużony kształt cylindryczny i podzielona była błonami półprzepuszczalnymi na segmenty. Podstawy komory stanowiły elektrody, natomiast jej osią był element chłodzący. W czasie prowadzenia procesu, komora wykonywała ciągły obrót wokół własnej osi, co miało na celu równomierne rozproszenie ciepła Joule'a i w konsekwencji ograniczenie rozmycia stref rozdzielanych substancji. Należy zauważyć, że w urządzeniach tego typu nie występuje ortogonalne nałożenie kierunków przepływu hydrodynamicznego i ruchu jonów w polu elektrycznym – procesy w nich prowadzone nie mają więc charakteru ciągłego. Tym niemniej, z uwagi na brak nośnika i podobieństwo w zakresie zastosowań, postanowiliśmy uwzględnić je w niniejszym opracowaniu.

Inne rozwiązania związane są z użyciem membran buforujących. Separacje wykonywane przy ich użyciu określić można jako pułapkowanie izoelektryczne (ang. *isoelectric trapping*, IET) i mają szczególne zastosowanie we wstępny rozdzielaniu mieszanin białek do dalszej analizy. Podstawowym problemem przy tej technice jest odpowiednia konstrukcja membran. Odpowiednim materiałem stanowiącym rusztowanie membran jest np. celuloza, poprzecznie usicowany alkohol poliwinylowy, tlenek polietylenu lub poliakrylamid. Stosowany może również być żel agarozowy oparty na rusztowaniu z bibuły filtracyjnej [76]. Na tak przygotowanej powierzchni immobilizowane są cząsteczki substancji z grupami jonotwórczymi w odpowiednich proporcjach tak, aby ostatecznie przygotowana membrana

wykazywała odpowiednią wartość pH i pojemność buforową. Najczęściej do tego celu służą komercyjnie dostępne mieszaniny amfolitów, jak np. Ampholine czy Pharmalytes [77]. Urządzenia do pułapkowania izoelektrycznego składają się najczęściej z kilku przedziałów, z których każdy ograniczony jest dwoma membranami o różnym pH. W ten sposób, rozdzielane białka akumulują się w przedziale ograniczonym błonami o pH odpowiednio niższym i wyższym od ich punktu izoelektrycznego. Righetti i współpracownicy zaprezentowali urządzenie składające się z dowolnej liczby modułów, każdy o pojemności około 5 ml, oddzielonych od siebie membranami izoelektrycznymi o pH odpowiadającym potrzebom danego procesu [78]. Każdy z modułów wyposażony jest w oddzielny kanał doprowadzający i odprowadzający, co pozwala na ciągłą recyrkulację jego zawartości podczas prowadzenia procesu (Rys. 9). Autorzy zaprezentowali wyniki m.in. oczyszczania rekombinowanej *N*-acetyloeglity C oraz separacji mieszaniny hemoglobin A i C. Opatentowane rozwiązanie zostało skomercjalizowane przez firmę Hoefer Pharmacia jako aparat IsoPrime. Podobne rozwiązanie, choć o mniejszych rozmiarach (ok. 0,5 ml na jeden moduł) i pozbawione mechanizmu recyrkulującego zaprezentowali Zuo i Speicher [79]. Urządzenie bazujące na ich projekcie jest obecnie sprzedawane jako ZOOM IEF Fractionator przez firmę ThermoFischer Scientific. Podobne urządzenie, o jeszcze mniejszej pojemności przedziałów zaprezentowali Lim i współpracownicy [80]. Ogle i Shave oraz Vigh opisali urządzenia z wykorzystaniem membran izoelektrycznych bazujące na koncepcji aparatu Gradiflow [81–83].

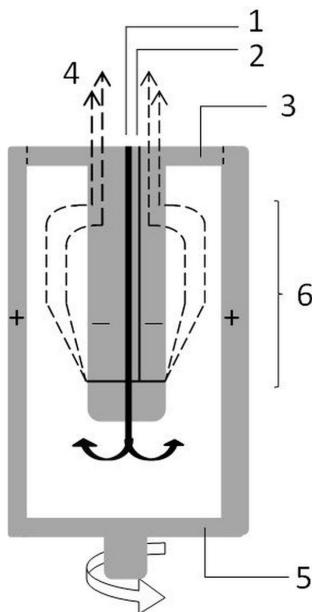


Rysunek 9. Zestaw do prowadzenia ogniskowania izoelektrycznego w elektroforezerze wieloprzedziałowym. 1 – elektroforezer wieloprzedziałowy, 1a – membrany izoelektryczne, 2 – wielokanałowa pompa perystaltyczna, 3 – rezerwuary próbki. Zasilacz niepokazany [78].

Figure 9. Instrumentation for isoelectric focusing in a multicompartment electrolyzer. 1 – multicompartment electrolyzer, 1a – isoelectric membranes, 2 – multi-channel peristaltic pump, 3 – sample reservoirs. Power supply not shown [78].

2.4. URZĄDZENIA O SYMETRII RADIALNEJ

Projekt aparatu o symetrii radialnej do prowadzenia elektroforezy swobodnej z przepływem przedstawiili Mattock i współpracownicy [84]. W publikacji scharakteryzowana jest konstrukcja urządzenia składającego się z dwóch współosiowych cylindrów, z których jeden stanowi katodę, a drugi anodę. Pole powierzchni powstałe między cylindrami pierścienia wynosi ok. 26 cm^2 , natomiast wysokość przedziału separacyjnego 30,5 cm. Cylinder wewnętrzny w czasie prowadzenia procesu jest nieruchomy, zaś zewnętrzny wykonuje ciągły obrót wokół osi z prędkością około 150 obrotów na minutę. Powstały w ten sposób gradient prędkości kątowej zapobiega zaburzeniom przepływu laminarnego (powstają one na skutek lokalnych zmian gęstości buforu podstawowego pod wpływem wydzielającego się w czasie procesu ciepła Joule'a). Równocześnie, od dołu ku górze tłoczony jest bufor podstawowy, który wraz z pasmami rozdzielanych substancji trafia do trzydziestu otworów odpływowych na szczycie kolumny, skąd dalej płynie do kolektora frakcji (Rys. 10). Autorzy scharakteryzowali separacje m.in. białek surowicy, erytrocytów ludzkich i króliczych, a także mieszaniny barwników w trybie elektroforezy strefowej. Urządzenie według tej koncepcji skomercjalizowane zostało jako BioStream przez John Brown Engineering Co.

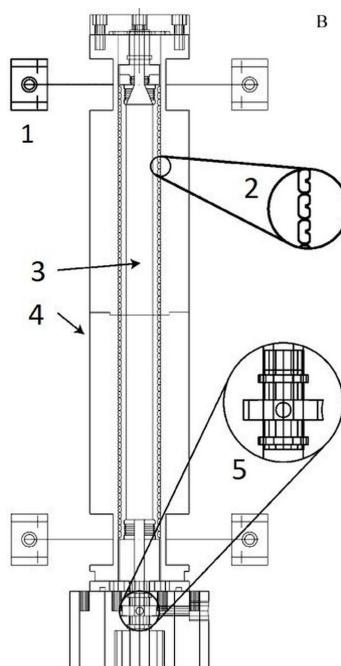


Rysunek 10. Schemat urządzenia opisanego przez Mattocka i wsp. 1 – miejsce wprowadzania buforu podstawowego, 2 – miejsce wprowadzania roztworu próbki, 3 – stator, 4 – miejsce zbioru frakcji, 5 – rotor, 6 – przestrzeń, w której zachodzi proces rozdzielania [84]

Figure 10. Schematic presentation of the device described by Mattock et al. 1 – background buffer input, 2 – sample introduction site, 3 – stator, 4 – fraction collection site, 5 – rotor, 6 – the space within which the separation process occurs [84]

Zasadniczo odmienne rozwiązań zaprezentowali Melin i Poggel [85]. W ich urządzeniu bufor podstawowy wraz z roztworem próbki wtłaczany jest do przestrzeni separacyjnej w pobliżu obwodu płaskiego walca, którego podstawy zintegrowane są z elektrodami. Pasma substancji rozdzielanych spływają do kolektora frakcji znajdującego się w centrum komory separacyjnej. Autorzy rozwiązania przedstawili separację mieszaniny albuminy surowicy bydlęcej, mioglobiny i cytochromu C w trybie elektroforezy strefowej.

Inne urządzenie o symetrii radialnej przedstawił Ivory [86]. Składa się ono z wewnętrznego rotora i zewnętrznego statora, pomiędzy którymi znajduje się przestrzeń separacyjna. Na górze i na dole tak powstałej kolumny znajdują się oddzielone membranami elektrody. W czasie prowadzenia procesu wewnętrzna część wykonuje ciągły ruch obrotowy z prędkością 50–75 obrotów na minutę. Kontaktujące się z przestrzenią separacyjną powierzchnie rotora i statora wyposażone są w komplementarne wyżlobienia, których odpowiednie ukształtowanie powoduje, że podczas obrotów rotora między nim a statorem wytwarzają się wiry buforu podstawowego, których charakterystyka przyczynia się do ograniczenia dyspersji pasm rozdzielanych substancji (Rys. 11). Opisano także wariant aparatu udoskonalony o możliwość detekcji spektrofotometrycznej *on-line* [87].

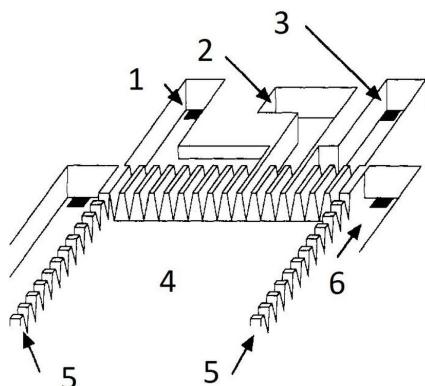


Rysunek 11. Schemat urządzenia Ivory'ego. 1 – łożysko elektrody (powiększenie), 2 – struktura wyżłobień ścian przestrzeni prowadzenia procesu rozdzielania, 3 – rotor, 4 – stator, 5 – zawór wejściowy cieczy chłodzącej (powiększenie). Przedruk za zgodą z [86]

Figure 11. Schematic of Ivory's apparatus. 1 – electrode housing detail, 2 – the structure of indentations on the walls of separation bed, 3 – rotor, 4 – stator, 5 – coolant inlet detail. Reprinted with permission from [86]

2.5. MINIATURYZACJA

Innym kierunkiem rozwoju elektroforezy swobodnej z przepływem jest jej miniaturyzacja. Pierwsze urządzenie tego typu zostało skonstruowane przez Raymonda i współpracowników [88], jego ideę przedstawiono na Rysunku 12. Objętość przestrzeni separacyjnej w scharakteryzowanym rozwiązaniu to jedynie 25 μl .



Rysunek 12. Schematyczna ilustracja urządzenia zaprezentowanego przez Raymonda i współpracowników. 1,3 – miejsca wprowadzania buforu, 2 – miejsce wprowadzania próbki, 4 – miejsce prowadzenia procesu rozdzielania, 5 – matryce kanalików bocznych, 6 – przedział boczy. Przedruk za zgodą z [88]

Figure 12. Schematic illustration of the device presented by Raymond et al. 1,3 – buffer inlets, 2 – sample inlet, 4 – separation bed, 5 – side channels arrays, 6 – side bed. Reprinted with permission from [88]

Zmniejszone rozmiary tego i podobnych urządzeń skutkują zdecydowanie krótszymi czasami potrzebnymi do rozdzielenia substancji w polu elektrycznym (nawet poniżej 1 sekundy [89]). Ponadto, wysoki stosunek powierzchni do objętości pozwala na efektywne rozproszenie wydzielającego się ciepła Joule'a. Tym samym zminimalizowany zostaje jeden z podstawowych problemów technicznych spotykanych w pełnowymiarowych aparatach do elektroforezy swobodnej z przepływem. Z drugiej jednak strony, w przypadku mikrokomór większego znaczenia nabiera problem akumulacji pęcherzyków gazów powstających w wyniku elektrolizy wody, co powoduje zarówno zaburzenia przepływu hydrodynamicznego, jak również spadek efektywności zastosowanego pola elektrycznego. Rozwiązania techniczne mające na celu ograniczenie wpływu pęcherzyków na jakość separacji podzielić można na kilka grup:

- zastosowanie matrycy kanalików o małej średnicy oddzielającej przestrzeń separacyjną od przedziałów elektrodowych [88, 90, 91],
- bezpośrednią integrację elektrod w świetle komory i zastosowanie wartości napięcia niepowodujących elektrolizy wody [92],
- zastosowanie elektrod palladowych [93],

- oddzielenie przedziałów elektrodomowych od przestrzeni separacyjnej przy użyciu żelowych mostków solnych [94–97],
- podział komory na przedziały przy użyciu membran [98],
- zróżnicowanie głębokości przedziałów elektrodomowych i przestrzeni separacyjnej [99] oraz inne modyfikacje geometryczne [100, 101],
- izolacja elektrod i przeniesienie ładunku do przestrzeni separacyjnej na zasadzie indukcji [102],
- dodatek pary redoks chinon/hydrochinon, która ulega redukcji/utlenianiu przy potencjałach niższych niż woda i bez generacji gazów [103].

Opisano liczne przykłady rozdzielania prowadzonego przy użyciu mikrourządzeń, zarówno w trybie elektroforezy strefowej [88, 91, 96, 97], izotachoforezy [105–107], jak również elektroforezy ze skokowym gradientem pola [98, 108]. Większość cytowanych doniesień dotyczy rozdzielania barwników fluorescencyjnych, jednak w przypadku ogniskowania izoelektrycznego opisano także separacje peptydów [89], białek [94] i organelli komórkowych [92].

Akapit ten przedstawia jedynie zarys obecnego stanu wiedzy na temat zminiaturyzowanej elektroforezy swobodnej z przepływem. Znacznie pełniejsze omówienie tego zagadnienia znaleźć można w pracach przeglądowych [108–110].

PODSUMOWANIE

Od momentu przedstawienia koncepcji elektroforezy swobodnej z przepływem i konstrukcji pierwszego urządzenia, technika ta zyskała ugruntowaną pozycję pośród metod rozdzielania, szczególnie w odniesieniu do substancji wrażliwych na skład chemiczny medium separacyjnego, przede wszystkim białek i peptydów. Innym wyróżniającym ją spośród większości technik rozdzielania aspektem jest możliwość prowadzenia procesu w sposób ciągły, co czyni ją odpowiednią do zastosowań preparatywnych. W ostatnich latach, dzięki rozwojowi technik mikroobróbki, pojawiło się znaczące zainteresowanie miniaturyzacją urządzeń analitycznych, w tym również komór do elektroforezy swobodnej. Kierunek ten wydaje się być niezwykle obiecujący z uwagi na swój wysoki potencjał sprzęgania z innymi urządzeniami w ramach systemów *lab-on-chip*.

PIŚMIENIICTWO CYTOWANE

- [1] *Chromatografia i techniki elektromigracyjne. Słownik pięciojęzyczny*, Z. Witkiewicz, E. Śliwka (Red.), WNT, Warszawa 2015.
- [2] Z.J. Xia, Z. Liu, F.Z. Kong, L.Y. Fan, H. Xiao, C.X. Cao, Electrophoresis, 2017, **38**, 3147.
- [3] B.H. Justesen, T. Laursen, G. Weber, A.T. Fuglsang, B.L. Møller, T. Günther Pomorski, Anal. Chem. 2013, **85**, 3497.
- [4] H. Xie, N.L. Rhodus, R.J. Griffin, J.V. Carlis, T.J. Griffin, Mol. Cell. Proteomics, 2005, **4**, 1826.
- [5] V. Kašička, Z. Prusík, J. Pospíšek, J. Chromatogr. A, 1992, **608**, 13.

- [6] V. Kašička, Z. Prusík, O. Smékal, J. Hlaváček, T. Barth, G. Weber, H. Wagner, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, 1994, **656**, 99.
- [7] N. Soulet, H. Roux-de Balmann, V. Sanchez, *Electrophoresis*, 1998, **19**, 1294.
- [8] J.F. Song, T. Liu, X. Shen, G. Wu, Q. Xia, *Electrophoresis*, 1998, **19**, 1097.
- [9] R.J. Meagher, J.I. Won, L.C. McCormick, S. Nedelcu, M.M. Bertrand, J.L. Bertram, G. Drouin, A.E. Barron, G.W. Slater, *Electrophoresis*, 2005, **26**, 331.
- [10] V. Chestkov, B. Baibakov, S.P. Radko, A. Chrambach, *Electrophoresis*, 1998, **19**, 1211.
- [11] G. Weber, D. Grimm, J. Bauer, *Electrophoresis*, 2000, **21**, 325.
- [12] M. Horká, J. Horký, H. Matousková, K. Slais, *J. Chromatogr. A*, 2009, **1216**, 1019.
- [13] D.J. Grab, P. Webster, J.D. Lonsdale-Eccles, *Electrophoresis*, 1998, **19**, 1162.
- [14] N. Bardy, A. Carrasco, J.P. Galaud, R. Pont-Lezica, H. Canut, *Electrophoresis*, 1998, **19**, 1145.
- [15] P. Hoffmann, H. Wagner, G. Weber, M. Lanz, J. Caslavská, W. Thormann, *Anal. Chem.*, 1999, **71**, 1840.
- [16] M. Wind, P. Hoffmann, H. Wagner, W. Thormann, *J. Chromatogr. A*, 2000, **895**, 51.
- [17] E. Schneiderman, S.R. Gratz, A.M. Stalcup, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2002, **27**, 639.
- [18] Y. Liu, D. Zhang, S. Pang, Y. Liu, Y. Shang, *J. Sep. Sci.*, 2015, **38**, 157.
- [19] S. Ho, K. Critchley, G.D. Lilly, B. Shim, N.A. Kotov, *J. Mater. Chem.*, 2009, **19**, 1390.
- [20] E. Dziubakiewicz, B. Buszewski, *Podstawy teoretyczne technik elektromigracyjnych*, [w:] *Techniki elektromigracyjne. Teoria i praktyka*, B. Buszewski, E. Dziubakiewicz, M. Szumski (Red.), Wydawnictwo Malamut, Warszawa 2012, s. 21.
- [21] M.C. Roman, P.R. Brown, *Anal. Chem.*, 1994, **66**, 86.
- [22] Z. Prusík, V. Kašička, P. Mudra, J. Štěpánek, O. Smékal, J. Hlaváček, *Electrophoresis*, 1990, **11**, 932.
- [23] V. Kašička, Z. Prusík, P. Sázelová, J. Jiráček, T. Barth, *J. Chromatogr. A*, 1998, **796**, 211.
- [24] J. Junkers, P. Schmitt-Kopplin, J.-C. Munch, A. Kettrup, *Electrophoresis*, 2002, **23**, 2872.
- [25] U. Keuth, A. Leinenbach, H.P. Beck, H. Wagner, *Electrophoresis*, 1998, **19**, 1091.
- [26] P. Glukhovskiy, G. Vigh, *Anal. Chem.*, 1999, **71**, 3814.
- [27] I. Spanik, P. Lim, G. Vigh, *J. Chromatogr. A*, 2002, **960**, 241.
- [28] A. Strickler, *Sep. Sci.*, 1967, **2**, 335.
- [29] C.F. Ivory, *J. Chromatogr. A*, 1980, **195**, 165.
- [30] P.H. Rhodes, R.S. Snyder, *Electrophoresis*, 1986, **7**, 113.
- [31] R.S. Turk, C.F. Ivory, *Chem. Eng. Sci.*, 1984, **39**, 851.
- [32] S. Ostrach, *J. Chromatogr. A*, 1977, **140**, 187.
- [33] P.H. Rhodes, R.S. Snyder, G.O. Roberts, *J. Colloid Interface Sci.*, 1989, **129**, 78.
- [34] M. Marsh, S. Schmid, H. Kern, E. Harms, P. Male, I. Mellman, A. Helenius, *J. Cell Biol.*, 1987, **104**, 875.
- [35] E. Harms, H. Kern, J.A. Schneider, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1980, **77**, 6139.
- [36] H. Eubel, C.P. Lee, J. Kuo, E.H. Meyer, N.L. Taylor, A.H. Millar, *Plant J.*, 2007, **52**, 583.
- [37] S.H. Kim, H. Miyatake, T. Ueno, T. Nagao, K. Miki, *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.*, 2005, **61**, 799.
- [38] M. Poux, J. Bertrand, *Electrophoresis*, 1990, **11**, 907.
- [39] G. Weber, P. Boček, *Electrophoresis*, 1998, **19**, 1649.
- [40] Y. Zhan, T. Lemma, M. F. Musteata, J. Pawliszyn, *J. Chromatogr. A*, 2009, **1216**, 2928.
- [41] S.A. Ouvry-Patat, M.P. Torres, H.H. Quek, C.A. Gelfand, P. O'Mullan, M. Nissum, G.K. Schroeder, J. Han, M. Elliott, D. Dryhurst, J. Ausio, R. Wolfenden, C.H. Borchers, *Proteomics*, 2008, **8**, 2798.
- [42] T. Hirokawa, Y. Kiso, *J. Chromatogr. A*, 1994, **658**, 343.
- [43] R. Kuhn, H. Wagner, *Electrophoresis*, 1989, **10**, 165.
- [44] S. Hoffstetter-Kuhn, R. Kuhn, H. Wagner, *Electrophoresis*, 1990, **11**, 304.
- [45] W. Thormann, M.A. Firestone, J.E. Sloan, T.D. Long, R.A. Mosher, *Electrophoresis*, 1990, **11**, 298.

- [46] G. Nowicka, T. Brüning, B. Grothaus, G. Kahl, G. Schmitz, *J. Lipid Res.*, 1990, **31**, 1173.
- [47] A. Böttcher, J. Schlosser, F. Kronenberg, H. Dieplinger, G. Knipping, K.J. Lackner, G. Schmitz, *J. Lipid Res.*, 2000, **41**, 905.
- [48] R. Hofmeister, A. Böttcher, G. Schmitz, *Electrophoresis*, 1998, **19**, 1185.
- [49] R. Kuhn, S. Hoffstetter-Kuhn, H. Wagner, *Electrophoresis*, 1990, **11**, 942.
- [50] J. Bauer, G. Weber, *J. Dispers. Sci. Technol.*, 1998, **19**, 937.
- [51] G. Weber, P. Boček, *Electrophoresis*, 1998, **19**, 3090.
- [52] J. Barrollier, W. Eugen, H. Gibian, *Z. Naturforsch. B*, 1958, **13**, 754.
- [53] K. Hannig, *Fresen. Z. Anal. Chem.* 1961, **181**, 244.
- [54] H. Wagner, D. Neupert, K. Schlick, *J. Chromatogr. A*, 1975, **115**, 357.
- [55] P.J.A. Weber, G. Weber, C. Eckerskorn, U. Schneider, A. Posch, *Sep. Sci. Technol.*, 2005, **7**, 211.
- [56] K. Hannig, H. Wirth, R.K. Schindler, K. Spiegel, *Hoppe. Seylers Z. Physiol. Chem.*, 1977, **358**, 753.
- [57] K. Hannig, *Electrophoresis*, 1982, **3**, 235.
- [58] G. Weber, P. Boček, *Electrophoresis*, 1996, **17**, 1906.
- [59] <https://ww3.tecan.com/platform/apps/datainterface/contentdata.asp?ID=3911&Conid=3752>
- [60] http://www.bd.com/contentmanager/b_article.asp?Item_ID=21921
- [61] <http://www.ffeservice.com>
- [62] M. Bier. U.S. Patent No 4, 204, **929**, 1980.
- [63] M. Bier. U.S. Patent No 4, 362, **612**, 1982.
- [64] M. Bier, G.E. Twitty, U.S. Patent No 4, 897, **169**, 1990.
- [65] J. Caslavská, P. Gebauer, W. Thormann, *Electrophoresis*, 1994, **15**, 1167.
- [66] M. Bier, *Electrophoresis*, 1998, **19**, 1057.
- [67] J. Margolis. U.S. Patent No 5, 039, **386**, 1991.
- [68] Z.S. Horvath, G.L. Corthals, C.W. Wrigley, J. Margolis, *Electrophoresis*, 1994, **15**, 968.
- [69] F.Z. Kong, Y. Yang, Y. Wang, G.Q. Li, S. Li, H. Xiao, L.Y. Fan, S.R. Liu, C.X. Cao, *J. Chromatogr. A*, 2015, **1422**, 318.
- [70] S. Chen, J.F. Palmer, W. Zhang, J. Shao, S. Li, L.Y. Fan, R. Sun, Y.C. Dong, C.X. Cao, *Electrophoresis*, 2009, **30**, 1998.
- [71] Y. C. Dong, J. Shao, X.Y. Yin, L.Y. Fan, C.X. Cao, *J. Sep. Sci.*, 2011, **34**, 1683.
- [72] J. Yan, C.G. Guo, X.P. Liu, F.Z. Kong, Q.Y. Shen, C.Z. Yang, J. Li, C.X. Cao, X.Q. Jin, *J. Chromatogr. A*, 2013, **1321**, 119.
- [73] C.Z. Yang, J. Yan, Q. Zhang, C.G. Guo, F.Z. Kong, C.X. Cao, L.Y. Fan, X.Q. Jin, *J. Sep. Sci.*, 2014, **37**, 1359.
- [74] Y. Yang, F.Z. Kong, J. Liu, J.M. Li, X.P. Liu, G.Q. Li, J.F. Wang, H. Xiao, L.Y. Fan, C.-X. Cao, S. Li, *Electrophoresis*, 2016, **37**, 1992.
- [75] M. Bier. U.S. Patent No 4, 588, **492**, 1986.
- [76] A.J.P. Martin, F. Hampson. U.S. Patent No 4, 243, **507**, 1981.
- [77] D.M. Faupel, P.G. Righetti. U.S. Patent No 4, 971, **670**, 1990.
- [78] P.G. Righetti, E. Wenisch, M. Faupel, *J. Chromatogr. A*, 1989, **475**, 293.
- [79] X. Zuo, D. W. Speicher, *Anal. Biochem.*, 2000, **284**, 266.
- [80] P. Lim, R. North, G. Vigh, *Electrophoresis*, 2007, **28**, 1851.
- [81] D. Ogle, A. Ho, T. Gibson, D. Rylatt, E. Shave, P. Lim, G. Vigh, *J. Chromatogr. A*, 2002, **979**, 155.
- [82] E. Shave, G. Vigh, *Electrophoresis*, 2007, **28**, 2291.
- [83] E. Shave, G. Vigh, *J. Chromatogr. A*, 2007, **1155**, 237.
- [84] P. Mattock, G.F. Aitchison, A.R. Thomson, *Sep. Purif. Rev.*, 1980, **9**, 1.
- [85] T. Melin, M. Poggel, *Chem. Eng. Sci.*, 2005, **60**, 6574.
- [86] C.F. Ivory, *Electrophoresis*, 2004, **25**, 360.
- [87] D. Bottenus, C.F. Ivory, *Biotechnol. Prog.*, 2006, **22**, 842.

- [88] D.E. Raymond, A. Manz, H.M. Widmer, *Anal. Chem.*, 1994, **66**, 2858.
- [89] Y. Xu, C.X. Zhang, D. Janasek, A. Manz, *Lab Chip*, 2003, **3**, 224.
- [90] B.R. Fonslow, M.T. Bowser, *Anal. Chem.*, 2005, **77**, 5706.
- [91] C.X. Zhang, A. Manz, *Anal. Chem.*, 2003, **75**, 5759.
- [92] H. Lu, S. Gaudet, M.A. Schmidt, K.F. Jensen, *Anal. Chem.*, 2004, **76**, 5705.
- [93] K. Macounová, C.R. Cabrera, P. Yager, *Anal. Chem.*, 2001, **73**, 1627.
- [94] J.W. Albrecht, K.F. Jensen, *Electrophoresis*, 2006, **27**, 4960.
- [95] L.J. Cheng, H.C. Chang, *Lab Chip*, 2014, **14**, 979.
- [96] D. Kohlheyer, G.A.J. Besselink, S. Schlautmann, R.B.M. Schasfoort, *Lab Chip*, 2006, **6**, 374.
- [97] Y.A. Song, L. Wu, S.R. Tannenbaum, J.S. Wishnok, J. Han, *Anal. Chem.*, 2013, **85**, 11695.
- [98] P. Novo, M. Jender, M. Dell'Aica, R.P. Zahedi, D. Janasek, *Procedia Eng.*, 2016, **168**, 1382.
- [99] B.R. Fonslow, V.H. Barocas, M.T. Bowser, *Anal. Chem.*, 2006, **78**, 5369.
- [100] H. Kobayashi, K. Shimamura, T. Akaida, K. Sakano, N. Tajima, J. Funazaki, H. Suzuki, E. Shino-hara, *J. Chromatogr. A*, 2003, **990**, 169.
- [101] F.J. Agostino, L.T. Cherney, V. Galievsky, S.N. Krylov, *Angew. Chemie - Int. Ed.*, 2013, **52**, 7256.
- [102] D. Janasek, M. Schilling, A. Manz, J. Franzke, *Lab Chip*, 2006, **6**, 710.
- [103] D. Kohlheyer, J.C.T. Eijkel, S. Schlautmann, A. Van Den Berg, R.B.M. Schasfoort, *Anal. Chem.*, 2008, **80**, 4111.
- [104] D. Kohlheyer, J.C.T. Eijkel, S. Schlautmann, A. Van Den Berg, R.B.M. Schasfoort, *Anal. Chem.*, 2007, **79**, 8190.
- [105] J.K. Park, C.D.M. Campos, P. Neužil, L. Abelmann, R.M. Guijt, A. Manz, *Lab Chip*, 2015, **15**, 3495.
- [106] M. Becker, C. Budich, V. Deckert, D. Janasek, *Analyst*, 2009, **134**, 38.
- [107] D. Janasek, M. Schilling, J. Franzke, A. Manz, *Anal. Chem.*, 2006, **78**, 3815.
- [108] D. Kohlheyer, J.C.T. Eijkel, A. van den Berg, R.B.M. Schasfoort, *Electrophoresis*, 2008, **29**, 977.
- [109] P. Novo, D. Janasek, *Anal. Chim. Acta*, 2017, **991**, 9.
- [110] R.T. Turgeon, M.T. Bowser, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2009, **394**, 187.

Praca wpłynęła do Redakcji 19 stycznia 2018

ŚLADY KRWI NA CAŁUNIE TURYŃSKIM: ANALIZA MATERIAŁOWA OD MIKRO DO NANOSKALI

BLOOD STAINS ON THE SHROUD OF TURIN:
MATERIALS SCIENCE ANALYSIS FROM MICRO TO
NANOSCALE

Jan S. Jaworski

*Wydział Chemiczny, Uniwersytet Warszawski
ul. Pasteura 1, 02-093 Warszawa
e-mail: jaworski@chem.uw.edu.pl*

Abstract

Wykaz stosowanych skrótów

Wprowadzenie

1. Wyniki badań śladów krwi zespołu STURP
2. Badania immunologiczne
3. Bezpośrednia obserwacja erytrocytów
4. Czerwone cząstki w obszarach plam krwi
5. Ślady wskazujące na uraz wielonarządowy
 - 5.1. Obecność barwników żółciowych
 - 5.2. Kompleks żelaza z kreatyniną

Uwagi końcowe

Podziękowania

Piśmiennictwo cytowane



Jan S. Jaworski emerytowany profesor Wydziału Chemiczno-Metaliowego Uniwersytetu Warszawskiego. Tytuł naukowy profesora w 1998 roku. W latach 1980–82 i 1994–95 na Uniwersytecie Guelph w Kanadzie. Wiceprezes Polskiego Towarzystwa Chemicznego (1998–2000). Obecnie mieszka w Gdańsku-Matarni. Autor 59 oryginalnych publikacji naukowych, kilkunastu prac przeglądowych (w tym 6 rozdziałów monograficznych w książkach w języku angielskim) i wielu popularyzatorskich. Zajmował się kinetyką elektrodową związków organicznych, reakcjami

następczymi jonodrobników, efektami rozpuszczalnikowymi, rozrywaniem wiązań węgiel-chlor, a ostatnio we współpracy ze specjalistami mikroskopii elektronowej i chromatografii badaniami pigmentów naturalnego bisioru. Uczestnik międzynarodowych konferencji syndonologicznych, od 35 lat popularyzuje badania fizykochemiczne Całunu Turyńskiego.

ABSTRACT

Modern experimental methods of materials science including optical and electron microscopy (SEM, ESEM, HRTEM), X-ray spectroscopy (EDX, WAXS), Raman and FTIR spectroscopy used in investigations of structures of new materials can be also successfully applied for analysis of archeological, cultural heritage and art objects. An interesting example of such analyses are investigations of microscopic fibers and particles taken previously from areas attributed to the blood on the Shroud of Turin. Detailed analyses performed by a number of research groups published in 2015–2017 are reviewed. They confirmed previous hypothesis on blood authenticity and discovered new evidences indicated a violence hidden behind the death. In particular, the presence of old red blood cells was documented by Lucotte [20], of bile pigment biliverdin by Laude and Fanti [28], of iron oxide cores of ferritin bounded to nanoparticles of creatinine by Carlino et al. [31]. The last result is typical for patients with severe polytrauma indicating at the unexpected nonosscopic level a tremendous suffering of the victim wrapped in the Shroud of Turin. Bigger particles of mineral pigments: ochre (iron oxide) and vermillion (mercury sulfide) were also found but they can be easily distinguished from blood particles using environmental electron microscopy ESEM with the back-scattered electrons detector [24]. The statistical analysis of a sample composition made by Fanti and Zagotto [24] indicated that 90–95% of the observed volume corresponds to the blood and only remainder represents inorganic pigments. Thus, it was proposed [24] that the original human blood on Shroud stains was much later reinforced by red pigments using a color dust without any binder and this hypothesis can easily explain controversies between previous results of different researches.

Keywords: Shroud of Turin, materials science, electron microscopy, creatinine

Słowa kluczowe: Całun Turyński, badania materiałowe, mikroskopia elektronowa, kreatynina

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

- | | |
|-------|---|
| BSE | - elektrony wstecznie rozproszone (ang. <i>Back-Scattered Electrons</i>) |
| EDX | - spektroskopia rentgenowska z dyspersją energii (ang. <i>Energy Dispersive X-rays Spectroscopy</i>) |
| ESEM | - środowiskowa skaningowa mikroskopia elektronowa (ang. <i>Environmental SEM</i>) |
| FTIR | - spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera (ang. <i>Fourier Transform Infrared</i>) |
| HRTEM | - TEM o wysokiej rozdzielczości (ang. <i>High-Resolution TEM</i>) |
| SEM | - skaningowa mikroskopia elektronowa (ang. <i>Scanning Electron Microscopy</i>) |
| WAXS | - szerokątowa mikrodyfraktometria rentgenowska (ang. <i>Wide Angle X-ray Scattering</i>) |
| STURP | - Projekt Badawczy Całunu Turyńskiego (ang. <i>Shroud of Turin Research Project</i>) |
| TEM | - transmisyjna mikroskopia elektronowa (ang. <i>Transmission Electron Microscopy</i>) |
| XRF | - fluorescencja w zakresie promieni X z dyspersją dлиgości fali (ang. <i>X-Ray Fluorescence</i>) |

WPROWADZENIE

Współczesne badania materiałowe w zakresie podstawowym i inżynierskim pozwalają na określanie struktury makroskopowej, krystalograficznej, molekularnej i atomowej różnorodnych materiałów zarówno syntetycznych jak i naturalnych, w tym biologicznych, stosując coraz to subtelniejsze metody fizykochemiczne, przede wszystkim mikroskopię elektronową, spektroskopię w różnym zakresie promieniowania, dyfrakcję elektronów, neutronów i promieni rentgenowskich. Badania takie stanowią podstawę poszukiwania nowych materiałów o określonych właściwościach, w tym nanomateriałów i biomateriałów. Jednak współczesne metody analizy strukturalnej są również wykorzystywane z powodzeniem do rozwiązywania zagadek z przeszłości: badań obiektów archeologicznych, historycznych czy dzieł sztuki. Dla chemika interesującym może być poznanie do jak wnikliwych wniosków mogą prowadzić najnowsze badania Całunu Turyńskiego wykorzystujące nowoczesne metody analizy.

Całun Turyński stanowi ręcznie utkane płótno lniane o długości 4,4 metra i szerokości 1,1 metra, na którym znajduje się wizerunek ciała mężczyzny, widziany z frontu i z tyłu, ze śladami odpowiadającymi ewangelicznym opisom męki Jezusa: biczowania, ukrzyżowania, przebicia boku i ranach na głowie [1]. Całun przechowywany jest od 1587 roku w Turynie, obecnie w postaci rozłożonej w zamkniętym relikwiarzu, w atmosferze argonu, z kontrolowaną temperaturą i wilgotnością. Chociaż jego dobrze udokumentowana historia sięga połowy XIV wieku, tradycja Kościoła Katolickiego utrzymuje, że jest to oryginalne płótno grobowe, w które zawinięto ciało Jezusa po śmierci krzyżowej. Wprawdzie autentyczność Całunu jest wciąż podważana, ale nie udało się nikomu rzetelnie wykazać, że jest to średnowieczne fałszerstwo, ani sporządzić kopii wizerunku o takich samych charakterystykach makro i mikroskopowych. Od końca XIX wieku intensywnie prowadzone są badania naukowe Całunu. Na początku analizowano ślady widoczne na zdjęciach fotograficznych. W XX wieku, przede wszystkim podczas kompleksowych badań bezpośrednich przeprowadzonych po dwuletnich przygotowaniach przez grupę 25 badaczy amerykańskich w 1978 roku w projekcie STURP wykorzystano nieniszczące metody mikroskopowe i spektroskopowe, a także pobrano próbki mikroskopijnych fragmentów z powierzchni płótna, które przykleły się do dociętych kawałków (ok. 5 cm²) taśmy przylepnej. Analizowano je następnie w USA w szerszym gronie naukowców a wyniki zostały opublikowane niezależnie przez różnych specjalistów w fachowych czasopismach. Całość badań fizykochemicznych podsumowano w artykule [2] (spopularyzowanym również w języku polskim [3]), w przeglądzie [4] i ostatnio w książce ówczesnego prezydenta STURP Jacksona [5]. Na Całunie Turyńskim znajdują się różne ślady o innym pochodzeniu i innych właściwościach fizykochemicznych, przede wszystkim: powierzchniowy, negatywowy wizerunek ciała, plamy krwi, ślady przypaleń i zacieki wodne. W niniejszym artykule ograniczę się tylko do czerwono-brązowych śladów, często o wyraźnych konturach, przypisywanych tradycyjnie krwi, którym towarzyszą przylegające do powierzchni włó-

kienek lnu mikroskopowe cząstki o barwie od czerwonej do pomarańczowożółtej, widoczne w dużej ilości zwłaszcza przy śladach ran.

Badania fizykochemiczne prowadzone są do dzisiaj. Największym problemem jest wyjaśnienie natury i sposobu powstania wizerunku ciała na płótnie, zwłaszcza, że ma on unikatowy charakter, niespotykany na żadnym innym płótnie, którego nie ma z czym porównać. Badanie śladów przypisywanych krwi jest też trudne i wymaga podejścia interdyscyplinarnego, gdyż krew rozpadać się może na różnorodne produkty a z powodu szczególnej ochrony Całunu, traktowanego jak relikwia, autentyczne próbki, nie dość że mikroskopijne, są wielką rzadkością. Wraca się więc ponownie do próbek pobranych w 1978 roku, mimo tego, że formalnie wydano wtedy zgodę tylko na jednorazowe badania. Uogólnienie wniosków z takich badań może być niepewne, z czego zdają sobie sprawę badacze. Niemniej w ostatnich latach podjęto kolejne badania, stosując coraz to subtelniejsze metody pomiarowe, znane z inżynierii materiałowej a dochodzące do rozdzieliczości dosłownie atomowych. W rezultacie rozwiązyano pewne wcześniejsze kontrowersje i potwierdzono niektóre hipotezy. Zanim do nich przejdę, przypomnę krótko najważniejsze wyniki wcześniejszych badań.

1. WYNIKI BADAŃ ŚLADÓW KRWI ZESPOŁU STURP

Już obserwacje bezpośrednie i przy 50-krotnym powiększeniu plam przypisywanym krwi na klatce piersiowej wizerunku, z tyłu na wysokości pasa i niektóre ślady na nogach, wskazywały na bezpośredni kontakt płótna z lepkim płynem, który wsiąkał w tkaninę na drodze efektu kapilarnego, również pod skrzyżowania nitek, z widocznym meniskiem i cementował niektóre włókna [1, 4–6]. W innych miejscach, na przykład na czole i włosach, plamy mają wyraźne kontury, są intensywniejsze na brzegach i nie zlepiają obszarów między włókienkami, musiały więc powstać na płótnie gdy krew już wysychała i nastąpiła retrakcja strupa. Heller i Adler badali w szczególności [6, 7] czerwono powleczone włókienka lnu o średnicy 10–15 μm , czerwone odłamki z tych powłok i kuliste czerwone lub pomarańczowe cząstki stałe o średnicach od ułamka do 3 μm obecne na powierzchni sześciu taśm przylepnych pobranych z obszarów przypisywanych krwi. Obecność przylegających do włókienek cząstek o różnej barwie zinterpretował później Adler [8] jako świadectwo oddzielania od surowicy składników krwi i ich agregacji, która zachodzi przy tworzeniu skrzepu. Podkreślał też, że ślady na Całunie są wysiękami ze skrzepów krwi mają więc inny skład niż powstałe z krwi świeżej, mogą zawierać mniej krvinek, co później potwierdzono. W badanych próbkach (a także po konwersji widma odbiciowego, zarejestrowanego bezpośrednio w Turynie) stwierdzono [6] silną absorpcję światła w zakresie 400–450 nm (jak dla kompleksów żelaza z układem porfirynowym). Pełne widmo absorpcji w zakresie 300–700 nm [9] podobne było do widma tlenku żelaza(III) oraz do widma całkowicie utlenionej hemoglobiny (methemoglobin) po denaturacji. Dodajmy, że widmo krwi zależy silnie od stanu

chemicznego i agregacji hemoglobiny. Z kolei fluorescencja w zakresie promieni X (XRF) pokazała [10] obecność większej ilości żelaza ($0\text{--}40 \mu\text{g cm}^{-2}$) w obszarach przypisywanych krwi w stosunku do reszty płotna, a także obecność wapnia. Później potwierdzono [7, 11, 12] spektroskopią rentgenowską EDX także obecność potasu. Na fotografiach fluorescencji w zakresie nadfioletu Miller i Pellicori zaobserwowali [13] intensywne świecenie marginesów wokół większości plam krwi, powstających z rzadszego płynu, który także cementował włókienka i który można było przypisać osoczu krwi. Obecność układu porfirynowego na mikroskopijnych włókienkach z Całunu Heller i Adler potwierdzili [6] redukując żelazo z hemu krwi parami hydrazyny, usuwając żelazo(II) parami kwasu mrówkowego i obserwując wzrokowo czerwoną fluorescencję powstałej porfiryny. Skuteczność takiej mikroanalizy (czułość ok. 1 ng) potwierdzili wpierw [6] na włókienkach z 300-letniej hiszpańskiej tkaniny lnianej, którą po nasączaniu krwią przechowywano przez rok.

W następnej pracy [7] Heller i Adler zakwestionowali wcześniejszą hipotezę o namalowaniu śladów krwi naturalnymi pigmentami (mieszanką ochry i cynobru z nośnikiem pochodzenia zwierzęcego) wysuniętą [14, 15] przez McCrone po identyfikacji mikroskopowej fragmentów tlenku żelaza i śladów siarczku rtęci na próbках z Całunu. Heller i Adler potwierdzili jakościowo obecność żelaza w próbках barwnymi testami mikroanalitycznymi. Rozróżnili jednak trzy rodzaje żelaza: drobiny Fe_2O_3 (dwójłomne, ze współczynnikiem załamania światła $n > 1,5$, rozpuszczalne na zimno w stężonym HCl a nie rozpuszczalne w mieszaninie enzymów, trudne do bezpośrednich badań z powodu małych rozmiarów od 0,7 do 1 μm), żelazo słabo związane z włóknami celulozy, występujące na całym obszarze płotna również poza plamami krwi (pewnie pochodzące z procesów jego produkcji) oraz żelazo silnie związane z hemem, występujące tylko w obszarach plam krwi w postaci cząstek o rozmiarach od submikrometrów do 3 μm i powłok na włókienkach, które można rozpuścić dopiero w wodzie królewskiej, nie wykazujące dwójłomności i mające współczynnik $n < 1,5$, co można wyjaśnić obecnością części białkowej. Czerwono pokryte włókienka i odłamki z ich pokrycia rozpuszczały się wolno w hydrazynie dając charakterystyczne różowe zabarwienie a w obecności roztworu cyjanków zmieniały kolor tworząc cyjanomethemoglobinę. Bilirubinę, pigment żółci powstający w katabolizmie hemu i wydzielający się w większej ilości w wyniku poważnego stresu urazowego, wykryto [7] otrzymując jej azopochodną o charakterystycznym niebieskim kolorze. Pozytywny test z zielenią bromokrezolową pozwolił na wykrycie powyżej 0,1 μg albuminy w żółto-pomarańczowych odłamkach, ale również w złoto-żółtych włókienkach z marginesów wokół plam krwi, potwierdzając przypuszczenie o obecności surowicy krwi. Białka oznaczono też czułym (do 1 ng) testem fluorescaminowym: zieloną fluorescencję w świetle UV obserwowało dla czerwonych i żółtych włókienek i czerwonych kulistych cząstek z obszarów plam krwi, a także cząstek brązowych z przypalonych śladów krwi, natomiast był on negatywny dla wszystkich włókienek i cząstek oddalonych od śladów krwi. Obecność bilirubiny związanej z albuminą oraz methemoglobinę potwierdzono później [16] widmami w podczerwieni FTIR. Mieszanina enzymów proteolitycznych (trypsyny,

chymotrypsyny, karboksypeptydazy i lizozymu o pH 8,4) rozpuszczała całkowicie w ciągu pół godziny czerwone i złoto-żółte pokrycia włókienek, wskazując odpowiednio na krew i jej surowicę a także rozpuszczała cząstki czerwone, natomiast brązowe z przypaleń tylko częściowo. Pod rozpuszczoną w ten sposób czerwoną powłoką na włókienkach z obszaru wizerunku nie stwierdzono jego obecności, co doprowadziło do wniosku [4, 7], że jego powstaniu zapobiegła wiązka wcześniejszej krew. Otrzymane wyniki wskazywały na obecność autentycznej krwi w badanych obszarach a wykluczały zdecydowanie użycie Fe_2O_3 jako barwnika [7]. Potwierdziła to również analiza kryminalistyczna śladów wycieku krwi i pasujących do nich obrazów ran oraz porównania mikroskopowe z materiałem kontrolnym [7].

2. BADANIA IMMUNOLOGICZNE

Do podobnej konkluzji na temat autentyczności krwi na Całunie w tym samym czasie co biofizyk Heller i chemik Adler w USA doszedł Baima Bollone, profesor medycyny sądowej Uniwersytetu w Turynie. Badał on ze współpracownikami 3–4 milimetrowe fragmenty włókienek bezpośrednio pobranych przez siebie z Całunu w 1978 roku [11, 12, 17, 18]. Działając na nie kwasem octowym otrzymał kryształki chlorowodorku hematyny (tzw. hemina Teichmanna-Stawiarskiego), a stosując testy immunologiczne potwierdził istnienie albuminy i immunoglobulin [11]. Obecność tej ostatniej potwierdzili także badacze amerykańscy [4] stosując ludzką anty-albuminę, ale wnioskowali ostrożnie, że musi to być krew przedstawiciela naczelnego, gdyż nie tylko krew ludzka zachowuje się podobnie w zastosowanych testach (por. dyskusję i odnośniki w [19]). Baima Bollone ze współpracownikami zastosowali dwie metody immunofluorescencji hematologicznej: poszukiwania aglutynin (czyli przeciwciał rozpuszczonych w osoczu) technikę De Dominicis-Latesa oraz poszukiwania aglutynogenów (czyli antygenów grupowych krwi układu AB0, które występują na powierzchni czerwonych krwinek) techniką aglutynacji miesanej, czyli ich nieodwracalnego zlepiania się z aglutyninami, co obserwowało pod mikroskopem optycznym [17]. Tylko badania drugą metodą dały pozytywny wynik dla próbki pobranej z obszaru krwi wypływającej z przebitego boku wskazując na obecność antygenów grupy A₁ i B. W dodatku po pokryciu powierzchni próbki warstwą złota metodą mikroskopii elektronowej SEM potwierdzono taką samą intensywność aglutynacji na włókienkach przeciwciał zarówno typu anty-A jak i typu anty-B [17]. Tymczasem kontrolne włókna z Całunu, leżące przy brzegu płotna poza obszarem plam krwi, dały w przypadku obu metod wynik negatywny. Autorzy wnioskowali więc, że krew na Całunie należy do grupy AB. W idealnym przypadku obie metody powinny dać taki sam rezultat, dlatego część badaczy uważa w dalszym ciągu, że grupa krwi nie została ostatecznie udowodniona i sugeruje przeprowadzenie nowszych testów immunologicznych [5, 19]. Zastosowanie następnie techniki wykorzystującej peroksydazę z chrzanu pozwoliło [12] zidentyfikować ludzką anty-immuno-globulinę G na kurzu z korków próbówek, w których przechowywano włókienka

pobrane z Całunu. Wreszcie w 1985 roku Baima Bollone z zespołem [18] badając nitki splamione krwią z rany prawej stopy otrzymali pozytywne testy na antygeny układu MNS, z których S jest charakterystyczny tylko dla ludzi; potwierdzili więc ostatecznie, że na Całunie znajduje się krew ludzka.

3. BEZPOŚREDNIA OBSERWACJA ERYTROCYTÓW

Po badaniach chemicznych, spektroskopowych i immunologicznych w XX wieku, które wskazały pośrednio na obecność krwi na Całunie Turyńskim, w ostatnich trzech latach podjęto analizę materiałową stosując najnowsze techniki. Lucotte, znany genetyk i współzałożyciel Instytutu Antropologii Molekularnej w Paryżu, opisał w 2015 roku bezpośrednią obserwację czerwonych krwinek, erytrocytów, w próbce z Całunu [20]. Erytrocyty krwi ludzkiej mają normalnie postać gładkiego dysku o średnicy 6,5–8,5 μm , wklęsnego z obydwu stron, o grubości przy krawędzi około 2 μm . Oprócz takich krwinek o normalnej morfologii, zwanych dyskocytami, w specjalnym atlasie opisano erytrocyty o zmienionych kształtach, także patologiczne: kuliste sferocyty, rozcięgnięte ovalocyty (albo eliptocyty), akantocyty (ang. *crenocite*) o karbowanej powierzchni, mikrocyty o średnicach mniejszych od 6 μm , a także fragmenty zniszczonych erytrocytów (*schizocyty*), by wymienić tylko te, które Lucotte zidentyfikował w próbce z Całunu. Dodajmy, że krwinki mają znaczną trwałość, a w ostatnich latach sporadycznie udało się nawet zbadać pozostałości krwi na szczątkach starożytnych mumii (literaturę cytuje Lucotte [20]). W swoich badaniach Lucotte dysponował szkiełkiem mikroskopowym z trójkątnym fragmentem taśmy przylepnej o podstawie 614 μm i wysokości 1,36 mm, która została przycięta w 1978 roku do śladu krwi na twarzy z Całunu, znajdującym się koło prawej brwi, tuż pod charakterystycznym wyciekiem w kształci litery ε . Na tym fragmencie Lucotte zaobserwował ponad 2,5 tysiąca cząstek o wielkości powyżej 1 μm , które kolejno bada ze współpracownikami. Analizowano między innymi minerały ilaste, metale, tekstylia, pyłki kwiatowe i zarodniki, a także szczątki ludzkie: fragment włosów, szczątki skóry i czerwone krwinki. Pozytywna identyfikacja każdego erytrocytu metodą SEM-EDX opierała się na określaniu odpowiedniego kształtu i średnicy cząstki, występowaniu intensywnych pików węgla i tlenu w widmie EDX, odpowiadających białkom z błony komórkowej krwinki i znacznie mniejszej zawartości pierwiastków charakterystycznych dla elektrolitów wewnętrz krwinki (Cl, K i Na), a niekiedy także obecności żelaza z hemoglobiny [20]. Lucotte zastosował nowszą metodę środowiskowej mikroskopii elektronowej ESEM, szczególnie dogodną dla próbek biologicznych, nie wymagającą nappylenia przewodzącej powłoki. Używał albo detektor elektronów wtórnych albo elektronów wstecznie rozproszonych (BSE). Po raz pierwszy opublikował zdjęcie SEM i widmo EDX pojedynczego erytrocytu ze świeżej krwi ludzkiej umieszczonego na bibule filtracyjnej a także po symulacji jego starzenia przez intensywne naświetlanie brzegów promieniami X [20]. W widmie pierwotnego erytrocytu obok typowych pierwiastków

z elektrolitów, wymienionych powyżej, zaobserwowano obecność siarki (monomery fibrynogenu, białka osocza krwi, połączone są wiązaniem dwusiarczkowym) i śladowe ilości fosforu (błona krwinki zawiera fosfolipidy) oraz azot. Natomiast po symulacji procesu starzenia widoczne były dodatkowe piki wapnia i żelaza oraz mniejsze glinu, magnezu i krzemiu. Odpowiada to procesom kalcyfikacji (zwapnienia) i silifikacji (tworzenia glinokrzemianów) w starzejącym się erytrocicie i te właśnie pierwiastki powinny być widoczne w starych próbkach krwi.

Lucotte zidentyfikował w sumie 25 erytrocytów [20], z czego część była w typowy sposób połączona ze sobą wkleśnymi powierzchniami w agregaty, uniemożliwiając dokładne ustalenie ich morfologii oraz rzeczywistej wielkości. Z pozostałych rozpoznał 4 okrągłe dyskocyty (o wielkości od 4 do 7,9 μm), 3 ovalocyty, 5 akantocytów, a także jeden sferocyt (wielkości 7–10 μm) i szczątki rozerwanej krwinki. W widmie każdej z 25 zbadanych krwinek stwierdził obecność wapnia i we wszystkich (z wyjątkiem jednego ovalocytu) obecność krzemiu, któremu towarzyszył magnez i najczęściej także glin. Taki wynik wskazuje na procesy częściowego zwapnienia i silifikacji, potwierdzając zaawansowany wiek próbki [20]. W zamieszczonych widmach EDX jedynie dla 6 erytrocytów widoczne są piki żelaza. Lucotte zwraca również uwagę na stosunkowo dużą ilość nieprawidłowych erytrocytów o karbowanych brzegach. W tym miejscu przypomina, że proces stopniowej, i częściowo odwrotnie, zmiany powierzchni erytrocytów z gładkiej na karbowaną, czyli przejścia od normalnych dyskocytów, poprzez akantocyty do echinocytów opisywano w literaturze medycznej jako wywołyany uszkodzeniami fizycznymi i chemicznymi krwinek podczas zabiegów kardiochirurgicznych i proponowano nawet określić Indeks Traumy na podstawie zmiany wyglądu czerwonych krwinek [21].

Dziewięć badanych erytrocytów, znajdujących się daleko od krawędzi próbki, Lucotte mógł obserwować również pod zwykłym mikroskopem optycznym. Większość z nich była jasna, z ciemniejszą krawędzią, a tylko jeden miał kolor czerwony i jeden czerwoną krawędź [20].

4. CZERWONE CZĄSTKI W OBSZARACH PLAM KRWI

Próbka badana przez Lucotte miała pod mikroskopem optycznym kolor czerwonobrunatny [20, 22], podobny do koloru większości śladow przypisywanych krwi na Całunie, oglądanych gołym okiem. Tej barwy nie tłumaczą wykryte erytocyty, mogłyby natomiast pochodzić od barwnych minerałów; szukano więc [22] śladow tlenków żelaza i cynobru, zgodnie z wynikami prac McCrone [14, 15]. Stosując mikroskopię optyczną (także ze spolaryzowanym światłem) oraz elektronową (ESEM-EDX) zidentyfikowano dwie cząstki hematytu, tlenku żelaza(III), z których jedna, w postaci płytka $6,5 \times 3,7 \mu\text{m}$ miała czerwone zabarwienie i charakterystyczne inklusje żelaza a druga pokryta była w większości osadem węglanu wapnia, maskującym jej kolor. Zidentyfikowano także za pomocą widma EDX [22] jedną cząstkę

cynobru, żółtą ze starości. Ponad to, po raz pierwszy w próbkach z Całunu stwierdzono [22] obecność siedmiu cząstek czerwonego biotytu, czyli zasadowych glikokrzemianów potasu, magnezu i żelaza, składnika wielu skał, o zawartości żelaza (decydującej o kolorze) różnej dla poszczególnych minerałów oraz kilka cząstek czerwono-brązowej ochry [22]. Autorzy ocenili, że wykryty materiał egzogenny, tzn. niepochodzący z organizmu ludzkiego, stanowi tak małą część powierzchni całej próbki badanej, że nie może wy tłumaczyć jej barwy [22]. Przypuszczają, że może ona pochodzić od mikrocząstek barwnych fosforanów albo wykrytych wcześniej minerałów ilastycznych [23] (montmorylonitu, illitu i ich mieszanin), wśród których aż 76 na sto pierwszych zidentyfikowanych cząstek zawierało żelazo. Ostateczna odpowiedź na pytanie skąd pochodzi kolor badanej próbki wymaga przede wszystkim analizy statystycznej rozkładu barwnych cząstek (uwzględniając produkty rozpadu erytroцитów) i to zagadnienie zostanie przedstawione dalej. Autorzy [22] wysunęli natomiast hipotezę, że cząstki biotytu, w większości leżące koło siebie, różniące się nieznacznie kolorem (w wyniku innej zawartości żelaza) musiały być kilkakrotnie sukcesywnie nakładane na płótno Całunu, by ożywić kolor plamy krwi, blednący z czasem. Zanieczyszczenia Całunu barwnymi pigmentami malarzkimi [7, 16] sugerowano już wcześniej w dyskusji z wynikami McCrone.

Nierozwiążany od ponad trzydziestu lat problem obecności śladów autentycznej krwi i czerwonych pigmentów nieorganicznych na Całunie Turyńskim podjęli ostatnio Fanti i Zagotto z Uniwersytetu w Padwie [24]. Ten pierwszy jest dziś jednym z najbardziej znanych i płodnych badaczy Całunu, którym zajmuje się od 20 lat i na temat którego opublikował, we współpracy z różnymi specjalistami, kilkadziesiąt artykułów naukowych. Mieli oni do dyspozycji taśmy przylepne z materiałem pobranym w 1978 roku z powierzchni Całunu z obszaru wizerunku przebitej stopy (zachodzący na wyciek krwi) i krwi na przegubie ręki a także z obszarów wizerunku poza plamami krwi oraz płótna poza wizerunkiem. Do dalszych badań wyekstrahowano z nich inkrustowane czerwonymi cząstками włókienka lniane i luźne fragmenty czerwonawych skorup z włókienek, w tym część rozproszonych w warstwie klejącej taśmy. Próbki te analizowano pod mikroskopem optycznym (w świetle przechodzącym, odbitym i spolaryzowanym), a 32 z nich analizowano także metodą mikroskopii elektronowej ESEM z detektorem BSE, sprzężonej z EDX. Przygotowano także trzy próbki kontrolne: włókna lniane nasączone świeżą krwią i po tygodniu dwie z nich dodatkowo ogrzewano przez minutę jedną w 200°C a drugą w 800°C, co przypuszczalnie odpowiada temperaturze, w jakiej znalazło się odpowiednio płótno Całunu i srebrny relikwiarz podczas pożaru w 1532 roku. Ponad to pobrano próbki, także stosując taśmę przylepną, z namalowanej w 1656 roku kopii Całunu Turyńskiego, poddawanej akurat konserwacji na Sycylii.

Autorzy [24] przede wszystkim wykazali, że spośród czerwono zabarwionych submikronowych cząstek widocznych pod mikroskopem optycznym te nieorganiczne można łatwo rozróżnić pod mikroskopem elektronowym z detektorem BSE. Cząstki nieorganiczne bowiem, zawierające ciężkie atomy, mają na zdjęciach białe

kolor, gdyż w detektorze BSE stosunek sygnału do szumu rośnie z liczbą atomową pierwiastków. Natomiast fragmenty krwi, zawierające dużą ilość znacznie lżejszych pierwiastków tworzących związki organiczne, są szare, słabiej widoczne na tle czarnego włókienka. To rozróżnienie potwierdzały widma EDX: cząstki tlenku żelaza zawierały głównie piki tlenu i żelaza (oraz węgla z taśmy mocującą próbkę) a cząstki pochodzące z krwi zawierały tlen, krzem i wapń oraz sód, chlor i potas. Identyfikację cząstek krwi potwierdziły podobne widma EDX dla próbki świeżej krwi, ale krew z Całunu miała więcej krzemu i znacznie więcej wapnia, a także magnez a nie było azotu. Autorzy nie dyskutują tych różnic, ale w świetle pracy Lucotte dotyczącej erytrocytów [20] może to wskazywać na procesy zwapnienia i silifikacji szczątków krwi po upływie długiego czasu. Pigmentów nie znaleziono na włókienkach z obszarów wizerunku, ale leżących daleko od śladów krwi. Po zanurzeniu barwnego włókienka w cieczy większość cząstek nieorganicznych ulegała rozproszeniu w całej objętości naczynia, w odróżnieniu od cząstek krwi, które pozostawały powiązane z włókienkami. Autorzy stwierdzili też doświadczalnie, że cząstki submikronowe są zbyt małe, by stanowiły skurczone erytrocyty.

Dla 14 próbek zarejestrowano także widma Ramanowskie po wzbudzeniu promieniowaniem o długości fali $\lambda_{\text{ex}} = 785 \text{ nm}$. Widać na nich typowe dla krwi pasmo przy 754 cm^{-1} brak natomiast pasma przy 601 cm^{-1} charakterystycznego dla czerwonej ochry. Kształt i położenie pików w widmie Ramana odpowiadało zwłaszcza próbce świeżej krwi ogrzewanej w 200°C . Z kolei czerwone mikrocząstki z próbek malowidła z 1656 roku zidentyfikowano jako tlenek żelaza i siarczek rtęci (niektóre wyraźnie zanurzone w organicznym nośniku zawierającym ponad 90% wagowych węgla i tlenu), ale nie znaleziono tam cząstek przypisywanych krwi.

Fanti i Zagotto dysponowali próbками z Całunu z dostatecznie dużą ilością mikrocząstek [24] aby zastosować statystyczną analizę otrzymanych wyników i wyjaśnić sprzeczne hipotezy wcześniejszych badaczy. Analiza pojedynczych zabarwionych włókienek, na których powierzchni wizualnie można było ocenić obecność w sumie około stu mikrocząstek pokazała, że średnio przynajmniej 90% całkowitej objętości zajmuje krew, poniżej 9,5% tlenek żelaza(III) i poniżej 0,5% siarczek rtęci. Natomiast wśród luźnych fragmentów czerwonej skorupy z włókienek rozproszonych w taśmie, analizowanych w pięciu mniejszych obszarach, przynajmniej 95% całkowitej objętości zajmuje krew a poniżej 5% tlenek żelaza, natomiast nie stwierdzono obecności HgS. Otrzymane wyniki wskazyły jednoznacznie, że w obszarach plam krwi na Całunie Turyńskim znajduje się w przeważającej ilości krew mocno związana z włókienkami płótna a dodatkowo w niewielkiej ilości czerwone pigmente nieorganiczne, nie powiązane żadnym nośnikiem malarstwa, które można łatwo usunąć przemywając taśmę ksylenem.

Dyskutując możliwe hipotezy kolejności umieszczenia obu rodzajów barwnych cząstek na płótnie i pamiętając o tym, że wizerunku ciała nie ma pod plamami krwi [4], autorzy uznają za najbardziej prawdopodobne [24], że krew z poranionego ciała wyciekła wpierw na płótno Całunu, a jej ślady, bledniejące przez wieki, zostały

wzmocnione czerwonymi pigmentami. Nie był to jednak zwykły proces malowania, gdyż brak jest śladów nośników malarskich, a farba nie przesiąkła w ogóle przez płótno. Autorzy sugerują więc [24], że artysta z powodu wyjątkowego charakteru Całunu traktowanego jako relikwia, dostał jedynie pozwolenie na dotknięcie płotna bawełnianym wacikiem nasączonego pigmentami. W dodatku, by wzmocnić wyblakłe plamy krwi, musiała to być pierwotnie mieszanina składająca się w większej ilości z jasnoczerwonego siarczku rtęci niż czerwono-brunatnej ochry. Ten skład mógł się z czasem zmienić, gdyż cząstki HgS łatwiej odpadają od włókien lnu.

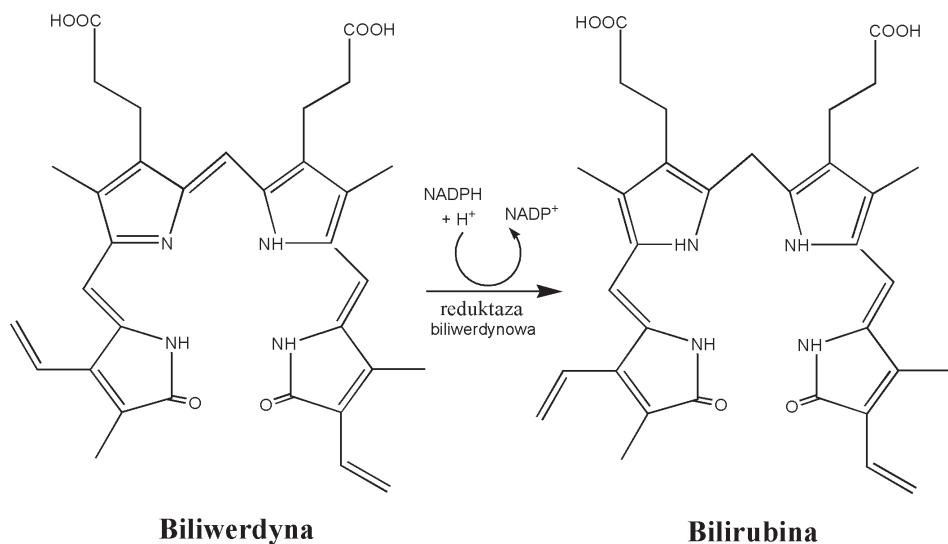
Propozycja wzmocnienia śladów autentycznej krwi mineralnymi pigmentami [24] wydaje się obecnie najbardziej zgodna z wynikami wszystkich dotychczasowych prac, tłumaczy też sprzeczne rezultaty poprzednich badaczy.

5. ŚLADY WSKAZUJĄCE NA URAZ WIELONARZĄDOWY

5.1. OBECNOŚĆ BARWNIKÓW ŻÓŁCIOWYCH

W swojej klasycznej pracy [7] Heller i Adler wykryli jakościowo w próbkach z Całunu obecność „barwników żółciowych, jak bilirubina” stosując metodę Jen-drassika i Grofa tworzenia barwnych pochodnych diazowych, ale nie jest to metoda specyficzna.

Przypomnijmy, że barwniki żółciowe powstają w katabolizmie hemoglobiny podczas eliminacji starych erytrocytów z organizmu. W takich procesach po odłączeniu z hemoglobiny zarówno części białkowej jak i utlenionych jonów żelaza(III) następuje rozerwanie pierścienia porfirynowego hemu pod wpływem oksydazy hemowej i powstaje zielona biliwerdyna. Ma ona budowę łańcucha, z mostkami $-CH=$ łączącymi pierścienie pirolowe i pirolidonowe (Schemat 1). Biliwerdyna redukowana jest (Schemat 1) do pomarańczowo-czerwonej bilirubiny, która we krwi tworzy z albuminą z osocza nierożpuszczalny kompleks, ulegający dalszym przemianom w wątrobie.



Schemat 1. Redukcja biliwerdyny do bilirubiny. Wzory nie pokazują rzeczywistych struktur przestrzennych z wewnętrzczasteczkowymi wiązaniami wodorowymi

Scheme 1. Reduction of biliverdin to bilirubin. Formulae do not show the real space structures with intramolecular hydrogen bonds

Obecność barwników żółciowych w próbkach plam krwi dyskutowała wielu autorów zajmujących się Całunem Turyńskim z dwóch powodów. Po pierwsze ich obecność potwierdzała powstanie tych śladów z rzeczywistej krwi i to pochodzącej od człowieka, który poddany został torturom. Zgodnie z hipotezą Adlера [8] tortury (biczwanie, ukrzyżowanie) wywołyły szok organizmu, a wiadomo, że może on doprowadzić do silnej hemolizy hemoglobiny i w rezultacie do pojawienia się w krwi dużego stężenia bilirubiny. Gdy z tak uszkodzonej krwi tworzył się skrzep, w jego głębi pozostały krwinki nieuszkodzone a wysącz zawierał znaczne ilości bilirubiny związanej z albuminą osocza [8]. Taki scenariusz potwierdzili później patologowie [25].

Po drugie krew z Całunu ma czerwoną barwę podczas gdy po upływie czasu powinna ulec utlenieniu tworząc brązową methemoglobinę, którą rzeczywiście wykryto [7, 8, 16]. Adler jako pierwszy postulował, że mieszanina brązowej methemoglobiny i pomarańczowo-czerwonej bilirubiny dała obserwowany na Całunie czerwony kolor. Próby doświadczalnego potwierdzenia tej hipotezy nie powiodły się [25], ale obserwacje prowadzono tylko cztery miesiące. Pellicori po rozkręceniu kawałka nitki odkrył, że krew na włókienkach wewnętrznych jest brązowa, a na zewnętrznych pozostała czerwona. Diane Soran ze STURP sugerowała więc wpływ roztworu mydlnicy (*Saponaria officinalis*, w której zwykle moczono płótno podczas produkcji by nadać mu giętkość) na hamowanie hemolizy krwi; przygotowane przez nią próbki przetrwały ponad 26 lat bez zmiany koloru [25]. Jednak nie wykryto na płótnie żadnych produktów hydrolizy saponin. Wysuwano również

hipotezy hamowanie procesów starzenia krwi przez mirrę i aloes ([13], por. nowszą dyskusję w [25]) oraz wpływ promieniowania neutronowego i UV [26], a ostatnio [27] sugerowano utworzenie na Całunie różowo-czerwonego laku przez barwniki zaprawowe (głównie alizarynę i purpurynę) z marzany barwierskiej *Rubia tinctorium* (w roztworze której zwykle moczono płótno) ze składnikami hemu. Generalnie jednak problem barwy plam krwi nie został rozwiązany.

Obecność barwników żółci analizowali ostatnio Laude i Fanti [28] na włókienku o długości około 3 mm i średnicy 15 μm z taśmy przylepnej, którą w 1978 roku dociśnięto do ślądu krwi na stopie wizerunku na Całunie Turyńskim i którą badano już wcześniej [24]. Obserwacja pod mikroskopem optycznym wskazała, że włókienko pokryte jest pomarańczowo-żółto-brązową warstwą o grubości około 2 μm . Materiał tej warstwy identyfikowano [28] stosując spektroskopię Ramanowską oraz analizę ESEM-EDX. Badana powłoka zawierała przede wszystkim węgiel (83,44% atomowych) i tlen (13,45%) oraz w ilościach poniżej 1% Fe, Si, Na i ślady innych pierwiastków.

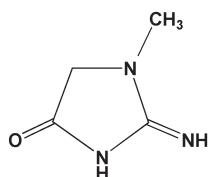
W wyniku wzbudzenia laserem argonowym o długości fali $\lambda_{\text{ex}} = 514,5 \text{ nm}$ zaobserwowano znaczną fluorescencję z maksimum około 584 nm oraz szereg linii Ramanowskich, szczególnie wyraźnych w zakresie liczb falowych 1100–1700 cm^{-1} . Porównywano je z literaturowymi widmami Ramanowskimi hipotetycznych czerwonawych pigmentów naturalnych i syntetycznych oraz próbek hemoprotein, methemoglobin, oksy- i deoksyhemoglobin i wysuszonej krwi a także bilirubiny. Większość obserwowanych linii nie miała swoich odpowiedników. Jedynie dwie zbliżone linie znaleziono dla porfiryn i ich pochodnych oraz krwinek ze starożytnych próbek oraz cztery linie dla bilirubin rejestrówanych w różnych warunkach. Wyniki wskazywały na obecność pierścieni pirolowych, grupy karbonylowej i drgań skręcających γ -laktamu; nie wykluczały więc niewielkiej ilości bilirubiny, nadającej kolor, ale główny składnik musiał być inny. Z kolei porównanie linii w zakresie 1680–1685 cm^{-1} z widmem albuminy surowicy ludzkiej wskazało obecność drgań rozciągających amidu I, charakterystycznego dla białek. Bardziej owocne było porównanie z widmami pięciu syntetycznych pochodnych biliwerdyny [29]: każda z 9 wyraźnych linii obserwowanych w próbce z Całunu miała zbliżone odpowiedniki w kilku widmach literaturowych mimo innej długości fali wzbudzenia ($\lambda_{\text{ex}} = 1064 \text{ nm}$) i w konsekwencji braku fluorescencji. Jednak porównanie z widmami literaturowymi obu barwników po zbliżonym wzbudzeniu ($\lambda_{\text{ex}} = 532 \text{ nm}$) pokazało dużą intensywność linii przy 1399 cm^{-1} jak dla bilirubiny [30]. Dodajmy, że położenia linii pigmentów żółci w środowisku biologicznym zależą od ich oddziaływań z białkami. Autorzy konkludują [28], że próbka badana zawiera oba produkty rozpadu hemu: biliwerdynę z niewielką domieszką bilirubiny. Wyznaczony metodą EDX stosunek wagowy pierwiastków O/C i Fe/C odpowiada mieszaninie zawierającej 67,9% biliwerdyny i/lub bilirubiny oraz 32,1% hemoglobiny (lub produktów jej rozpadu). Otrzymane wyniki potwierdzają hipotezę o obecności na płótnie Całunu autentycznej krwi i produktów jej rozpadu.

5.2. KOMPLEKS ŻELAZA Z KREATYNINĄ

W czerwcu 2017 roku włoski zespół badaczy z Triestu, Bari i Padwy kierowany przez Carlino [31] opublikował wyniki badań z rozdzielczością atomową dwumilimetrowego włókienka z taśmy przylepnej z obszaru wizerunku przebitej stopy na Całunie, którą już wcześniej badano [24, 28]. Autorzy zastosowali [31] mikrodyfraktometrię rentgenowską WAXS oraz mikroskopię elektronową wysokiej rozdzielczości HRTEM, ulepszoną wcześniej w ich zespole, pozwalającą otrzymywać bezpośrednie obrazowanie próbki badanej z rozdzielczością przestrzenną $0,19\text{ nm}$ stosując przy tym gęstość prądu zaledwie 1 pA/cm^2 , co jest istotne dla materiałów bardzo czułych na działanie wiązki elektronowej. Obrazy HRTEM pozwalają na bezpośredni pomiar periodyczności prążków interferencyjnych odpowiadających odległościom międzypłaszczyznowym sieci krystalicznej. Włókienko umieszczone na siatce miedzianej pokrytej błonką amorficznego węgla i obserwowano jego powierzchnię poza obszarami pokrytymi czerwonymi częstkkami zidentyfikowanymi poprzednio jako krew [24]. Analiza fazowa dyfraktogramu WAXS z obszaru $1,22 \times 1,22\text{ mm}^2$ pokazała podobieństwo wykresu zależności natężenia refleksów od kąta ugięcia z wykresem krzywej teoretycznej dla dwóch struktur celulozy, ale ze znacznie większą szerokością połówkową głównego maksimum. Takie pogrubienie piku wyjaśniono występowaniem defektów struktury celulozy związanych z wiekiem Całunu i potwierdzono analizą próbki włókien celulozy z VI wieku. Z kolei obrazy HRTEM pokazały, że włókienko jest całkowicie pokryte częstkkami o rozmiarach od 30 nm do 100 nm, które w środku miały wiele jeszcze mniejszych częstek (z większym kontrastem, tzn. ciemniejszych na zdjęciach) o rozmiarach od 2 do 6 nm. Analiza EDX dużych częstek wskazała na obecność pierwiastków (Ca, O, C, N, Fe, S, K, Cl) o składzie podobnym do ferrytyny, natomiast nie można było przeprowadzić takiej analizy dla częstek mniejszych. Oba rodzaje częstek miały cechy krystaliczne, co pozwoliło na ich identyfikację. Dyfraktogramy pojedynczych mniejszych częstek odpowiadały kryształom uwodnionych tlenków żelaza(III). W szczególności symetria i odległość międzypłaszczyznowe odczytane z dyfraktogramu po transformacji Fouriera były zgodne z symulowanymi dla najbardziej krystalicznej formy (z sześcioma liniami na dyfraktogramie) minerału ferrihydrytu. Strukturę ferrihydrytu proponowano [32, 33] dla rdzenia ferrytyny, metaloproteiny gromadzącej jony żelaza(III) w organizmie, której stężenie w osoczu krwi wzrasta w odpowiedzi na stan zapalny i stres, wywołany na przykład zbyt małym stężeniem tlenu na poziomie tkanek (hypoxia), możliwym podczas przeżyć traumatycznych. Sugerowało to pochodzenie biologiczne nanoczęstek żelaza na włókienku Całunu, a wykluczało średniowieczne pigmente malarskie, które mają rozmiary mniej więcej sto razy większe [24], a rozdrobnione powinny tworzyć ze sobą agregaty.

Zespół Carlino [31] analizując otrzymane obrazy HRTEM zwrócił uwagę na brak odległości międzypłaszczyznowej $d = 0,25\text{ nm}$ charakterystycznej dla tlenków żelaza w ferrihydrycie i rdzeniu ferrytyny, podczas gdy zgadzały się inne odległości. Tłumienie piku dyfrakcji odpowiadającemu $d = 0,25\text{ nm}$ dla nanoczęstek tlenku

żelaza Fe_3O_4 spowodowane ich powiązaniem siłami van der Waalsa z kreatyniną i mocznikiem widać na dyfraktogramach w pracy [34] dotyczącej usuwania za pomocą dodawanych nanocząstek szkodliwych odpadów z krwi podczas dializy. Tworzenie kompleksów żelaza z kreatyniną wykorzystano też później do budowy czujnika elektrochemicznego [35]. Carlino z zespołem [31] próbowali więc zidentyfikować większe nanocząstki na powierzchni włókienka z Całunu porównując otrzymane dyfraktogramy z symulowanymi dla mocznika i kreatyniny. Tylko w drugim przypadku stwierdzili dobrą zgodność. Udowodnili więc [31], że włókienko lnu z Całunu pokryte jest nanocząstками kreatyniny o rozmiarach 30–100 nm wewnętrz których znajdują się mniejsze 2–6 nm cząstki, stanowiące uwodnione tlenki żelaza o strukturze rdzenia ferrytyny. W jaki sposób mogła powstać taka struktura?



Schemat 2. Kreatynina, bezwodnik kreatyny
Scheme 2. Creatinine, creatine anhydride

Kreatynina (Schemat 2) występuje głównie wmięśniach człowieka, gdzie powstaje z rozpadu fosforanu kreatyny. Transportowana jest następnie przez krew do nerek i normalnie wydalana z moczem. Stężenie kreatyniny (wmięśniach i kolejno we krwi) wzrasta podczas intensywnych ćwiczeń mięśni, ale jeszcze silniej wzrasta w stanach patologicznych. Carlino ze współpracownikami [31] odwołali się do opublikowanych wyników badań ofiar śmiertelnych wypadków i tortur, prowadzących do rabdomiolizy, wywołanej masywnym rozpadem tkanki mięśniowej podczas urazów i wydzieleniem jej zawartości do krwi. U pacjentów z objawami ostrej niewydolności nerek po wypadkach (motoryzacyjnych, stratowaniu, upadkach itp.) [36] oraz po urazach mięśni szkieletowych [37] stwierdzono znaczny wzrost kreatyniny w osoczu krwi, który staje się świadectwem poważnego urazu wielonarządowego. Z kolei kreatynina tworzy kompleksy z żelazem [33, 35] wychwytywanym przez ferrytynę ze zniszczonych krwinek. Otrzymane przez Carlino ze współpracownikami wyniki pomiarów w nanoskali potwierdzają [31] autentyczność śladów krwi na Całunie Turyńskim i wskazują na patologiczny charakter osocza zawierającego znaczne ilości nanocząstek kreatyniny wiążącej mniejsze cząstki żelaza, co jest typowe dla przeżyć traumatycznych i potwierdza śmierć pod wpływem przemocy mężczyzny, którego wizerunek utrwalony został na Całunie Turyńskim.

UWAGI KOŃCOWE

Warto jeszcze raz podkreślić, że wnioski wyciągane z badań mikroskopowych fragmentów próbek pochodzących z Całunu Turyńskiego trudno uogólniać na inne ślady przypisywane krwi. Wycieki krwi z różnych ran miały kontakt z płótnem po innym czasie, mają więc nieco inne charakterystyki fizykochemiczne. Zdawano sobie z tego sprawę już podczas zwykłych oględzin płótna. Bardziej kompleksową analizę opartą na charakterystyce chromatycznej ślądów krwi przeprowadzono w 2015 roku [38, 39] na kolorowej fotografii cyfrowej Całunu Turyńskiego G. Durante z 2002 roku o wielkości 6996×24197 pikseli. Analiza kolorymetryczna udziału poszczególnych kolorów na zdigitalizowanym zdjęciu [38] pozwoliła ilościowo odróżnić ślady krwi od innych plam i wykazać podobieństwo ślądów z głębokich ran w boku i w stopach, odmiennych od ślądów krwi z bicowania. Z kolei dla wszystkich ślądów krwi analiza poziomu chromatycznego odpowiadającego pikselem czerwonym, zielonym i niebieskim, R, G i B, pozwoliła na wykresie R/B wzgledem R/G rozróżnić sześć odmiennych obszarów [39], które powstały w różny sposób: przez bezpośredni kontakt krwawiącej rany z płótnem, kontakt płótna z krwią na skórze ulegającą procesom fibrynlizy, przez kapilarną dyfuzję krwi, w postaci kropel skoagulowanej krwi oraz jako ślady osocza krwi. Otrzymane wyniki [38, 39] należy brać pod uwagę zarówno przy próbach uogólnienia analiz przeprowadzonych na wyrywkowych mikroskopijnych próbках przedstawionych w niniejszym przeglądzie, jak i przede wszystkim sugerując dalsze badania.

Podsumowując przegląd najnowszych analiz plam krwi na płótnie Całunu należy podkreślić, że zastosowanie coraz to doskonalszych technik pomiarowych z arsenalu inżynierii materiałowej, o coraz większej rozdzielnosci, prowadzi do wyników, które w żaden sposób nie zaprzeczają autentyczności krwi na Całunie Turyńskim. Przeciwnie, najnowsze odkrycia wskazujące na poziomie nanoskopowym na przejścia traumatyczne mężczyzn, którego ciało po śmierci owinięto w Całun, powodują, że hipoteza o średniowiecznym fałszerstwie staje się jeszcze mniej prawdopodobna. Nie wszystkie rezultaty omówione tutaj pasują całkowicie do siebie, na pewno wszystkie powinny być potwierdzone w niezależnych badaniach, najlepiej na nowych próbках z innych obszarów Całunu. Dodajmy, że w ostatnich latach opublikowano szereg prac biochemicalnych i medycznych dotyczących metabolizmu hemu i tworzenia biliwerdyny (m.in. wpływu niektórych saponin oraz bakterii) i pożądany jest przedyskutowanie w ich świetle wyników ostatnich badań próbek z Całunu Turyńskiego. Można też przypuszczać, że obraz na Całunie kryje jeszcze inne subtelne tajemnice, które naukowcy będą poznawać wraz z dalszym rozwojem metod analizy.

PODZIĘKOWANIA

Autor wyraża podziękowanie dr hab. Tomaszowi Wierzba z Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego za medyczną konsultację artykułu oraz prof. dr hab. T. Markowi Krygowskiemu z Uniwersytetu Warszawskiego za inspirujące uwagi.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] P. Baima Bollone, Całun Turyński, 101 pytań i odpowiedzi, WAM, Kraków, 2002.
- [2] L.A. Schwalbe, R.N. Rogers, *Anal. Chim. Acta*, 1982, **135**, 3.
- [3] J.S. Jaworski, *Przegląd Powszechny*, 1983, **743/744**, 109.
- [4] E.J. Jumper, A.D. Adler, J.P. Jackson, S.F. Pellicori, J.H. Heller, J.R. Druzik, [w:] *ACS Advances in Chemistry, Archeological Chemistry-III*, J. B. Lambert (Red.), 1984, **205**, 447.
- [5] J. Jackson and The Turin Shroud Center of Colorado, *The Shroud of Turin, A Critical Summary of Observations, Data, and Hypotheses*, R. Sieffker (Red.), 2017.
- [6] J.H. Heller, A.D. Adler, *Appl. Optics*, 1980, **19**, 2742.
- [7] J.H. Heller, A.D. Adler, *Can. Soc. Forensic Sci. J.*, 1981, **14**, 81.
- [8] A. Adler, *Shroud Spectrum Inter.*, Special Issue, 2002, 59.
- [9] R. Gilbert, M.M. Gilbert, *Appl. Optics*, 1980, **19**, 1930.
- [10] R.A. Morris, L.A. Schwalbe, J.R. London, *X-Ray Spectr.*, 1980, **9**, 40.
- [11] P. Baima Bollone, M. Jorio, A.L. Massaro, Sindon, 1981, **30**, 5.
- [12] P. Baima Bollone, A. Gaglio, Sindon, 1984, **33**, 9; wersja ang. *Shroud Spectrum Inter.*, 1984, **13**, 3.
- [13] V.D. Miller, S.F. Pellicori, *J. Biol. Phot.*, 1981, **49**, 71.
- [14] W. C. McCrone, C. Skirius, *Microscope*, 1980, **28**, 105.
- [15] W.C. McCrone, *Acc. Chem. Res.*, 1990, **23**, 77.
- [16] A.D. Adler, [w:] *Archeological Chemistry: Organic, Inorganic and Biochemical Analysis*, M.V. Orna (Red.), ACS Symposium Series, 1996, **625**, 223.
- [17] P. Baima Bollone, M. Jorio, A.L. Massaro, Sindon, 1982, **31**, 5; wersja ang. *Shroud Spectrum Inter.*, 1983, **6**, 3.
- [18] P. Baima Bollone, A. Gaglio, C. Grillo, A. Zanin, Sindon, 1985, **34**, 9.
- [19] K.P. Kearse, *Blood on the Shroud of Turin: An immunological Review*, 2012, 1-22. Dostępny w Internecie: <http://www.shroud.com/pdfs/kearse.pdf>.
- [20] G. Lucotte, *Jacobs J. Hemat.*, 2015, **2**, 024.
- [21] K.L. Black, R.D. Jones, *Ohio J. Sci.*, 1976, **76**, 225; cyt. za ref. [20].
- [22] G. Lucotte, T. Derouin, T. Thomasset, *Open J. Appl. Sci.*, 2016, **6**, 601.
- [23] G. Lucotte, *Sci. Res. Essays*, 2012, **7**, 2545.
- [24] G. Fanti, G. Zagotto, *J. Cultural Heritage*, 2017, **25**, 113.
- [25] N. Svensson, T. Heimburger, *Sci. Res. Essays*, 2012, **7**, 2513.
- [26] C. Goldoni, [w:] *The Shroud of Turin: Perspectives on a Multifaceted Enigma*, Proceedings of the 2008 Columbus International Conference, G. Fanti (Red.), 2008, 442.
- [27] A.A.M. van der Hoeven, *Open J. Appl. Sci.*, 2015, **5**, 705.
- [28] J.P. Laude, G. Fanti, *Appl. Spectr.*, 2017, **71**, 2313.
- [29] J. Hu, D. Moigno, W. Keifer, J. Ma, Q. Chen, C. Wang, H. Feng, J. Shen, F. Niu, Y. Gu, *Spectrochim. Acta, A*, 2000, **56**, 2365.
- [30] B. Yang, R.C. Taylor, M.D. Morris, *Spectrochim. Acta, A*, 1993, **49**, 1735.
- [31] E. Carlino, L. De Caro, C. Giannini, G. Fanti, *PLOS ONE*, 2017, **12**, e0180487.

- [32] P.M. Harrison, F.A. Fischbach, T.G. Hoy, G.H. Haggis, *Nature*, 1967, **216**, 1183.
- [33] C. Quintana, J.M. Cowley, C. Marhie, *J. Struct. Biol.*, 2004, **147**, 166.
- [34] B. Banerji, S.K. Pramanik, *Springer Plus*, 2015, **4**, 708.
- [35] V. Kumar, S. Hebbal, R. Kalam, C. Panwar, S. Prasad, S.S. Srikanta, P.R. Krishnaswamy, N. Bhat, *IEEE Sensors J.*, 2018, **18**, 830.
- [36] K.L.S. de Abreu, G.B. Silva Júnior, A.G.C. Barreto, F.M. Melo, B.B. Oliveira, R.M.S. Mota, N.A. Rocha, S.L. Silva, S.M.H.A. Araújo, E.F. Daher, *Indian J. Crit. Care Med.*, 2010, **14**, 121.
- [37] J.G. Schwartz, T.J. Prihoda, J.H. Stuckey, C.L. Gage, M.L. Damell, *Clin. Chem.*, 1988, **34**, 898.
- [38] C. Privitera, *MATEC Web of Conferences*, 2015, **36**, 02002. Dostępny w Internecie: <http://dx.doi.org/10.1051/matecconf/20153602002>.
- [39] G. Bedon, M. Linguanotto, I. Simionato, F. Zara, *MATEC Web of Conferences*, 2015, **36**, 02003. Dostępny w Internecie: <http://dx.doi.org/10.1051/matecconf/20153602003>.

Praca wpłynęła do Redakcji 20 lutego 2018

INFORMACJE

INFORMACJE REDAKCJI „WIADOMOŚCI CHEMICZNYCH”

CENY PRENUMERATY NA ROK 2018

Redakcja miesięcznika PTChem „Wiadomości Chemiczne” zawiadamia, że wysokość prenumeraty rocznej „Wiadomości Chemicznych” za 2018 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 2018 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





Szanowni Państwo,

w imieniu organizatorów zapraszamy do udziału w konferencji „XII Copernican International Young Scientists Conference” (XII CIYSCon), która odbywać się będzie w dniach 28–29 czerwca 2018 r. w Toruniu, na Wydziale Chemii UMK.

XII CIYSCon, stanowi kontynuację, organizowanego od roku 2008 roku, Kopernikańskiego Seminarium Doktoranckiego. Organizowane seminaria mają charakter interdyscyplinarny oraz kierowane są przede wszystkim do młodych adeptów nauki z Polski i Europy, realizujących swoje badania w zakresie chemii, fizyki, nauk technicznych, farmacji, medycyny, biologii oraz innych szeroko pojętych nauk przyrodniczych.

Podczas XII CIYSCon uczestnicy zaprezentują wyniki swoich badań w formie ustnych wystąpień lub posterów na trwających równocześnie sekcjach: nauk chemicznych (Analytical chemistry, Chemical technology & organic chemistry, Inorganic & coordination chemistry) biologicznych i medycznych (Environmental science, Molecular biology & medical science) oraz techniczno-fizycznych (Thermodynamics, simulations, quantum mechanics & optoelectronics). Najlepsze wystąpienia ustne oraz postery będą nagradzane przez komisje oceniające. Celem spotkania będzie nie tylko wymiana doświadczeń i zapoznanie się z tematyką badawczą kolegów, ale przede wszystkim możliwość bezpośredniej wymiany pomysłów, wspólnych dyskusji i nawiązania współpracy międzyuczelnianej.

Więcej informacji można znaleźć na stronie internetowej <http://ciyscon.umk.pl/>.

**KONKURS KRAKOWSKIEGO ODDZIAŁU
POLSKIEGO TOWARZYSTWA CHEMICZNEGO
NA NAJLEPSZY ARTYKUŁ PRZEGŁĄDOWY
W RAMACH KONFERENCJI STUDENCKIEJ
„HORYZONTY NAUKI – FORUM PRAC DYPLOMOWYCH”**

Zapraszamy do udziału w konkursie Krakowskiego Oddziału Polskiego Towarzystwa Chemicznego.

Celem konkursu jest nagrodzenie wyróżniających się prac przeglądowych przygotowanych przez studentów, uczestników konferencji studenckiej „Horyzonty Nauki – Forum Prac Dyplomowych”, poprzez ich opublikowanie w czasopiśmie Polskiego Towarzystwa Chemicznego „Wiadomości Chemiczne”. Aby zgłosić artykuł należy zaznaczyć chęć udziału w konkursie na formularzu zgłoszeniowym konferencji oraz, wraz z abstraktem prezentacji konferencyjnej, przesyłać organizatorom Horyzontów Nauki przygotowany manuskrypt do **8 maja 2018 r.** Zgłoszane prace muszą być zgodne z wytycznymi zawartymi w regulaminie. Więcej informacji można znaleźć na stronie: <http://www.horyzontynauki.uj.edu.pl/biezaca-edycja/konkurs>.

**PATRONAT MEDIALNY PUBLIKACJI KSIĄŻKOWYCH
WYDAWNICTWA NAUKOWEGO PWN SA**

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

Maria Cieślak-Golonka, Jan Starosta, Anna Trzeciak
Chemia koordynacyjna w zastosowaniach

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

Gottfried W. Ehrenstein, Żaneta Brocka-Krzemińska
Materiały polimerowe. Struktura, właściwości, zastosowanie

Witold M. Lewandowski, Robert Aranowski
Technologie ochrony środowiska w przemyśle i energetyce

Praca zbiorowa pod redakcją Zdzisława E. Sikorskiego i H. Staroszczyk
Chemia żywności
t. 1 *Składniki żywności oraz*
t. 2 *Biologiczne właściwości składników żywności*

John McMurry, z ang. tłumaczyli Henryk Koroniak, Jakub Grajewski, Katarzyna Koroniak-Szejn, Jan Milecki
Chemia organiczna (tom 1-5)

W najbliższych numerach czasopisma „Wiadomości Chemiczne” ukażą się recenzje następujących książek objętych planem wydawniczym PWN na rok 2018

R. Zarzycki, G. Wielgosiński
Technologie i procesy ochrony powietrza

Takemura Masaharu
Mangowy przewodnik. Biochemia

Krzysztof Schmidt-Szałowski, Krzysztof Krawczyk, Jan Petryk, Jan Sentek
Obliczenia technologiczne w przemyśle chemicznym

Andrzej Żarczyński
Emisje organicznych związków chloru. Źródła, oddziaływanie na środowisko i przeciwdziałanie

Praca zbiorowa
Inżynieria metali i ich stopów. Wyd. 2 zm. (I w PWN)

Renata Jastrząb Współautorzy: Romualda Bregier-Jarzębowska, Małgorzata Kaczmarek, Martyna Nowak
Zbiór zadań z podstaw chemii

Praca zbiorowa
Ochrona środowiska dla inżynierów

Zygfryd Witkiewicz, Waldemar Wardencki
Chromatografia gazowa. Wyd. 3 (I w PWN)

red. nauk. Anna Goździcka-Józefiak
Wirusologia

Lubert Stryer
Biochemia. Wyd. 5

**LISTA RECENZENTÓW WSPÓŁPRACUJACYCH Z REDAKCJĄ
WIADOMOŚCI CHEMICZNE W LATACH 2015–17**

prof. dr hab. Grażyna Bator
Wydział Chemii, Uniwersytet Wrocławski

prof. dr hab. inż. Barbara Becker
Politechnika Gdańsk, Wydział Chemiczny

dr n. farm. Barbara Bednarczyk-Cwynar
Zakład Chemii Organicznej UM w Poznaniu

prof. zw. dr hab. inż. Stanisław Błażewicz
Akademia Górnictwo-Hutnicza im. Stanisława Staszica w Krakowie; Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki; Katedra Biomateriałów

prof. dr hab. Stanisław Boryczka
Śląski Uniwersytet Medyczny, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej w Sosnowcu, Katedra i Zakład Chemii Organicznej

prof. dr hab. Andrzej Bojarski
Instytut Farmakologii Polskiej Akademii Nauk

prof. dr hab. Ewa Joanna Bulska
Uniwersytet Warszawski; Wydział Chemii

prof. zw. dr hab. inż. Bogdan Burczyk
Politechnika Wrocławskiego; Wydział Chemiczny; Instytut Technologii Organicznej i Tworzyw Sztucznych

prof. zw. dr hab. Bogusław Buszewski
Wydział Chemii UMK, Katedra Chemii Środowiska i Bioanalizy

dr hab. Michał Bystrzejewski
Uniwersytet Warszawski, Wydział Chemii

dr Marek Cebrat
Uniwersytet Wrocławski, Wydział Chemii

dr hab. Lech Celewicz
Uniwersytet A. Mickiewicza Wydział Chemii Pracownia Chemii Nukleozydów i Nukleotydów

prof. dr hab. Adam Choma
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, Zakład Genetyki i Mikrobiologii

prof. dr hab. inż. Jerzy Choma
Wojskowej Akademii Technicznej w Warszawie, Instytucie Chemii

prof. dr hab. Mirosław Czarnecki
Wydział Chemii Uniwersytet Wrocławski

prof. dr hab. Leszek Ciunik
Wydział Chemii Uniwersytet Wrocławski

prof. dr hab. Marek Cegła
Uniwersytet Jagielloński; Collegium Medicum; Wydział Farmaceutyczny;
Katedra Chemii Organicznej

prof. dr hab. Cieślak-Golonka
Wydział Chemiczny, Politechnika Wrocławska

prof. dr hab. Witold Danikiewicz
Instytut Chemii Organicznej Polskiej Akademii Nauk

dr hab. inż. Barbara Dębska
Politechnika Łódzka; Wydział Chemiczny

Prof. dr hab. Jacek Dramiński
Wyższa Szkoła Nauk o Zdrowiu w Bydgoszczy

prof. dr hab. Andrzej Dżugaj
Uniwersytet Wrocławski; Wydział Nauk Biologicznych; Instytut Genetyki i Mikrobiologii

prof. dr hab. Michał Fedoryński
Politechnika Warszawska; Wydział Chemiczny; Instytut Biotechnologii

dr hab. Rafał Frański
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza; Wydział Chemii

prof. dr hab. Andrzej Gamian
Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu; Wydział Lekarski;
Katedra i Zakład Biochemii Lekarskiej

prof. dr hab. inż. Elżbieta Grabińska-Sota
Politechnika Śląska, Wydział Inżynierii Środowiska i Energetyki, Katedra Biotechnologii Środowiskowej

prof. dr hab. Jolanta Gromadzińska
Instytut Medycyny Pracy im. Prof. J. Nofera, Zakład Toksykologii i Kancero-genezy

prof. Karol Lesław Grela
Instytut Polskiej Akademii Nauk

Katarzyna Gobis
Gdański Uniwersytet Medyczny; Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej; Katedra i Zakład Chemii Organicznej

prof. dr hab. Roman Gancarz
Politechnika Wrocławskie; Wydział Chemiczny; Wydziałowy Zakład Technologii Organicznej i Farmaceutycznej

prof. zw. dr hab. Jacek Gliński
Uniwersytet Wrocławski; Wydział Chemii

dr hab. Ryszard Gryglewski
Uniwersytet Jagielloński; Collegium Medicum; Wydział Lekarski; Katedra Historii Medycyny

prof. dr hab. Teresa Grzybek
Akademia Górnictwo-Hutnicza im. Stanisława Staszica w Krakowie, Wydział Energetyki i Paliw

prof. dr hab. Maria Grzeszczuk
Uniwersytet Wrocławski, Wydział Chemii

prof. dr hab. Jerzy Hawranek
Uniwersytet Wrocławski, Wydział Chemii

Dr inż. Jolanta Iłowska
Instytut Ciężkiej Syntezy Organicznej
„Blachownia” Zakład Środków Specjalistycznych

prof. dr hab. Stanisław Leśniak
Uniwersytet Łódzki; Wydział Chemii, Katedra Chemii Organicznej i Stosowanej

prof. dr hab. Beata Liberek
Uniwersytet Gdańskie; Wydział Chemii; Katedra Chemii Organicznej

prof.dr.hab. Marian Jaskuła
Uniwersytet Jagielloński; Wydział Chemii; Zakład Chemii Fizycznej i Elektrochemii

dr hab. inż. Andrzej Kaim
Wydział Chemii Uniwersytet Warszawski

prof. dr hab. Roman Kaliszan
Gdański Uniwersytet Medyczny

prof. dr hab. Zygmunt Kowalski
Instytut Chemii i Technologii Nieorganicznej, Politechnika Krakowska

prof. dr hab. n. med. Adam Klimowicz
Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie, Katedra i Zakład Chemii Kosmetycznej i Farmaceutycznej

prof. dr n. przyr. Marian Kruzel
University of Texas Health Science Center at Houston Department of Integrative Biology and Pharmacology

prof. dr hab. Leszek Kępiński
Instytut Niskich Temperatur i Badań Strukturalnych Polskiej Akademii Nauk

dr hab. Karol Kacprzak
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu; Wydział Chemii; Pracownia Stereochemii Organicznej

dr hab. Inż. Janina Kabatc
Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich w Bydgoszczy; Wydział Technologii i Inżynierii

prof. zw. dr hab. inż. Paweł Kazimierz Kafarski
Politechnika Wrocławskie, Wydział Chemiczny

prof. dr hab. Bogusław Kryczka
Uniwersytet Łódzki; Wydział Chemii; Katedra Chemii Organicznej i Stosowanej

prof. dr hab. Paweł Grzegorz Krysiński
Uniwersytet Warszawski, Wydział Chemii

prof. dr hab. Aleksandra Kubicz
Uniwersytet Wrocławski; Wydział Nauk Przyrodniczych; Instytut Biochemii
i Biologii Molekularnej

prof. dr hab. Leszek Kępiński
Instytut Niskich Temperatur i Badań Strukturalnych PAN

prof. dr hab. Aleksander Koll
Wydział Chemii, Uniwersytet Wrocławski

dr hab. inż. Aleksandra Kołodziejczyk
Uniwersytet Gdańskie, Wydział Chemii, Katedra Chemii Medycznej

prof. dr hab. inż. Aleksander Kołodziejczyk
Politechnika Gdańskie; Wydział Chemiczny; Katedra Chemii Organicznej

prof. dr hab. Teresa Kowalik-Jankowska
Uniwersytet Wrocławski; Wydział Chemii

prof. dr hab. Adam Kraszewski
Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk

dr hab. Marek Krzeminiński
Uniwersytet Mikołaja Kopernika; Wydział Chemii

dr hab. Anna Łukaszewicz-Hussain
Akademia Medyczna w Białymostku; Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologicznym

prof. dr hab. Wojciech T. Markiewicz
Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk

prof. dr hab. Wojciech Macyk
Uniwersytet Jagielloński; Wydział Chemii; Zakład Chemii Nieorganicznej

dr inż. Sylwia Magiera
Politechnika Śląska, Wydział Chemiczny

prof. dr hab. Wojciech T. Markiewicz
Instytut Chemii Bioorganiczne Polskiej Akademii Nauk

dr hab. Agnieszka Markowska
Zakład Chemii Organicznej, Uniwersytet Medyczny w Białymostku

dr hab. inż. Katarzyna Materna
Politechnika Poznańska, Instytut Technologii i Inżynierii Chemicznej

dr hab. Jan Milecki
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza; Wydział Chemii

prof. dr hab. inż. Jacek Młochowski
Politechnika Wrocławskiego; Wydział Chemiczny

prof. dr hab. Jacek Młynarski
Uniwersytet Jagielloński, Wydział Chemii

prof. dr hab. n. farm. Hanna Mojska
Instytut Żywności i Żywienia im. prof. dra med. Aleksandra Szczygły

prof. dr hab. Jacek Namiesnik
Politechnika Gdańskia; Wydział Chemiczny; Katedra Chemii Analitycznej

dr hab. Agnieszka Nosal-Wiercińska
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie; Wydział Chemii

dr inż. Joanna Ortyl
Politechnika Krakowska im. Tadeusza Kościuszki; Wydział Inżynierii i Technologii Chemicznej; Katedra Biotechnologii i Chemii Fizycznej

prof. dr hab. Kazimierz Orzechowski
Uniwersytet Wrocławski, Wydział Chemii

prof. dr hab. inż. Ryszard Józef Ostaszewski
Instytut Chemii Organicznej Polskiej Akademii Nauk

dr hab. Stanisław Porwański
Uniwersytet Wrocławski, Wydział Chemii

dr. hab. Piotr Przybylski
Uniwersytet Adama Mickiewicza, Wydział Chemii

prof. dr hab. Sylwia Rodziewicz – Motowidło
Wydział Chemii, Uniwersytet Gdańskiego

dr hab. Sławomir Szafert
Wydział Chemii, Uniwersytet Wrocławski

prof. dr hab. Sławomira Skrzypek
Uniwersytet Łódzki; Wydział Chemii; Katedra Chemii Nieorganicznej i Analitycznej

prof. dr hab. Jarosław Ślawiński
Gdański Uniwersytet Medyczny; Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej; Katedra i Zakład Chemii Organicznej

prof. dr hab. Elżbieta Sochacka
Instytut Chemii Organicznej, Wydział Chemiczny, Politechnika Łódzka

prof. dr hab. Grzegorz Schroeder
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza; Wydział Chemii; Zakład Chemii Supramolekularnej

dr hab. inż. Renata Siedlecka
Politechnika Wrocławskiego; Wydział Chemiczny

prof. dr hab. Wiesława Sikora
Katedra Fizyki Materii Skondensowanej, Wydział Fizyki i Informatyki Stosowanej AGH

prof. dr hab. Jerzy Silberring
Akademia Górnictwo-Hutnicza im. Stanisława Staszica w Krakowie; Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki; Katedra Biochemii i Neurobiologii

prof. dr hab. Katarzyna Stadnicka
Uniwersytet Jagielloński; Wydział Chemii; Zakład Krystalochimii i Krystalofizyki

prof. dr hab. Janusz Stafiej
Instytut Chemii Fizycznej PAN

prof. dr hab. Jacek Stawiński
Instytut Chemii Bioorganicznej PAN

dr hab. Piotr Tadeusz Stefanowicz
Uniwersytet Wrocławski; Wydział Chemii

prof. dr hab. Maciej Stobiecki
Instytut Chemii Bioorganicznej PAN

prof. dr hab. inż. Jacek Mikołaj Skarżewski
Politechnika Wrocławskiego; Wydział Chemiczny; Wydziałowy Zakład Chemii
Organicznej

prof. dr hab. inż. Wincenty Antoni Skupiński
Politechnika Warszawska; Wydział Chemiczny; Zakład Materiałów Wysoko-
energetycznych

dr hab. Krzysztof Sobczak
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu; Wydział Biologii; Instytut
Biologii Molekularnej i Biotechnologii

prof. dr hab. Jadwiga Sołoduchko
Politechnika Wrocławska; Wydział Chemiczny; Wydziałowy Zakład Chemii
Medycznej i Mikrobiologii

prof. dr hab. Stanisław Kazimierz Sobiak
Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu; Wydział Far-
maceutyczny; Katedra i Zakład Technologii Chemicznej Środków Leczniczych

prof. dr hab. inż. Elżbieta Sochacka
Politechnika Łódzka; Wydział Chemiczny; Instytut Chemii Organicznej

prof. dr hab. Mirosław Soszyński
Uniwersytet Łódzki; Wydział Biologii i Ochrony Środowiska; Katedra Biofizyki
Molekularnej

dr hab. inż. Anna Sokół-Łętowska
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, Katedra Technologii Owoców,
Warzyw i Zbóż

prof. dr hab. Marek Tkacz
Instytut Chemii Fizycznej PAN, Zakład Fizykochemii Ciała Stałego

prof. dr hab. Vinh Hung Tran
Polska Akademia Nauk, Instytut Niskich Temperatur i Badań Strukturalnych

prof. zw. dr hab. inż. Janusz Tadeusz Trawczyński
Politechnika Wrocławskiego; Wydział Chemiczny; Zakład Chemii i Technologii
Paliw

prof. zw. dr hab. inż. Andrzej Witold Trochimczuk
Politechnika Wrocławskiego, Wydział Chemiczny, Wydziałowy Zakład Materia-
łów Polimerowych i Węglowych

dr hab. Lilianna Trynda-Lemiesz
Akademia Medyczna im. Piastów Śląskich; Wydział Farmaceutyczny z Oddzia-
łem Analistyki Medycznej; Katedra i Zakład Chemii Analitycznej

prof. zw. dr hab. Anna Maria Trzeciak
Uniwersytet Wrocławski; Wydział Chemii

dr hab. Przemysław Starynowicz
Uniwersytet Wrocławski, Wydział Chemii

prof. zw. dr hab. Zbigniew Szewczuk
Uniwersytet Wrocławski; Wydział Chemii

prof. dr hab. Maciej Szmitkowski
Zakład Diagnostyki Biochemicznej, Uniwersytet Medyczny w Białymostku

prof. dr hab. Anna Szymyrka-Grzebyk
Polska Akademia Nauk, Instytut Niskich Temperatur i Badań Strukturalnych

prof. dr hab. Artur Terzyk
Uniwersytet Mikołaja Kopernika; Wydział Chemii

dr inż. Bożena Tyliszczak
Politechnika Krakowska, Wydział Inżynierii i Technologii Chemicznej

dr inż. Bożena Twardochleb
Instytut Ciężkiej Syntezy Organicznej, Zakład Produktów Ekologicznych

dr Agnieszka Tafelska-Kaczmarek
Uniwersytet Mikołaja Kopernika; Wydział Chemii

prof. dr hab. Ewa Witek
Uniwersytet Jagielloński; Wydział Chemii; Zakład Technologii Chemicznej

dr inż. Beata Wileńska
Uniwersytet Wrocławski, Wydział Chemii

prof. dr hab. Krystyna Wieczorek-Ciurowa
Wydział Inżynierii i Technologii Chemicznej, Politechnika Krakowska

prof. dr hab. Monika Wujec
Uniwersytet Medyczny w Lublinie; Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem
Analityki Medycznej; Katedra i Zakład Chemii

prof. dr hab. inż. Ilona Wandzik
Katedra Chemii Organicznej, Bioorganicznej i Biotechnologii; Politechnika
Śląska

prof. dr hab. Anna Zawisza
Uniwersytet Łódzki; Wydział Chemii

prof. dr hab. Lucjusz Zaprutko
Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego
w Poznaniu

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 Chilmontczyk – 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” (któroś wniosł 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 marginem 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 umieszczoneymi w nawiasach kwadratowych, w kolejności cytowania wg wzorów [1, 5, 7] (dla prac 1, 5 i 7) lub [1-5, 7] (dla prac od 1 do 5 oraz pracy 7).
- Jeśli w artykułach znajdują się przedruki rysunków, czy innych elementów prac cudzych, w opisach (polskich i angielskich) należy zamieścić stosowną informację.
- Zaleca się umieszczać w tekście pracy rysunki, tabele oraz podpisy (jeśli są przygotowane w edytorze Word), jednak w przypadku plików o bardzo dużych rozmiarach należy zaznaczyć miejsca na ich umieszczenie (zob. Pliki jakie należy przekazać do Redakcji).
- **Pierwsza strona pracy powinna zawierać kolejno:**
 - tytuł pracy w języku polskim (Times New Roman, 14 p, pogrubiony, WERSALIKI), i angielskim (Times New Roman, 14 p, WERSALIKI),
 - pełne imię i nazwisko autora (autorów) pracy (Times New Roman, 15p, pogrubione),
 - pełne nazwy ośrodków przypisane do autorów pracy (wraz z adresem ośrodka i adresem e-mail autora korespondującego (Times New Roman, 10,5, kursywa),
 - spis treści pracy z zastosowaniem następującego podziału:
Abstract
Wykaz stosowanych symboli i oznaczeń
Wprowadzenie
1. Tytuł rozdziału
1.1. Tytuł podrozdziału itp.
Uwagi końcowe
Podziękowanie
Piśmiennictwo cytowane

• Kolejne strony pracy powinny zawierać:

- **notki o autorach** pracy wraz z tytułami naukowymi (można dołączyć osobno pliki z fotografiami autorów (zob. Pliki jakie należy przekazać do Redakcji)),

- **obszerne streszczenie pracy w języku angielskim** (od 1800 do 2700 znaków ze spacjami) z uwzględnieniem cytowanego piśmiennictwa oraz odsyłaczami do tabel, rysunków zamieszczonych w tekście (Rys. 1, Tab. 1-2, Schemat 1) oraz **słowa kluczowe** – nie więcej niż 6, uzyskane najlepiej z bazy 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** najprostszы 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 najprostszы 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

Michał ANTOSZCZAK, Marta KORDYLAS, Adam HUCZYŃSKI: Biokoniugaty antybiotyków jonoforowych – cele, strategie syntezy i właściwości	1
Karolina MOZELEWSKA, Zbigniew CZECH: Podział klejów rozpuszczalnych w wodzie ze względu na pochodzenie	29
Piotr HODA, Beata POLAK, Tadeusz H. DZIDO: Elektroforeza swobodna z przepływem hydrodynamicznym – podstawy teoretyczne i technologia.....	39
Jan S. JAWORSKI: ślady krwi na Całunie Turyńskim: analiza materiałowa od mikro do nanoskali	61
Informacje	81

W NASTĘPNYM ZESZYCIE UKAŻĄ SIĘ:

Maurycy SZLENKIER: Aktywność biologiczna modyfikowanych nukleozydów

Monika RETAJCZYK, Agnieszka WRÓBLEWSKA: Piroliza biomasy jako źródło energii

Agata MROWIEC, Weronika STRZEMPEK: Zastosowania biologiczne tetrazoli i ich pochodnych

Monika Szufla: Przewodnictwo protonowe w sieciach metalo-organicznych – nowe możliwości w technologii ogniw paliwowych

Nikola FAJKIS: Inteligentne polimery i ich stosowanie w kontrolowanym uwalnianiu insuliny podczas leczenia diabetologicznego

Rafał KNURA, Joanna ŚWIDER: Akumulatory litowo-jonowe stoowane w przemyśle motoryzacyjnym