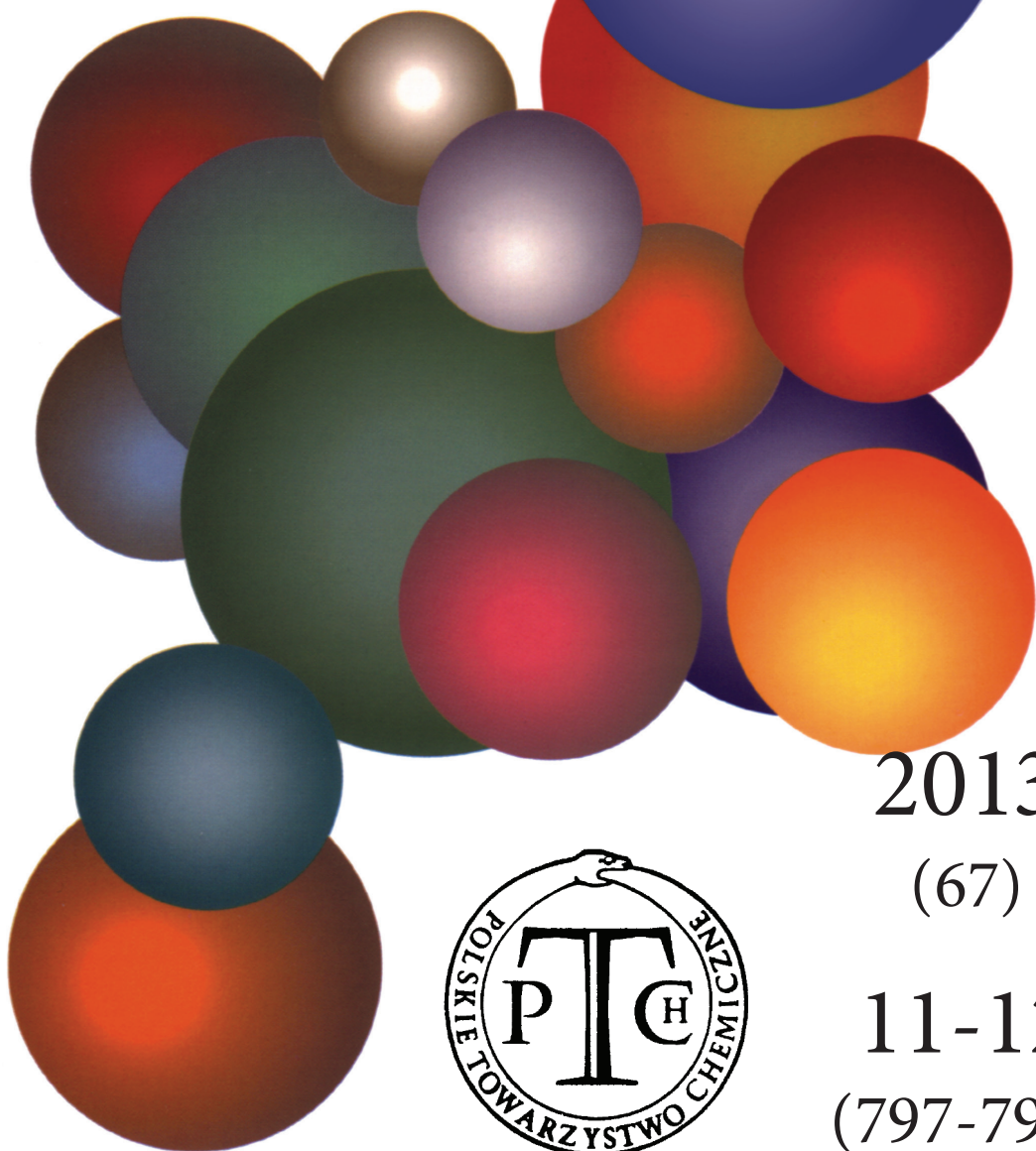


WIADOMOŚCI *chemiczne*

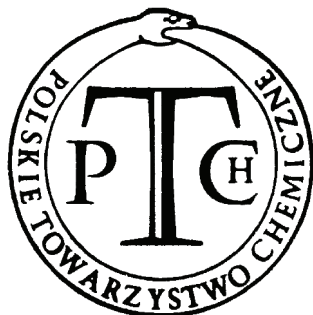


2013

(67)

11-12

(797-798)



CZASOPISMO POLSKIEGO TOWARZYSTWA CHEMICZNEGO

Publikacja dotowana przez MNiSW

RADA REDAKCYJNA

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

KOMITET REDAKCYJNY

JERZY P. HAWRANEK, ADAM JEZIEFSKI, LUDWIK KOMOROWSKI, MIROSLAW SOROKA,
MARIA SUSZYŃSKA, SŁAWOMIR SZAFERT, ANDRZEJ TROCHIMCZUK

REDAKTOR NACZELNY

ZDZISŁAW LATAJKA

SEKRETARZ REDAKCJI

BEATA ŚWIĄTEK-TRAN

BARBARA LATKO (FINANSE)

KAZIMIERA LUKJAN (KOLPORTAŻ)

Korespondencję należy kierować pod adresem:

Redakcja „Wiadomości Chemicznych”

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

tel.: 71 375 73 89, tel./fax: 71 322 14 06

e-mail: wchem@wchuwr.pl

INTERNET

<http://www.wchuwr.pl/wiadchem.htm> (English abstracts)

<http://www.dbc.wroc.pl> (pełne teksty publikacji od roku 2006)

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

© Copyright by Redakcja „Wiadomości Chemicznych”, Wrocław 2013

pISSN 0043-5104

eISSN 2300-0295

Maszynopis niniejszego numeru przekazano Wydawcy w okresie październik-listopad 2013

Przygotowanie do druku i druk:

Firma Wydawnicza K2, al. Stanów Zjednoczonych 51, 04-026 Warszawa

tel. 22 517 78 12, fax 22 517 78 11, e-mail: k2@druk-k2.pl

WSPÓŁCZESNE SURFAKTANTY I ICH STRUKTURY MICELARNE TWORZONE W ROZTWORACH WODNYCH

CURRENTLY AVAILABLE SURFACTANTS AND THEIR MICELLAR STRUCTURES FORMED IN AQUEOUS SOLUTIONS

Anna Jakubowska

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

Abstract

Wykaz stosowanych skrótów

Wprowadzenie

1. Surfaktanty o charakterze cieczy jonowych
 - 1.1. Surfaktanty na bazie kationów alkilopirydyniowych
 - 1.2. Surfaktanty imidazoliowe
 - 1.3. Surfaktanty na bazie kationów alkilopirolidyniowych i kationu diizopropylloetyloamoniowego (DIPEA)
 - 1.4. Surfaktanty „gemini”
 - 1.5. SAILs na bazie dodecylo-siarczanu i AOT
2. Surfaktanty funkcjonalizowane
 - 2.1. Surfaktanty „bolaform”
 - 2.2. Surfaktanty na bazie kaliksarenu
 - 2.3. Surfaktanty długołańcuchowe
3. Surfaktanty polimerowe

Podsumowanie

Podziękowanie

Piśmiennictwo cytowane

Dr hab. Anna Jakubowska jest adiunktem na Wydziale Chemii UAM w Poznaniu w Zakładzie Chemii Fizycznej. Jej zainteresowania naukowe dotyczą: wpływu jonów na aktywność i strukturę wody, hydratacji jonów, właściwości fizykochemicznych układów micelarnych modyfikowanych dodatkiem elektrolitów, specyficznych efektów jonowych oraz powinowactwa jonów do monomerów surfaktantów i powierzchni micel.

ABSTRACT

This article presents currently available surfactant ionic liquids as well as functionalized and polymeric surfactants.

Ionic liquids (ILs) are organic salts of melting points below 100°C. They have attracted much attention due to their unique physicochemical properties such as low volatility, high thermal stability, low toxicity, high ionic conductivity, capacity to dissolve organic, inorganic and polymeric materials [1]. ILs can be used as “green” solvents in electrochemistry, extraction, chromatography, catalysis, chemical and enzymatic reactions, and synthesis of new materials [2–4]. Ionic liquids are less corrosive than classical molten salts and therefore are used as electrolytes in batteries or solar cells [5].

Like other salts, ionic liquids are formed by ions but at least one of them is an organic ion. Moreover cations and anions differ significantly in their geometrical characteristics [1]. ILs with long alkyl chains and pronounced hydrophilic and lipophilic molecular fragments have an obvious amphiphilic nature and are called the surface active ionic liquids, SAILs, because they show combined properties of ILs and surfactants [6].

Recently, there is ever-increasing interest in SAILs based on gemini surfactants (Figs 6 and 7 [21, 22]), dodecyl sulfate, DS (Fig. 8a) and aerosol-OT, AOT (Fig. 8b) anions [23–25], alkylpyridinium (Fig. 1b [11]), imidazolium (Figs 1a and 3 [13, 14, 16]), alkylpyrrolidinium [17, 18], and diisopropylethylammonium, DIPEA [19] cations. Apart from SAILs, in recent years an attention has also been paid to functionalized surfactants such as: bolaform surfactants [32], supra-long chain surfactants [35, 36], calixarene-based surfactants (Fig. 9 [33]). Surfactants of the above types of SAILs and functionalized surfactants have been synthesized and their micellar structures formed in water have been studied. For example, very interesting vesicle systems were observed in aqueous solutions of diisopropylethylamine alkyl carboxylates, $[\text{DIPEA}]^+[\text{C}_n\text{H}_{2n+1}\text{COO}]^-$, for $n = 3-9$ (Fig. 5 [19]) and in aqueous solutions of the surfactant mixture composed of *N*-dodecyl-*N*-methyl-pyrrolidinium and sodium dodecyl sulfate (Fig. 4 [18]). It was found that 1-hexadecyl-3-methyl-imidazolium chloride in aqueous solutions underwent the phase (micellar) transformations upon cooling (Fig. 2 [13]).

An important group of polymeric surfactants attracting a great interest in literature is that of triblock copolymers of poly(ethylene oxide) (PEO) and poly(propylene oxide) (PPO), often abbreviated as $[\text{EO}]_a-[\text{PO}]_b-[\text{EO}]_a$. Recently, these copolymers, also called poloxamers, have been proposed for pharmaceutical use [37–40]. These nonionic surfactants form micelles in aqueous solutions with a core containing the hydrophobic PO blocks and a shell made up of the hydrated EO blocks [41]. The subject of current studies include: the interactions between poloxamers and anionic surfactant, SDS in aqueous solutions [42–47], micellization of poloxamers in mixtures of water and organic solvents [48], comparison of association properties of diblock and triblock copolymers [49].

The paper also presents the experimental methods used recently to study surface activity, aggregation behaviors, and micellar structures of surfactants in water.

Keywords: surfactants, ionic liquids, functionalized surfactants, polymeric surfactants, measurement techniques, micellar structures

Słowa kluczowe: surfaktanty, ciecze jonowe, surfaktanty funkcjonalizowane, surfaktanty polimerowe, techniki pomiarowe, struktury micelarne

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

δ	– przesunięcie chemiczne protonów w widmach ^1H NMR
$[\text{C}_{16}\text{mim}]\text{Cl}$	– chlorek 1-heksadecylo-3-metylo-imidazoliowy
$[\text{C}_n\text{mim}]\text{Br}$	– bromki 1-alkilo-3-metylo-imidazoliowe
$[\text{C}_n\text{pir}]\text{Cl}$, $[\text{C}_n\text{mpir}]\text{Cl}$	– chlorki, odpowiednio, 1-alkilopirydyniowe i 1-alkilo-2-, -3- albo -4- metylopirydyniowe
AOT	– aerosol-OT
bmim	– kation 1-butylo-3-metylo-imidazoliowy
bmpirrol	– kation <i>N</i> -butylo- <i>N</i> -metylo-pirolidyniowy
CMC	– krytyczne stężenie powstawania micel (ang. <i>Critical Micelle Concentration</i>)
cryo-TEM	– kriogeniczna transmisyjna mikroskopia elektronowa (ang. <i>Cryogenic-Transmission Electron Microscopy</i>)
DIPEA	– kation diizopropylamoniowy
DLS	– dynamiczne rozpraszanie światła (ang. <i>Dynamic Light Scattering</i>)
dmim	– kation 1-dodecylo-3-metylo-imidazoliowy
dmpirrol	– kation <i>N</i> -dodecylo- <i>N</i> -metylo-pirolidyniowy
DOSY	– spektroskopia dyfuzyjna (ang. <i>Diffusion-Ordered Spectroscopy</i>), będąca techniką magnetycznego rezonansu jądrowego, NMR
DS	– anion dodecylo-siarczanowy
EAN	– azotan etyloamoniowy
FFEM	– rodzaj mikroskopii elektronowej (ang. <i>Freeze-Fracture Electron Microscopy</i>)
FTIR	– spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera (ang. <i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>)
ILs	– ciecze jonowe (ang. <i>Ionic Liquids</i>)
NMR	– magnetyczny rezonans jądrowy (ang. <i>Nuclear Magnetic Resonance</i>)
PBO	– poli(tlenek butylenu)
PEO	– poli(tlenek etylenu)
PGSE	– dyfuzyjna metoda NMR (ang. <i>Pulsed Gradient Spin-Echo</i>)
PPO	– poli(tlenek propylenu)
SAILs	– powierzchniowo czynne ciecze jonowe (ang. <i>Surface Active Ionic Liquids</i>)
SANS	– mało-kątowe rozpraszanie neutronów (ang. <i>Small-Angle Neutron-Scattering</i>)

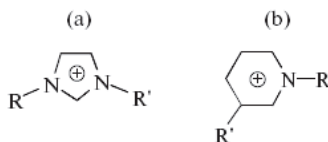
-
- SAXS i WAXS
- mało- i szeroko-kątowne rozpraszanie promieniowania rentgenowskiego (ang. *Small- and Wide-Angle X-ray Scatterings*)
- TEM
- transmisyjna mikroskopia elektronowa
- T_K
- temperatura Krafft

WPROWADZENIE

Współczesna nauka koncentruje się na otrzymywaniu i badaniu takich surfaktantów, które w porównaniu z surfaktantami dotychczas stosowanymi są łagodniejsze dla środowiska, mniej toksyczne, mniej korozyjne, lepiej biodegradowalne, bardziej stabilne termicznie i mają korzystniejsze właściwości powierzchniowe i biologiczne. Spośród tych surfaktantów szczególnym zainteresowaniem cieszą się surfaktanty wykazujące właściwości cieczy jonowych.

Ciecze jonowe są solami organicznymi, których temperatura topnienia jest niższa od 100°C [1]. Charakteryzują się takimi właściwościami fizykochemicznymi jak: niską lotnością, wysoką stabilnością termiczną, niską toksycznością, dużym przewodnictwem jonowym oraz dobrą rozpuszczalnością substancji zarówno nieorganicznych, organicznych jak i polimerów. Ciecze jonowe są niepalne i łatwo ulegają recyklingowi. Dzięki swoim właściwościom znajdują szerokie zastosowanie jako „zielone” rozpuszczalniki w elektrochemii, ekstrakcji, chromatografii, w syntezie nowych materiałów, w katalizie, w reakcjach chemicznych i enzymatycznych [2–4]. Mogą być stosowane jako elektrolity w bateriach i ogniwach słonecznych, ponieważ są mniej korozyjne niż klasyczne sole stopione [5].

Podobnie jak inne sole, ciecze jonowe tworzone są przez jony, przy czym przynajmniej jeden z jonów jest jonem organicznym, a ponadto kation różni się od anionu strukturą geometryczną [1]. Jeśli jeden z jonów cieczy jonowej posiada długi łańcuch węglowodorowy, to w cząsteczce tej cieczy można wyróżnić część lipofilową i część hydrofilową. W takim przypadku ciecz jonowa wykazuje właściwości amfifilowe i jest substancją powierzchniowo czynną, a zatem jest surfaktantem [6]. Powierzchniowo czynne ciecze jonowe (ang. *Surface Active Ionic Liquids*, SAILs) wykazują zdolność do samoorganizacji: części hydrofilowe tworzą trójwymiarową sieć polarną, w której dominują silne oddziaływania elektrostatyczne, natomiast grupy alkilowe tworzą obszary niepolarne, w których działają siły van der Waalsa o krótkim zasięgu [7]. W obecności wody sieć polarna SAILs stopniowo ulega niszczeniu (w miarę wzrostu zawartości wody w układzie rośnie oddziaływanie między cząsteczkami wody a grupami polarnymi cieczy jonowej) i w odpowiednio rozcieńczonych roztworach wodnych tworzone są micelle. Obecnie prowadzone są badania nad wykorzystaniem SAILs jako surfaktantów w procesach technologicznych opartych na solubilizacji, katalizie, makro- i mikro- emulsyfikacji oraz separacji [8]. Popularnymi surfaktantami o charakterze cieczy jonowych są na przykład sole dialkiloimidazoliowe i dialkilopirydyniowe (Rys. 1).



Rysunek 1. Wzory strukturalne kationów: (a) dialkylimidazoliowych i (b) dialkylpirydyniowych [1]
 Figure 1. Structural formulas of: (a) dialkylimidazolium and (b) dialkylpyridinium cations [1]

Zasadniczym celem prezentowanej pracy było przedstawienie takich współcześnie syntetyzowanych i badanych surfaktantów, które są szczególnie interesujące ze względu na budowę swoich cząsteczek albo ze względu na tworzone w wodnych roztworach struktury agregacyjne. Badanie struktur agregacyjnych surfaktantów ma duże znaczenie, ponieważ struktury micelarne mogą służyć jako modele membran biologicznych lub jako nośniki leków i reagentów. W pracy prezentowane są techniki pomiarowe stosowane obecnie do badań układów micelarnych.

1. SURFAKTANTY O CHARAKTERZE CIECZY JONOWYCH

1.1. SURFAKTANTY NA BAZIE KATIONÓW ALKILOPIRYDINIOWYCH

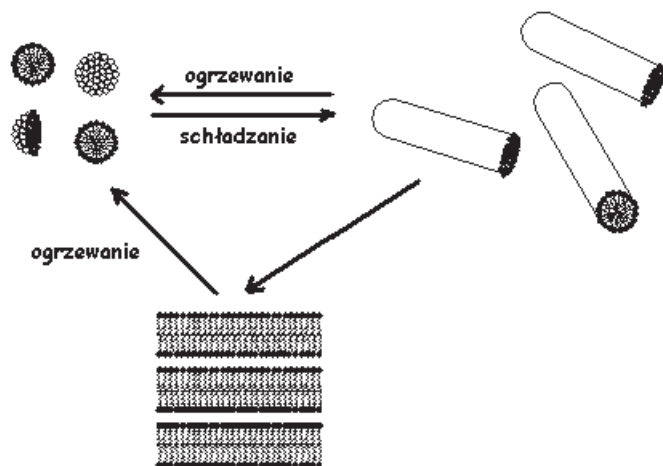
Ciecze jonowe posiadające w swoich cząsteczkach jon alkiłopirydyniowy są wysoce biodegradowalne, przy czym szybkość ich biodegradacji rośnie ze wzrostem długości łańcucha węglowodorowego jonu [9, 10]. Ostatnio badano zsyntetyzowane chlorki 1-alkilopirydyniowe, $[C_n\text{pir}]Cl$, oraz 1-alkilo-2-, -3- albo -4- metylpirydyniowe, $[C_n\text{mpir}]Cl$, gdzie $n = 4, 6, 8$ [11]. Dla otrzymanych związków wyznaczono wartości krytycznego stężenia powstawania micel (ang. *Critical Micelle Concentrations, CMC*) przy pomocy trzech niezależnych metod fizykochemicznych, a mianowicie poprzez pomiary: napięcia powierzchniowego, przewodnictwa elektrycznego oraz przesunięcia chemicznego δ protonów w widmach 1H NMR. Ponieważ dwie pierwsze metody są powszechnie znane, tutaj zostanie pokrótce omówione wyznaczanie wartości *CMC* za pomocą spektroskopii NMR. W tej ostatniej metodzie przygotowuje się w D_2O roztwory o różnym stężeniu badanej cieczy jonowej (stężenia roztworów powinny być poniżej i powyżej *CMC*). Z zarejestrowanych widm 1H NMR roztworów wyznacza się wartości δ dla protonów obecnych w pierścieniu pirydyniowym oraz obecnych w grupie metylowej znajdującej się na końcu łańcucha alkilowego. Protony te są czułe na zmianę otaczającego je środowiska i w miarę wzrostu stężenia SAILs w roztworze obserwuje się: przesunięcie chemiczne w stronę pola magnetycznego o niższej częstotliwości dla protonów pierścienia pirydyniowego oraz przesunięcie wartości δ w stronę pola magnetycznego o wyższej częstotliwości dla protonów ostatniej grupy metylowej łańcucha alkilowego. To przesunięcie wartości δ w stronę pola o wyższej częstotliwości dla protonów na końcu łańcucha alkilowego spowodowane jest tworzeniem się agregatów SAILs, na skutek czego protony

te znajdują się w rdzeniu micel i są wysoce przesłaniane. Poprzez wykreślenie zależności wartości δ w funkcji odwrotności stężenia badanych roztworów cieczy jonowej wyznacza się wartość *CMC* w miejscu charakterystycznego załamania krzywej.

Stwierdzono [11], że wartości *CMC* badanych chlorków alkilopirydyniowych maleją ze wzrostem wartości *n*, a więc w miarę wzrostu hydrofobowości łańcucha alkilowego. Obecność grupy metylowej w pierścieniu pirydyniowym związku $[C_n\text{mpir}]\text{Cl}$ także zwiększa hydrofobowość cieczy jonowej i w konsekwencji zmniejsza wartość *CMC* w porównaniu do wartości *CMC* jego homologicznego związku $[C_n\text{pir}]\text{Cl}$ z tą samą wartością *n*.

1.2. SURFAKTANTY IMIDAZOLIOWE

W przypadku SAILs kationów alkiloimidazoliowych tworzenie wiązań wodorowych przez heterocykliczny pierścień imidazoliowy zmniejsza charakter hydrofilowy grup polarnych tych surfaktantów, co ułatwia ich agregację w roztworach wodnych [12]. Ponadto ładunek dodatni kationu imidazoliowego jest zdelokalizowany w pierścieniu, na skutek czego ten kation jest wysoce stabilny.



Rysunek 2. Schematyczny rysunek przedstawiający micelarne przejścia fazowe zachodzące w 1% wodnym roztworze $[C_{16}\text{mim}]\text{Cl}$ [13]

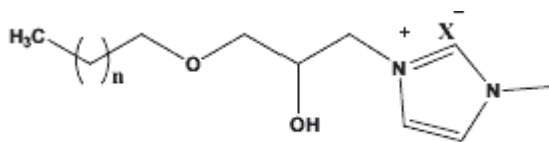
Figure 2. Schematic drawing showing the phase transformations recorded for 1% $[C_{16}\text{mim}]\text{Cl}$ aqueous dispersion [13]

Na uwagę zasługuje zachowanie chlorku 1-heksadecylo-3-metylo-imidazoliowego, $[C_{16}\text{mim}]\text{Cl}$, obserwowane w wodzie po jej ochłodzeniu do temperatury około 0°C [13]. Przemiany fazowe wodnych roztworów surfaktantu były badane za pomocą pomiarów przewodnictwa elektrycznego, rozpraszania promieniowania rentgenowskiego SAXS i WAXS (ang. *Small- and Wide-Angle X-ray Scatterings*), spektroskopii w podczerwieni FTIR (ang. *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) oraz

mikroskopii elektronowej FFEM (ang. *Freeze-Fracture Electron Microscopy*). Wyniki badań wskazują, że w temp. 25°C w wodnych roztworach $[C_{16}mim]Cl$ o stężeniu od 0,5% do 10% obecne są micelle kuliste. Po ochłodzeniu roztworów do temperatury około 0°C, w stężonych roztworach surfaktantu (> 6%) w miejsce micel kulistych tworzone są struktury warstwowe, natomiast w 0,5 lub 1% roztworze $[C_{16}mim]Cl$ micelle kuliste przekształcają się w micelle pałeczkowate (Rys. 2). Gdy taki rozcieńczony roztwór surfaktantu ogrzano do temp. 3°C, to po jego inkubacji w tej temperaturze przez 24 h, w roztworze powstawały micelle plastrowe (warstwowe) (Rys. 2).

Ciekawe są również badania agregacji bromków 1-alkilo-3-metylo-imidazoliowych, $[C_nmim]Br$ ($n = 8, 10, 12$), w azotanie etyloamoniowym (EAN) [14]. Azotan etyloamoniowy jest protyczną cieczą jonową i podobnie jak woda posiada zdolność tworzenia trójwymiarowej sieci wiązań wodorowych, co jest korzystne dla agregacji surfaktantów [15]. Stwierdzono [14], że wartości *CMC* badanych bromków w EAN maleją, podobnie jak w wodzie, ze wzrostem wartości n . Jednakże wyznaczone wartości *CMC* są znacznie wyższe od tych otrzymanych w wodnych roztworach surfaktantów, co świadczy, że EAN jest lepszym rozpuszczalnikiem dla solwofobowych łańcuchów węglowodorowych surfaktantów niż woda. Z kolei na podstawie widm 1H NMR (zarejestrowanych dla roztworów badanych bromków w EAN) i wyznaczonych z nich przesunięć chemicznych δ dla protonów obecnych w kationie etyloamoniowym i w pierścieniu imidazoliowym wykazano, że solwofobowa część jonu $[CH_3CH_2NH_3]^+$ penetruje micelę, natomiast pomiędzy jonami $[NO_3]^-$ a protonami pierścienia imidazoliowego są tworzone wiązania wodorowe. W konsekwencji wiązania wodorowe w EAN są osłabiane.

Na uwagę zasługują też badania trwałości termicznej zsyntetyzowanych długołańcuchowych bromków i chlorków 3-[3-(alkilooksy)-2-hydroksypropylo]-1-metylo-imidazoliowych (ilość atomów węgla w łańcuchu alkilowym surfaktantów wynosiła 12, 14 lub 16) (Rys. 3). Trwałość tych SAILS była wyznaczana w oparciu o ich analizę termogravimetryczną [16]. Stwierdzono, że badane surfaktanty są trwałe aż do temperatury 320°C, a ich trwałość termiczna rośnie wraz ze wzrostem długości ich łańcucha alkilowego, przy czym SAILS z przeciwjonami Br^- są trwalsze od z SAILS z przeciwjonami Cl^- .



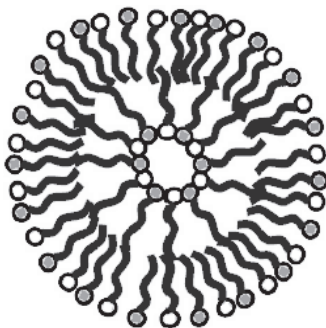
Rysunek 3. Struktura chemiczna surfaktantów β -hydroksy- γ -alkilooksy-*N*-metyloimidazoliowych, $n = 10, 12, 14$; $X = Cl^-, Br^-$ [16]

Figure 3. Chemical structures of β -hydroxy- γ -alkiloxy-*N*-methylimidazolium surfactants, $n = 10, 12, 14$; $X = Cl^-, Br^-$ [16]

1.3. SURFAKTANTY NA BAZIE KATIONÓW ALKILOPIROLIDYNIOWYCH I DIIZOPROPYLOETYLOAMONIOWEGO (DIPEA)

Przykładem SAILs otrzymanych na bazie kationów alkilopirolidyniowych jest bromek *N*-heksadecylo-*N*-metylo-pirolidyniowy. W wodnych roztworach tego surfaktantu zawierających *p*-toluenosulfonian sodu obserwowano przejście micel kulistych w micelle pałeczkowate [17]. To, zachodzące w wyniku obecności soli organicznej, przejście micelarne badano przy pomocy transmisyjnego mikroskopu elektronowego cryo-TEM (ang. *Cryogenic-Transmission Electron Microscopy*) oraz pomiarów reologicznych (pomiar lepkości i szybkości ścinania).

Interesujące badania [18] prowadzono w wodnych roztworach mieszaniny dwóch surfaktantów: bromku *N*-dodecylo-*N*-metylo-pirolidyniowego i dodecylo-siarczanu sodu, SDS, przy czym w roztworach stężenie surfaktantu kationowego było stałe, a ulegało zmianie stężenie SDS. Stosując technikę transmisyjnej mikroskopii elektronowej TEM oraz pomiary reologiczne i przewodnictwa elektrycznego wykazano, że przy niskich stężeniach SDS w roztworach obecne są typowe micelle, które przekształcają się w dwuwarstwowe cząstki (Rys. 4), gdy stosunek molowy surfaktantu anionowego do kationowego osiąga w roztworze wartość 0,59–0,94. W pierwszym etapie procesu powstawania cząstek tworzone są, dzięki oddziaływaniom elektrostatycznym, pary jonowe między grupami hydrofilowymi monomerów obydwóch surfaktantów. Utworzone wolne pary jonowe surfaktantów oddziałują na siebie siłami hydrofobowymi i agregują się w dwuwarstwowe cząstki.



Rysunek 4. Dwuwarstwowe cząstki tworzone w wodnych roztworach mieszaniny dwóch surfaktantów: bromku *N*-dodecylo-*N*-metylo-pirolidyniowego i dodecylo-siarczanu sodu [18]

Figure 4. Bilayer vesicles formed in aqueous solutions of the surfactant mixture composed of *N*-dodecyl-*N*-methyl-pyrrolidinium and sodium dodecyl sulfate [18]

Na bazie kationu DIPEA zsyntetyzowano alkilo-karboksylany diizopropyl-etyloamoniowe, $[\text{DIPEA}]^+[\text{C}_n\text{H}_{2n+1}\text{COO}]^-$ ($n = 3-9$) [19]. Przy pomocy pomiarów napięcia powierzchniowego badano w wodzie aktywność powierzchniową otrzymanych surfaktantów oraz wyznaczono ich wartości CMC. Z kolei dzięki pomiarom przewodnictwa elektrycznego wyznaczono stopień dysocjacji tworzonych w wodzie agregatów $[\text{DIPEA}]^+[\text{C}_n\text{H}_{2n+1}\text{COO}]^-$, a ponadto przy wyższych stężeniach

surfaktantu w wodzie zaobserwowano powstawanie nowych struktur micelarnych (wyznaczono wartość drugiego CMC). Za pomocą pomiarów dynamicznego rozpraszania światła DLS (ang. *Dynamic Light Scattering*) i SAXS oraz stosując techniki mikroskopii elektronowej TEM i FFEM stwierdzono, że po przekroczeniu wartości drugiego CMC alkilo-karboksylany agregują się w cząstki powstałe z dwuwarstwy skręconej w wężownicę w kształcie ślimaka (Rys. 5).

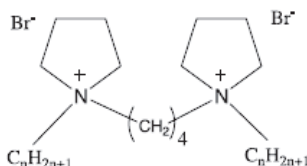


Rysunek 5. Cząstki tworzone w roztworach wodnych alkilo-karboksylanów diizopropyleoamoniowych, $[DIPEA]^+[C_nH_{2n+1}COO]^-$ ($n = 3-9$), gdy stężenie surfaktantu jest wyższe od wartości drugiego CMC [19]

Figure 5. Vesicles formed in aqueous solutions of diisopropylethylamine alkyl carboxylates, $[DIPEA]^+[C_nH_{2n+1}COO]^-$ ($n = 3-9$), for the surfactant concentrations above the second CMC [19]

1.4. SURFAKTANTY „GEMINI”

Tak zwane surfaktanty „gemiini” („bliźniacze”, dimerowe) są nową grupą surfaktantów, których pojedyncze cząsteczki zbudowane są z dwóch identycznych jednołańcuchowych monomerów połączonych ze sobą łącznikiem występującym między grupami hydrofilowymi monomerów. Zatem w cząsteczce takiego surfaktantu znajdują się dwa łańcuchy węglowodorowe i dwie grupy hydrofilowe. Surfaktanty „gemiini” mają niższe wartości CMC i wykazują wyższą aktywność powierzchniową w porównaniu z ich jednołańcuchowymi odpowiednikami spośród konwencjonalnych surfaktantów [20].



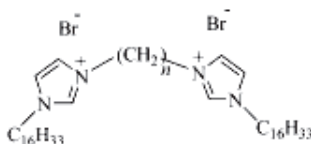
Rysunek 6. Struktura chemiczna SAILs otrzymanych na bazie surfaktantów „gemiini” pirolidyniowych [21]

Figure 6. Chemical structure of gemini pyrrolidine-based SAILs [21]

W skład nowych SAILs zsyntetyzowanych na bazie surfaktantów „gemiini” wchodzi kationy pirolidyniowe. Zsyntetyzowane surfaktanty „gemiini” pirolidyniowe (Rys. 6) poddano badaniom w roztworach wodnych [21]. Właściwości powierzchniowo czynne tych SAILs były określane na podstawie wyników pomiarów napięcia powierzchniowego i równania izotermy adsorpcji Gibbsa. Agregacja w wodzie omawianych tutaj surfaktantów była badana za pomocą pomiarów fluo-

rescencyjnych, przewodnictwa elektrycznego i napięcia powierzchniowego, przy czym statyczne wygaszanie fluorescencji i pomiary przewodności posłużyły również do wyznaczenia odpowiednio liczb agregacji i stopnia dysocjacji micel. Wykazano, że surfaktanty „gemi” piroolidyniowe w porównaniu ze swoimi jednołańcuchowymi odpowiednikami mają [21]: 1) niższe o około jeden rząd wielkości wartości CMC, 2) niższe nadmiarowe stężenie powierzchniowe, 3) ponad dwukrotnie większą powierzchnię jaką zajmuje pojedyncza cząsteczka surfaktantu na granicy faz powietrze|woda, 4) mniejszy stopień wiązania przeciwjonów do powierzchni micel oraz 5) ponad dwukrotnie mniejsze wartości liczb agregacji micel. Te właściwości surfaktantów „gemi” są wynikiem obecności łącznika (tj. łańcucha butylowego – Rys. 6) pomiędzy grupami piroolidyniowymi cząsteczki surfaktantu, przez co cząsteczki surfaktantu nie mogą być ciasno upakowane w miceli, czy też przy granicy faz.

Zsyntetyzowano również surfaktanty „gemi” wykazujące właściwości cieczy jonowych dzięki obecności w cząsteczce surfaktantu kationu imidazoliowego. Przykładem takiego surfaktantu „gemi” jest surfaktant, którego cząsteczka zbudowana jest z dwóch monomerów bromku 1-heksadecylo-3-metylo-imidazoliowego połączonych ze sobą łącznikiem $(\text{CH}_2)_n$ występującym między pierścieniami imidazoliowymi (Rys. 7).



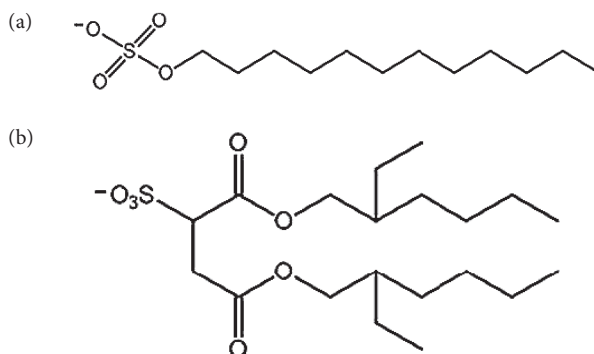
Rysunek 7. Wzór strukturalny surfaktantów „gemi” imidazoliowych
Figure 7. Structural formula of the gemini imidazolium surfactants

Badany był wpływ długości n łącznika ($n = 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12$) na wartości CMC i właściwości micel surfaktantu [22]. Za pomocą pomiarów fluorescencyjnych i mało-kątowego rozpraszania neutronów SANS (ang. *Small-Angle Neutron-Scattering*; badano kształt profilu oraz obecność i położenie pików w różniczkowym przekroju czynnym SANS analizowanym w funkcji wektora rozproszenia) stwierdzono, że ze wzrostem długości n łącznika metylowego w cząsteczce surfaktantu (Rys. 7) maleje odległość między micelami i liczba agregacji micel, natomiast ich ładunek rośnie. Oznacza to, że ze wzrostem n tworzone są coraz mniejsze micelle, przekształcające się z micel elipsoidalnych w micelle kuliste.

1.5. SAILS NA BAZIE DODECYLO-SIARCZANU I AOT

Ostatnio zsyntetyzowano surfaktanty o właściwościach cieczy jonowych, których jonem organicznym o długim łańcuchu węglowodorowym jest anion [23–25]. Tym anionem był anion dodecylo-siarczanowy, DS, posiadający pojedynczy łań-

cuch alkilowy albo aerosol-OT, AOT, z podwójnym łańcuchem węglowym (Rys. 8). Zaletą otrzymanych surfaktantów jest to, że: 1) były zsyntetyzowane w procesie prostej wymiany jonowej z tanich, handlowo łatwo dostępnych i łagodnych dla środowiska odczynników, 2) łatwo można je oczyścić oraz 3) nie są zanieczyszczone halogenkami, co jest bardzo istotne, ponieważ w środowisku wodnym jony halogenkowe tworzą żrące kwasy; na przykład jony Cl^- i F^- tworzą w obecności wody kwas HCl i HF [26].



Rysunek 8. Wzory strukturalne anionów: (a) dodecylo-siarczanowego, DS i (b) aerosolu-OT, AOT
Figure 8. Structural formulas of: (a) dodecyl sulfate, DS, and (b) aerosol-OT, AOT, anions

Gdy jonami dodatnimi tych SAILS były kationy tetraalkiloamoniowe, $(\text{C}_n\text{H}_{2n+1})_4\text{N}^+$, $n = 1, 2, 3, 4$, stwierdzono [23], że wyznaczone z pomiarów napięcia powierzchniowego wartości CMC powyższych surfaktantów maleją ze wzrostem hydrofobowości (tj. ze wzrostem n) kationów tetraalkiloamoniowych, przy czym dodanie do tych kationów grupy CH_2 ma znacznie mniejszy wpływ na wartość CMC niż dodanie grupy CH_2 do głównego łańcucha węglowodorowego surfaktantu. Wyniki badań pokazały, że właściwości SAILS, których jednym z jonów jest jon DS lub AOT, silnie zależą od struktury chemicznej anionu, a w małym stopniu zależą od typu kationu. Z kolei na podstawie badań mało-kątownego rozpraszania neutronów SANS wykazano, że SAILS otrzymane na bazie anionu dodecylo-siarczanowego tworzą w wodzie małe, wydłużone micelle, ponieważ spełniające rolę przeciwjonów kationy tetraalkiloamoniowe są słabo związane z jonami DS. Natomiast w przypadku surfaktantów, których anionem jest podwójno-łańcuchowy AOT, kationy tetraalkiloamoniowe są silnie związane z tym anionem i w konsekwencji tworzone są w wodzie znacznie większe micelle niż w przypadku surfaktantów z anionem DS (w roztworze surfaktantu o stężeniu 4% tworzą się micelle elipsoidalne z osią główną R_1 : około 28 Å w przypadku anionu AOT oraz od 1,5 do 1,7 Å w przypadku jonu DS).

Zsyntetyzowano również surfaktanty, których anionem był jon DS lub AOT, a kationem – jon 1-butylo-3-metylo-imidazoliowy (bmim). Te surfaktanty są pozbawione jonów halogenkowych, co czyni te związki bardziej przyjaznymi dla środo-

wiska w porównaniu do tradycyjnych SAILS imidazoliowych. Ponadto występująca w jonie bmim grupa imidazoliowa jest mniej toksyczna dla środowiska wodnego niż gdy jest połączona z dłuższym łańcuchem węglowodorowym [27]. Ciekawe właściwości powinien wykazywać surfaktant otrzymany z połączenia anionu AOT z kationem bmim – jon AOT ma właściwości antybiotyczne i jest pestycydem, natomiast jon bmim wykazuje właściwości antibakteryjne [28].

Stwierdzono [24], że wartości CMC (wyznaczone z pomiarów napięcia powierzchniowego) surfaktantów bmimDS i bmimAOT wynoszą odpowiednio: 2,3 i 1,78 mM [24] i są niższe od wartości CMC form sodowych tych surfaktantów ($CMC_{NaDS} = 8,00$ mM [24] i $CMC_{NaAOT} = 2,88$ mM [24]), ponieważ w porównaniu do kationu Na^+ kation bmim jest bardziej hydrofobowy i efektywniej ekranuje ładunek powierzchniowy ujemnie naładowanych micel DS i AOT. Z kolei badania SANS pokazują, że w wodnych roztworach o stężeniach 0,5–4,0% bmimDS lub bmimAOT tworzone są struktury warstwowe (plastrowe), w których grubość dwuwarstw jest w przybliżeniu równa dwukrotnej długości łańcucha węglowodorowego anionu surfaktantu. W miarę wzrostu stężenia surfaktantu w wodzie (od 0,5–4,0%) wzrasta liczba dwuwarstw, a odległość między nimi maleje. W micelach warstwowych tworzonych przez bmimAOT liczba dwuwarstw jest mniejsza, a odległość między nimi większa w porównaniu do micel tworzonych przez bmimDS.

Porównywano również właściwości dwóch zsyntetyzowanych SAILS, których anionem był jon dodecylo-siarczanowy, a kationem – jon bmim lub jon *N*-butylo-*N*-metylo-pirolidyniowy (bmpirol) [25]. Wartości CMC dla obu surfaktantów są niższe od wartości CMC dla NaDS oraz bromków 1-dodecylo-3-metylo-imidazoliowego (dmim) i *N*-dodecylo-*N*-metylo-pirolidyniowego (dmpirol): $CMC_{bmimDS} = 1,8$ mM [25], $CMC_{bmpirolDS} = 2,7$ mM [25], $CMC_{NaDS} = 7,8$ mM [25], $CMC_{dmimBr} = 10,9$ mM [25] i $CMC_{dmpirolBr} = 13,5$ mM [25]. Wartości CMC dla surfaktantów bmimDS i bmpirolDS są niższe od wartości CMC dla NaDS z dwóch powodów: 1) przeciwjony organiczne bmim i bmpirol są znacznie słabiej hydratowane niż przeciwjony sodowe, 2) butylowy łańcuch węglowodorowy w pierścieniu imidazoliowym i pirolidyniowym spełnia rolę drugiego łańcucha hydrofobowego cząsteczki surfaktantu (po utworzeniu się micel lokuje się w ich wnętrzu). Dzięki zdolności tworzenia wiązań wodorowych przez pierścień imidazoliowy oraz delokalizacji ładunku dodatniego w tym pierścieniu, powstawanie micel w wodnych roztworach surfaktantu bmimDS jest łatwiejsze niż w przypadku roztworów surfaktantu bmpirolDS. Z kolei wartości stopnia dysocjacji micel (wyznaczone na podstawie zależności przewodnictwa elektrycznego w funkcji stężenia roztworów SAIL w zakresie poniżej i powyżej CMC) wskazują, że ze względu na przeszkody steryczne duże, cykliczne przeciwjony organiczne (bmim, bmpirol) są gorzej wiązane z powierzchnią micel surfaktantów bmimDS i bmpirolDS w porównaniu do małych przeciwjonów nieorganicznych (Na^+ , Br^-) wiązanych do powierzchni micel odpowiednio surfaktantów NaDS, dmimBr i dmpirolBr. Z tego też powodu micelle surfaktantów bmimDS i bmpirolDS są znacznie mniejsze w porównaniu do micel tworzonych przez NaDS,

dmimBr i dmpirolBr (wartości liczb agregacji micel wyznaczono z pomiarów statycznego wygaszania fluorescencji stosując metodę Turro i Yekty [29]).

2. SURFAKTANTY FUNKCJONALIZOWANE

2.1. SURFAKTANTY „BOLAFORM”

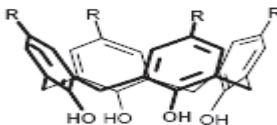
Cząsteczki tak zwanych surfaktantów „bolaform” są dwubiegunowe i posiadają dwie lub więcej grup hydrofilowych, które są rozdzielone częścią o charakterze hydrofobowym. Po raz pierwszy te surfaktanty zostały opisane przez Fuossa i Chu [30] oraz Fuossa i Edelsona [31]. Można powiedzieć, że monomer surfaktantu „bolaform” składa się z dwóch monomerów dwóch różnych surfaktantów, połączonych ze sobą poprzez końce ich alifatycznych łańcuchów węglowodorowych. Surfaktanty „bolaform” mają wyższe wartości *CMC* i tworzą mniejsze micelle (o średnicy prawie dwukrotnie mniejszej) w porównaniu do mających tę samą długość łańcucha alkiłowego surfaktantów konwencjonalnych (tj. posiadających w swoich cząsteczkach jedną grupę hydrofilową i jeden łańcuch węglowodorowy).

Z tej grupy surfaktantów zsyntetyzowano ostatnio bromki α,ω -hydroksy-heksadecylo-trialkiloamoniowe i α,ω -karboksy-heksadecylo-trialkiloamoniowe [32]. Wartości *CMC* otrzymanych surfaktantów wyznaczono przy pomocy spektroskopii ^1H NMR i przesunięć chemicznych δ protonów, natomiast tworzone w środowisku wodnym micelle badano przy użyciu techniki rozpraszania światła DLS i mikroskopii cryo-TEM. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że liczba agregacji micel jest mniejsza niż 10, przy czym micelle hydroksy-surfaktantów (średnica tych micel wynosi około 1,0–1,4 nm) są mniejsze od micel karboksy-surfaktantów (średnica tych micel wynosi około 2,1–2,4 nm). Te różnice w rozmiarach micel wyjaśniono różnym stopniem penetracji micel przez cząsteczki wody. W przypadku karboksy-surfaktantów obecne na powierzchni miceli grupy karboksylowe i amoniowe silnie wiążą cząsteczki wody, przez co monomery w miceli są luźno upakowane. W przypadku natomiast hydroksy-surfaktantów silne oddziaływanie ze sobą obecnych na powierzchni miceli grup hydroksylowych i amoniowych powoduje zmniejszenie się odległości między grupami hydrofilowymi surfaktantu i jego monomerami, co skutkuje wypychaniem cząsteczek wody z obszaru powierzchniowego micel.

2.2. SURFAKTANTY NA BAZIE KALIKSARENU

Kaliksareny są syntetycznymi organicznymi związkami makrocyclicznymi, których cząsteczki o budowie kielichowej zawierają 4 lub więcej jednostek fenolowych połączonych mostkami metylenowymi znajdującymi się w położeniu *orto*

względem grup hydroksylowych - Rysunek 9. Surfaktanty na bazie kaliksarenów są otrzymywane poprzez wprowadzenie: grup hydrofobowych (przeważnie – łańcuchów alkilowych) do grup OH i grup hydrofilowych w pozycje *para* pierścieni aromatycznych.



Rysunek 9. Budowa przestrzenna kaliks[4]arenu
Figure 9. Structure of calix[4]arene

Ostatnio badano w wodzie agregację zsyntetyzowanych amfifilowych kaliksarenów *p*-siarczynowych różniących się długością łańcucha alkilowego i liczbą jednostek aromatycznych w pierścieniu makrocyklicznym [33]. Wartości CMC i stopnia dysocjacji micel wyznaczono z pomiarów przewodnictwa elektrycznego, natomiast strukturę i wielkość agregatów badano przy pomocy spektroskopii NMR. Do badania micel zastosowano spektroskopię dyfuzyjną DOSY (ang. *Diffusion-Ordered Spectroscopy*), która jest techniką NMR pozwalającą na uzyskanie informacji o szybkości dyfuzji cząsteczek w rozpuszczalniku. Dzięki pomiarom spektroskopowym DOSY wyznaczono wartości współczynników dyfuzji monomerów i agregatów i na ich podstawie obliczono z równania Stokesa-Einsteina wartości promieni hydrodynamicznych micel. Przeprowadzone badania wskazują, że struktury micelarne mają kształt elipsoidalny, przy czym monomery kaliksarenów amfifilowych przyjmują w miceli konformację stożka.

2.3. SURFAKTANTY DŁUGOŁAŃCUCHOWE

W przemyśle i w badaniach naukowych często są stosowane surfaktanty posiadające dwunastowęglowy łańcuch alkilowy. W miarę wydłużania się łańcucha węglowodorowego w cząsteczce, rośnie temperatura Kraffta, T_K i maleje rozpuszczalność surfaktantu w wodzie. I tak na przykład, wartości T_K dla surfaktantów kationowych, bromków alkilo-trimetyloamoniowych $C_nH_{2n+1}N^+(CH_3)_3Br^-$, wynoszą: 3°C dla $n = 12$, 25°C dla $n = 16$ oraz 36°C dla $n = 18$ [34]. Na zwiększenie rozpuszczalności w wodzie surfaktantów długołańcuchowych można wpływać poprzez odpowiedni dobór grup hydrofilowych w cząsteczce związku.

Ostatnio otrzymano nowe surfaktanty długołańcuchowe (ang. *supra-long chain surfactants*), które dzięki obecności w cząsteczkach wielu grup hydrofilowych charakteryzowały się wysoką rozpuszczalnością w wodzie. Były to surfaktanty: $C_nH_{2n+1}N^+(CH_3)_2-(CH_2)_2-N^+(CH_3)_3 \times 2Br^-$ oraz $C_nH_{2n+1}N^+(CH_3)_2-(CH_2)_2-N^+(CH_3)_2-(CH_2)_2-N^+(CH_3)_3 \times 3Br^-$, gdzie $n = 18, 20$ i 22 , zawierające w swoich cząsteczkach dwie lub trzy czwartorzędowe grupy amoniowe [35]. Przy pomocy pomiarów napięcia powierzchniowego zbadano aktywność powierzchniową surfaktantów

w wodzie oraz wyznaczono ich wartości CMC . Z kolei z pomiarów przewodnictwa elektrycznego wyznaczono dla badanych surfaktantów wartości CMC , temperaturę Kraffta oraz stopień dysocjacji micel. Stopień wiązania przeciwjonów (tj. jonów Br^-) z powierzchnią micel był także wyznaczany z pomiarów potencjometrycznych przy zastosowaniu jonoselektywnej elektrody bromkowej [36]. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono [35], że ze wzrostem w cząsteczce surfaktantu liczby czwartorzędowych grup amoniowych rosną wartości CMC , a maleją wartości T_K . Na szczególną uwagę zasługują zmiany w wartościach T_K . Stwierdzono, że dla surfaktantu z $n = 18$, posiadającego jedną grupą amoniową wartość T_K wynosi $36^\circ C$, a po wprowadzeniu do jego cząsteczki drugiej i trzeciej grupy amoniowej wartość T_K spada poniżej $5^\circ C$. Z kolei surfaktant z $n = 22$, posiadający jedną grupą amoniową jest nierozpuszczalny w wodzie (i nie ma dla niego temperatury Kraffta); po wprowadzeniu do jego cząsteczki drugiej i trzeciej grupy amoniowej wartość T_K wynosi odpowiednio $26,5^\circ C$ i $23,5^\circ C$.

Kształt micel, tworzonych w wodnych roztworach surfaktantów długołańcuchowych $C_nH_{2n+1}N^+(CH_3)_2-(CH_2)_2-N^+(CH_3)_32Br^-$ i $C_nH_{2n+1}N^+(CH_3)_2-(CH_2)_2-N^+(CH_3)_2-(CH_2)_2-N^+(CH_3)_33Br^-$, z $n = 18, 20$ i 22 , był badany przy użyciu techniki rozpraszania światła DLS i mikroskopii elektronowej TEM [36]. Wykazano, że w przypadku surfaktantów „dwuwartościowych” (tj. z dwiema grupami hydrofilowymi) obserwowane są micelle pałeczkowate ($n = 18, 20$ i 22), natomiast monomery surfaktantów „trójwartościowych” (tj. z trzema grupami hydrofilowymi) agregują się w micelle kuliste gdy $n = 18$ i w micelle o kształcie elipsoidalnym gdy $n = 20$ i 22 .

3. SURFAKTANTY POLIMEROWE

W tej grupie surfaktantów do ciekawych należą kopolimery blokowe, a spośród nich szczególnym zainteresowaniem cieszą się kopolimery trójblokowe: poli(tlenek etylenu) (PEO) i poli(tlenek propylenu) (PPO), o wzorze $[EO]_a-[PO]_b-[EO]_a$. Te kopolimery trójblokowe zwane są powszechnie poloksamerami i ostatnio znalazły zastosowanie w przemyśle farmaceutycznym jako [37–40]: matryce żelowe w różnych maściach do nosa, składniki środków stosowanych przy leczeniu oparzeń termicznych, systemy kontrolowanego, miejscowego uwalniania leku i wzrostu jego biodostępności w organizmie. Te niejonowe surfaktanty polimerowe tworzą w wodnych roztworach micelle; hydrofobowe bloki PO tworzą rdzeń miceli, a hydrofilowe bloki EO (które są hydratowane) znajdują się w fazie powierzchniowej miceli [41].

W ostatnich latach duży nacisk kładziono na badanie w wodnych roztworach oddziaływań kopolimerów blokowych z surfaktantem anionowym, dodecylo-siarczanem sodu, SDS [42–46]. I tak, na przykład, przy pomocy dyfuzyjnej metody NMR, PGSE (ang. *Pulsed Gradient Spin-Echo*) oraz pomiarów reologicznych (pomiar lepkości i szybkości ścinania) badano struktury micelarne (przejścia strukturalne) tworzone w funkcji stężenia surfaktantów w trójskładnikowym układzie: poloksamer $[EO]_{13}-[PO]_{30}-[EO]_{13}/SDS/woda$ [47]. W badanym układzie stwierdzono obecność

roztworu izotropowego (tzw. fazy L), fazy heksagonalnej oraz lamelarnej fazy ciekło-kryształicznej, których obszary zaznaczono na diagramie fazowym (w trójkącie stężeń Gibbsa). W szczegółowych badaniach skoncentrowano się na fazie L, w której w miarę wzrostu zawartości SDS obserwowano przejście micel kulistych w micelle pałeczkowate.

W bieżącym roku została opublikowana praca [48], prezentująca wpływ różnych rozpuszczalników organicznych na micelizację poloksamerów w roztworach wodnych. Rozpuszczalniki dodane do wodnych roztworów surfaktantu ułatwiały lub utrudniały jego agregację zależnie od tego, czy zachowywały się jak kosurfaktant, czy jak korozpuszczalnik.

Godna uwagi jest też praca, w której porównuje się właściwości kopolimerów dwublokowych z trójblokowymi [49]. Badane były kopolimery zbudowane z bloków: PEO i PPO oraz PEO i PBO, gdzie PBO oznacza poli(tlenek butylenu). W wodnych roztworach micelarnych kopolimerów, bloki PO i BO tworzą rdzeń micel. Wykazano, że wartości *CMC* (wyznaczone z pomiarów napięcia powierzchniowego) są dla kopolimerów dwublokowych o dwa rzędy wielkości niższe w porównaniu do wartości otrzymanych dla kopolimerów trójblokowych (w temperaturze 25°C, *CMC* = 0,05 mM [49] dla kopolimeru o wzorze [EO]₁₈-[BO]₁₀, a dla kopolimeru [EO]₄₀-[BO]₁₀-[EO]₄₀ *CMC* = 2.2 mM [49]). Z kolei dzięki pomiarom dynamicznego rozpraszania światła DLS stwierdzono, że dodanie surfaktantu anionowego SDS do wodnych roztworów badanych kopolimerów powoduje znaczny wzrost micel w roztworach kopolimeru dwublokowego i zmniejszanie się micel w roztworach kopolimerów trójblokowych. Ta obserwowana zmiana wielkości micel spowodowana jest oddziaływaniem SDS z danym kopolimerem i tworzeniem się micel mieszanych SDS/kopolimer.

PODSUMOWANIE

Jak już wspomniano we wstępie, obecnie otrzymuje się i bada takie surfaktanty, które w porównaniu z dotychczasowymi są łagodniejsze dla środowiska, mniej toksyczne, mniej korozyjne, lepiej biodegradowalne, bardziej stabilne termicznie i mają korzystniejsze właściwości powierzchniowe i biologiczne. W roztworach wodnych cząsteczki surfaktantów tworzą w określonych warunkach różne struktury micelarne, które mogą służyć jako modele membran biologicznych lub jako nośniki leków i reagentów. W niniejszym artykule przedstawiono współcześnie syntetyzowane i badane surfaktanty, które są ciekawe albo ze względu na budowę swoich cząsteczek albo ze względu na tworzone w wodnych roztworach struktury agregacyjne. Do takich surfaktantów należą surfaktanty o charakterze cieczy jonowych, uzyskiwane na bazie: surfaktantów „gemini”, anionu dodecylo-siarczanowego, DS lub aerozolu-OT, AOT oraz kationów alkilopirydyniowych, imidazoliowego, alkilopirolidyniowych lub diizopropyluetyloamoniowego, [DIPEA]. W ostatnich latach uwaga jest również poświęcana surfaktantom funkcjonalizowanym, takim jak sur-

faktantom „bolaform”, surfaktantom długołańcuchowym (ang. *supra-long chain surfactants*), czy też surfaktantom otrzymany na bazie kaliksarenu.

W niniejszym artykule rozpatrywano także surfaktanty polimerowe. Spośród tych surfaktantów zainteresowaniem cieszą się obecnie kopolimery blokowe, a wśród nich szczególnie – kopolimery trójblokowe poli(tlenek etylenu) (PEO) i poli(tlenek propylenu) (PPO), o wzorze $[EO]_a-[PO]_b-[EO]_a$. Te kopolimery trójblokowe zwane są powszechnie poloksamerami i ostatnio znalazły zastosowanie w przemyśle farmaceutycznym.

W pracy przytoczone są również techniki eksperymentalne stosowane obecnie do badań układów micelarnych. I tak, aktywność powierzchniowa surfaktantów w wodzie i temperatura Kraffta badane są przy pomocy pomiarów, odpowiednio, napięcia powierzchniowego i przewodnictwa elektrycznego. Z kolei wartości krytycznego stężenia powstawania micel, CMC wyznacza się przy pomocy kilku niezależnych metod, a mianowicie poprzez pomiary: fluorescencyjne, napięcia powierzchniowego, przewodnictwa elektrycznego oraz przesunięcia chemicznego δ protonów w widmach ^1H NMR. W omawianych w niniejszym artykule pracach wyznaczano stopień dysocjacji tworzonych w wodzie agregatów z pomiarów przewodnictwa elektrycznego oraz z pomiarów potencjometrycznych przy zastosowaniu elektrod jonoselektywnych. Dzięki pomiarom przewodnictwa elektrycznego można również rejestrować przemiany fazowe wodnych roztworów surfaktantów jonowych. Natomiast do badań struktur micelarnych (kształtu i wielkości micel) stosuje się: rozpraszanie promieniowania rentgenowskiego SAXS i WAXS, spektroskopię w podczerwieni FTIR, mikroskopię elektronową TEM, FFEM, cryo-TEM, rozpraszanie światła DLS, SANS, spektroskopię dyfuzyjną DOSY i PGSE, pomiary reologiczne (pomiary lepkości i szybkości ścinania), statyczne wygaszanie fluorescencji.

PODZIĘKOWANIE

Autor pragnie podziękować pani prof. dr hab. inż. Kazimierze Annie Wilk z Politechniki Wrocławskiej za inspirację tematyką surfaktantów funkcjonalizowanych i surfaktantów będących cieczami jonowymi.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] N.A. Smirnova, E.A. Safonova, *Russ. J. Phys. Chem. A*, 2010, **84**, 1695.
- [2] *Ionic liquids in synthesis*, P. Wasserscheid, T. Welton [red.], Wiley, Weinheim, 2008.
- [3] *Ionic liquids: industrial applications to green chemistry*, R.D. Rogers, K.R. Seddon [red.], ACS, Waszyngton, 2002.
- [4] L.A. Aslanov, M.A. Zakharov, N.L. Abramycheva, *Ionic liquids among other solvents*, Mosk. Gos. Univ., Moskwa, 2005.
- [5] M.C. Buzzeo, R.G. Evans, R.G. Compton, *Chem. Phys. Chem.*, 2004, **5**, 1106.
- [6] O.A. El Seoud, P.A.R. Pires, T. Abdel-Moghny, E.L. Bastos, *J. Colloid Interface Sci.*, 2007, **313**, 296.
- [7] W. Jiang, Y. Wang, G.A. Voth, *J. Phys. Chem. B*, 2007, **111**, 4812.
- [8] J. Łuczak, J. Hupka, J. Thoming, C. Jungnickel, *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects*, 2008, **329**, 125.
- [9] K.M. Docherty, J.K. Dixon, C.F. Kulpa Jr, *Biodegradation*, 2007, **18**, 481.
- [10] A. Cornellias, L. Perez, F. Comelles, I. Ribosa, A. Manresa, M.T. Garcia, *J. Colloid Interface Sci.*, 2011, **355**, 164.
- [11] N.V. Sastry, N.M. Vaghela, P.M. Macwan, S.S. Soni, V.K. Aswal, A. Gibaud, *J. Colloid Interface Sci.*, 2012, **371**, 52.
- [12] P.D. Galgano, O.A. El Soud, *J. Colloid Interface Sci.*, 2010, **345**, 1.
- [13] F.-G. Wu, J.-S. Yu, S.-F. Sun, H.-Y. Sun, J.-J. Luo, Z.-W. Yu, *Langmuir*, 2012, **28**, 7350.
- [14] L. Shi, L. Zheng, *J. Phys. Chem. B*, 2012, **116**, 2162.
- [15] T.L. Greaves, C.J. Drummond, *Chem. Rev.*, 2008, **108**, 206.
- [16] V. Chauhan, S. Singh, A. Bhadani, *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects*, 2012, **395**, 1.
- [17] J. Li, M. Zhao, L. Zheng, *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects*, 2012, **396**, 16.
- [18] M. Zhao, J. Yuan, L. Zheng, *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects*, 2012, **407**, 116.
- [19] M. Anouti, P.-Y. Sizaret, C. Ghimbeu, H. Galiano, D. Lemordant, *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects*, 2012, **395**, 190.
- [20] H. Li, C. Yu, R. Chen, Jn Li, Jg Li, *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects*, 2012, **395**, 116.
- [21] S. Zhang, H. Yan, M. Zhao, L. Zheng, *J. Colloid Interface Sci.*, 2012, **372**, 52.
- [22] A. Pal, S. Datta, V. K. Aswal, S. Bhattacharya, *J. Phys. Chem. B*, 2012, **116**, 13239.
- [23] P. Brown, C. Butts, R. Dyer, J. Eastoe, I. Grillo, F. Guittard, S. Rogers, R. Heenan, *Langmuir*, 2011, **27**, 4563.
- [24] P. Brown, C.P. Butts, J. Eastoe, D. Fermin, I. Grillo, H.-C. Lee, D. Parker, D. Plana, R.M. Richardson, *Langmuir*, 2012, **28**, 2502.
- [25] J. Jiao, B. Dong, H. Zhang, Y. Zhao, X. Wang, R. Wang, L. Yu, *J. Phys. Chem. B*, 2012, **116**, 958.
- [26] P. Wasserscheid, R.V. Hal, B. Andreas, *Green Chem.*, 2002, **4**, 400.
- [27] C.-W. Cho, T.P.T. Pham, Y.-C. Jeon, K. Vijayaraghavan, W.-S. Choe, Y.-S. Yun, *Chemosphere*, 2007, **69**, 1003.
- [28] W.L. Hough, M. Smiglak, H. Rodríguez, R.P. Swatloski, S.K. Spear, D.T. Daly, J. Pernak, J.E. Grisel, R.D. Carliss, M.D. Soutullo, J.J.H. Davis, R.D. Rogers, *New J. Chem.*, 2007, **31**, 1429.
- [29] N.J. Turro, A. Yekta, *J. Am. Chem. Soc.*, 1978, **100**, 5951.
- [30] R.M. Fuoss, V.F.H. Chu, *J. Am. Chem. Soc.*, 1951, **73**, 949.
- [31] R.M. Fuoss, D. Edelson, *J. Am. Chem. Soc.*, 1951, **73**, 269.
- [32] S.J. Holder, B.C. Sriskantha, S.A. Bagshaw, I.J. Bruce, *J. Colloid Interface Sci.*, 2012, **367**, 293.
- [33] N. Basilio, L. Garcia-Rio, M. Martín-Pastor, *Langmuir*, 2012, **28**, 2404.
- [34] T.W. Davey, W.A. Ducker, A.R. Hayman, J. Simpson, *Langmuir*, 1998, **14**, 3210.
- [35] T. Yoshimura, N. Chiba, K. Matsuoka, *J. Colloid Interface Sci.*, 2012, **374**, 157.
- [36] K. Matsuoka, N. Chiba, T. Yoshimura, *J. Colloid Interface Sci.*, 2012, **379**, 72.

- [37] V.Y. Alakhov, A.V. Kabanov, *Expert Opin. Invest Drugs*, 1998, **7**, 1453.
- [38] P. Alexandridis, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 1996, **1**, 490.
- [39] M.W. Edens, *Polyoxyalkylene block copolymers*, w: *Nonionic surfactants*, pod red. V. Nace'a, Dekker, CRC Press, Nowy Jork, 1996.
- [40] M. El Fray, J. Gajowy, *Polimery*, 2012, **57**, 255.
- [41] Y. Zhang, Y.M. Lam, *J. Nanosci. Nanotechnol.*, 2006, **6**, 1.
- [42] C.S. Ouderc-Azouani, J. Sidhu, T.K. Georgiou, *Langmuir*, 2004, **20**, 6458.
- [43] T. Thurn, S. Couderc, J. Sidhu, *Langmuir*, 2002, **18**, 9267.
- [44] R.C. da Silva, G. Olofsson, K. Schillen, *J. Phys. Chem. B*, 2002, **106**, 1239.
- [45] R. Ivanova, P. Alexandridis, B. Lindman, *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects*, 2001, **183**, 41.
- [46] P.R. Desai, N.J. Jain, R.K. Sharma, *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects*, 2001, **178**, 57.
- [47] M. Youssry, F. Asaro, L. Coppola, L. Gentile, I. Nicotera, *J. Colloid Interface Sci.*, 2010, **342**, 348.
- [48] B. Sarkar, V. Ravi, P. Alexandridis, *J. Colloid Interface Sci.*, 2013, **390**, 137.
- [49] A. Kelarakis, C. Chaibundit, M.J. Krysmann, V. Havredaki, K. Viras, I.W. Hamley, *J. Colloid Interface Sci.*, 2009, **330**, 67.

Praca wpłynęła do Redakcji 6 sierpnia 2013

**MODYFIKOWANE
OLIGODEOKSYRYBONUKLEOTYDY ZAWIERAJĄCE
W WIĄZANIU INTERNUKLEOTYDOWYM
W POZYCJI MOSTKOWEJ ATOM AZOTU**

**MODIFIED OLIGODEOXYRIBONUCLEOTIDES
CONTAINING NITROGEN AT A BRIDGING POSITION
OF AN INTERNUCLEOTIDE BOND**

Ewa Radzikowska

*Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych Polskiej Akademii Nauk,
Zakład Chemii Bioorganicznej
ul. Sienkiewicza 112, 90-362 Łódź
e-mail: eradziko@bio.cbmm.lodz.pl*

Abstract

Wstęp

1. Synteza oligodeoksyrybonukleozydo-(P3'→N5')amidofosforanów
2. Synteza oligodeoksyrybonukleozydo-(N3'→P5')amidofosforanów
3. Synteza oligodeoksyrybonukleozydo-(N3'→P5')amidotiofosforanów
4. Właściwości biologiczne i fizykochemiczne
5. Potencjalne zastosowanie terapeutyczne

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane

Mgr Ewa Radzikowska – ukończyła Wydział Chemii Uniwersytetu Łódzkiego w 2007 roku i w tym samym roku rozpoczęła pracę w Zakładzie Chemii Bioorganicznej CBMM PAN w Łodzi. Jej obszar zainteresowań naukowych obejmuje syntezę modyfikowanych nukleozydów oraz oligonukleotydów o potencjalnym zastosowaniu terapeutycznym.

ABSTRACT

Synthetic oligonucleotides (ONs) constitute an important class of compounds which exhibit biological activity. As potential drugs ONs are employed in the antisense strategy [1]. The antisense therapeutic agent acts on the pathogenic mRNA causing inactivation of the target. Ideal antisense agent should be resistant to exo and/or endonucleases, have a suitable pharmacological and pharmacokinetic profile and high affinity for the target. To improve some properties of antisense oligonucleotides plethora of chemical modifications introduced within both sugar unit and internucleotides linkage were investigated.

Among numerous ONs modified in internucleotide phosphodiester bond, one of the most interesting are oligonucleotide phosphoramidates (NP-oligos) in which one of the bridging oxygens is replaced by nitrogen atom (at 3' or 5' position). Hence, two classes of compounds are formed: oligonucleotide-(N5'→P3')phosphoramidates and oligonucleotide(N3'→P5')-phosphoramidates. These compounds, similar to native DNA and RNA, possess an achiral phosphorous atom and all internucleotides bonds are negatively charged. Additionally, NP-oligo shows good resistance to nucleolytic degradation and can bind to the target DNA or RNA with high affinity [12]. In literature several synthetic strategies concerning both (N5'→P3') and (N3'→P5') NP-oligos have been described. Some of them allowed to obtain only corresponding dimers.

In the light of recent discoveries the most promising candidates for therapeutic and diagnostic applications are oligonucleotide-(N3'→P5')thiophosphoramidates. Gryaznov et al. have found that such compounds can act as potent and selective telomerase inhibitors [29]. Human telomerase (TA) is a reverse transcriptase ribonucleoprotein that synthesizes *de novo* d-(TTAGGG)_n repeats at chromosomal DNA ends. Whereas activity of this enzyme is observed in ~85% of all human tumors, most of normal somatic cells either lack TA activity or express it only at low levels. For these reasons TA constitute an attractive and nearly universal anticancer target for rational drug development.

Keywords: nucleic acids analogues, internucleotide linkage modifications, oligodeoxyribonucleoside-(P3'→N5')phosphoramidates, oligodeoxyribonucleoside-(N3'→P5')(thio)phosphoramidates, antisense strategy, telomerase, Atherton-Todd reaction

Słowa kluczowe: analogi kwasów nukleinowych, modyfikacje wiązania internukleotydowego, oligodeoksyrybonukleozydo-(P3'→N5')amidofosforany, oligodeoksyrybonukleozydo-(N3'→P5')amido(tio)fosforany, strategia antysensowa, telomeraza, reakcja Athertona-Todda

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

Ac ₂ O	- bezwodnik octowy
ASO	- oligonukleotyd antysensowy
tBDMS	- grupa <i>tert</i> -butylodimetylo sililowa
BSA	- bis(trimetylosililo)acetamid
CPG	- szkło o kontrolowanej wielkości porów
DBU	- 1,8-diazabicyklo[5.4.0]undek-7-en
DCA	- kwas dichlorooctowy
DIPEA	- diizopropylodimetyloamina
DMTr	- grupa 4,4'-dimetoksytrytylowa [bis(4-metoksy-fenyl)fenylometyl]
EDC	- 1-etylo-3(3-dimetyloaminopropyl) karbodiimid
HEPES	- kwas <i>N</i> -2-hydroksyetylopiperazyno- <i>N'</i> -2-etano-sulfonowy
HIV	- ludzki wirus zespołu nabytego braku odporności
IBA	- bezwodnik izobutyrylowy
LCA-CPG	- ang. <i>long chain alkylamine controlled pore glass</i>
MTrCl	- chlorek 4-monometoksytrytylowy
mRNA	- matrycowy/informacyjny kwas rybonukleinowy
NMI	- <i>N</i> -metyloimidazol
OCE	- grupa β -cyjanoetylowa
ONs	- oligonukleotydy
RP-HPLC	- wysokosprawna chromatografia cieczowa w odwróconym układzie faz
RRE	- ang. <i>Rev Response Element</i>
TA	- ludzka telomeraza
TAR	- ang. <i>The Transactivation-Responsive Region</i>
TAT	- ang. <i>Trans-Activating Proteins</i>
TBAF	- fluorek tetrabutylamoniowy
THF	- tetrahydrofuran
TMSCl	- chlorek trimetylosililowy
Tr	- grupa trytylowa (trifenylometylowa)

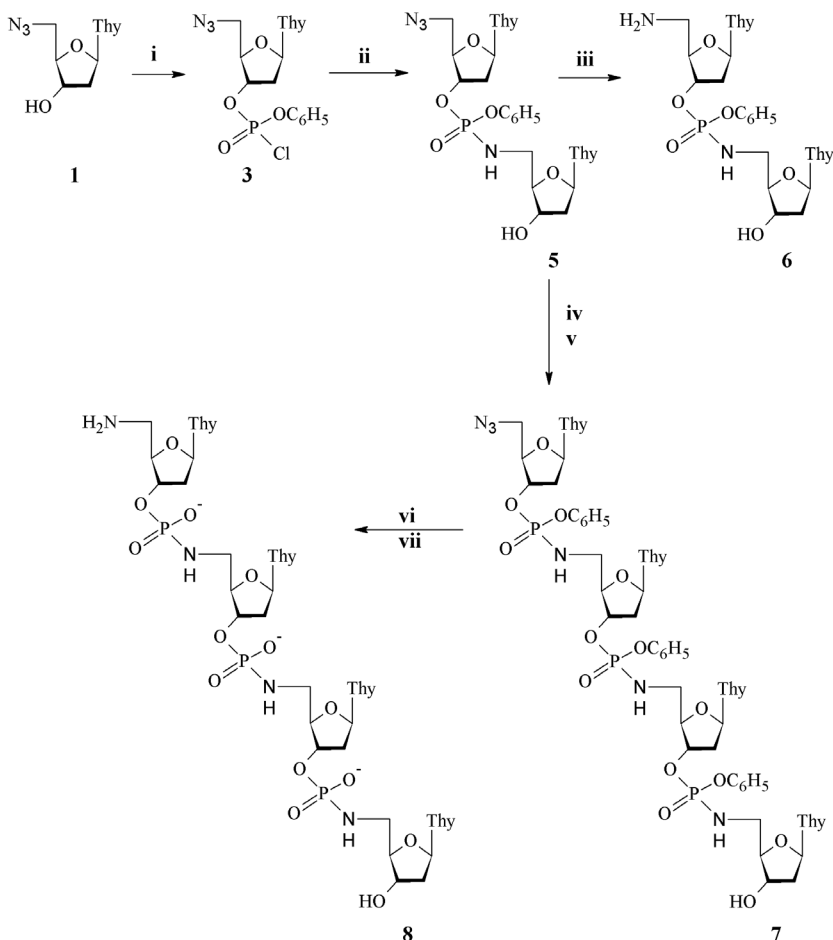
WSTĘP

Od wielu lat w chemii kwasów nukleinowych są prowadzone prace dotyczące syntezy modyfikowanych oligonukleotydów, które wiążąc się do właściwego fragmentu DNA lub mRNA na zasadzie hybrydyzacji z wykorzystaniem wiązań wodorowych mogą powodować zahamowanie procesu replikacji, transkrypcji lub translacji. Stąd też jako potencjalne czynniki terapeutyczne ONs mogą działać na patogenne mRNA powodując jego inaktywację [1].

Aby takie oligonukleotydy, nazwane antysensowymi, znalazły zastosowanie terapeutyczne muszą być przede wszystkim odporne na działanie egzo- i endonukleaz, co można uzyskać poprzez wprowadzanie różnego rodzaju modyfikacji zarówno w obrębie pierścienia heterozasady, reszty cukrowej jak i wiązania internukleotydowego. Spośród licznej grupy modyfikowanych w obrębie wiązania internukleotydowego oligonukleotydów na szczególną uwagę zasługują analogi, w których każdy z mostkowych atomów tlenu w pozycji 5' lub w pozycji 3' został zastąpiony grupą $-NH$. Otrzymane w ten sposób związki są nazywane w pierwszym przypadku oligodeoksyrybonukleozydo- $(P3' \rightarrow N5')$ amidofosforanami zaś w drugim oligodeoksyrybonukleozydo- $(N3' \rightarrow P5')$ amidofosforanami. Związki te, podobnie jak i naturalne oligonukleotydy, występują w formie zjonizowanej i przy neutralnym pH obdarzone są ładunkiem ujemnym.

1. SYNTEZA OLIGODEOKSYRYBONUKLEOZYDO- $(P3' \rightarrow N5')$ AMIDOFOSFORANÓW

Pierwszą syntezę dinukleozydoamidofosforanów zawierających wiązanie $(P3' \rightarrow N5')$ przedstawili Jastorff i Hettler w roku 1969 [2]. Polegała ona na fosforylacji 5'-amino-5'-deoksynukleozydu za pomocą dichlorofosforanu fenylu i następczej reakcji powstałego nukleozydo-amidochlorofosforanu z 3'-hydroksylową grupą drugiego nukleozydu. Stosując analogiczną metodę Letsinger i współpracownicy [3] przekształcili 5'-azydotymidynę (**1**) za pomocą dichlorofosforanu fenylu (**2**) w chlorofosforanową pochodną **3** (Schemat 1), która w kolejnym etapie w reakcji z 5'-amino-5'-deoksytymidyną (**4**) utworzyła ditymidylo- $(P3' \rightarrow N5')$ amidofosforan **5**. Redukcja funkcji 5'-azydo w **5** przeprowadzona za pomocą roztworu trifenylofosfiny w pirydynie (reakcja Staudingera) prowadziła do powstania związku **6**. Wykorzystując następnie jako substraty związki **5** i **6** autorzy uzyskali tetramer amidofosforanowy **7** zawierający grupę azydkową na 5' końcu. Przeprowadzona w ostatnim etapie reakcja Staudingera (PPh_3/Py) oraz hydroliza alkaliczna prowadziła do finalnego produktu **8**.

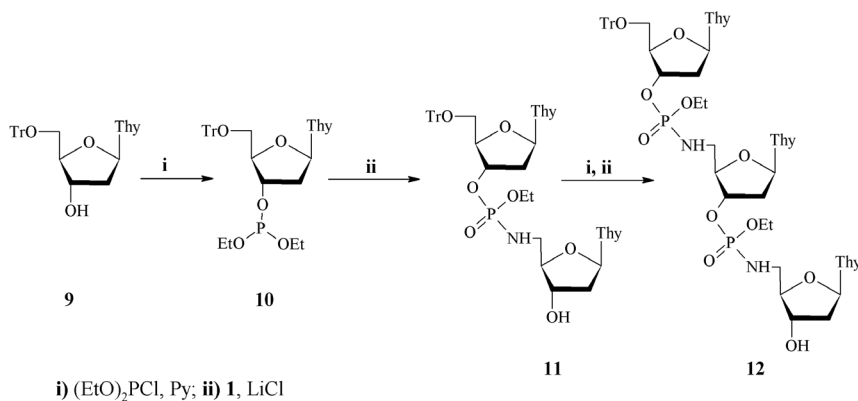


i) PhOP(O)Cl₂ (**2**) Py/dioksan; **ii)** 5'-amino-5'-deoksytymidyna (**4**), Et₃N/dioksan; **iii)** PPh₃/Py, MeOH/NH₃; **iv)** PhOP(O)Cl₂ (**2**), Py/dioksan; **v)** **6**, Et₃N, dioksan; **vi)** PPh₃/Py; **vii)** NaOH

Schemat 1. Synteza tetrameru (P^{5'}→N^{3'})amidofosforanowego zawierającego wolną grupę aminową na 5'-końcu

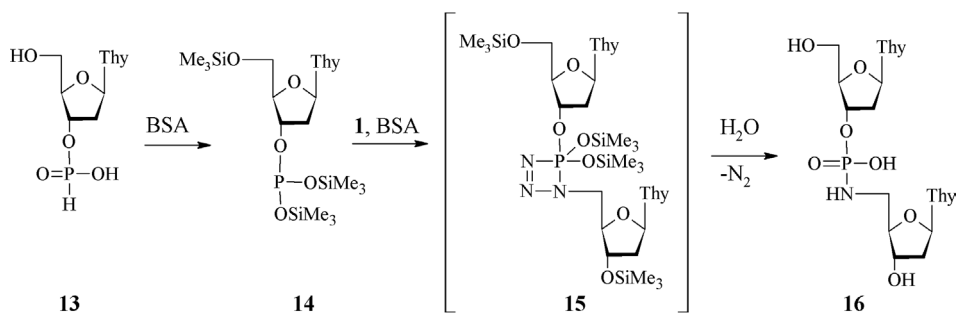
Scheme 1. Synthesis of (P^{5'}→N^{3'})phosphoramidate tetramer containing 5'-terminal amine group

Inna opisana przez Letsingera metoda otrzymywania nukleozydo-(P^{3'}→N^{5'})amidofosforanów polegała w pierwszym etapie na fosfitylacji za pomocą chlorofosforynu dietylowego 3'-hydroksylowej grupy 5'-blokowanej tymidyny (**9**) [4]. Powstały 3'-fosforyn **10** w reakcji z 5'-azydo-5'-deoksytymidyną (**1**) był następnie przekształcony do odpowiedniego ditymidylo-(P^{3'}→N^{5'})amidofosforanu **11** (Schemat 2). W kolejnym etapie związek **11** był użyty jako substrat do syntezy odpowiedniego trimeru **12**.



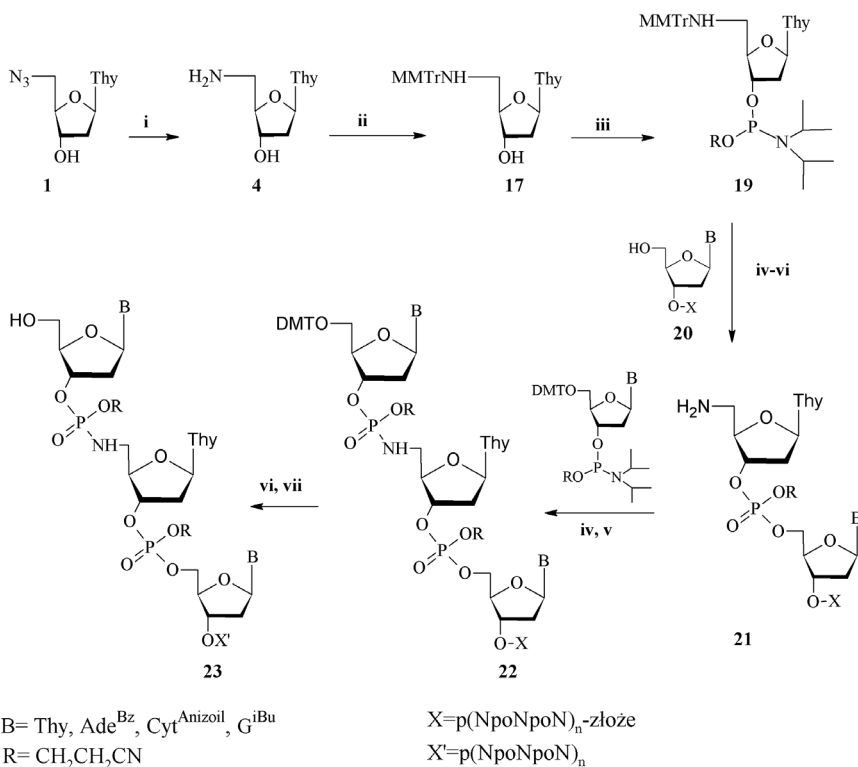
Schemat 2. Synteza trimeru ($\text{P}5' \rightarrow \text{N}3'$)amidofosforanowego
 Scheme 2. Synthesis of ($\text{P}5' \rightarrow \text{N}3'$)phosphoramidate trimer

Inną strategię syntezy ditymidyloamidofosforanu **16** zaproponował Hata [5]. Polegała ona na przekształceniu 3'-*H*-fosfonianu tymidyny (**13**) w odpowiedni bis(trimetylosiło)fosforyn (**14**), który w reakcji z 5'-azydo-5'-deoksytymidyną (**1**) i następczej hydrolizie przejściowego związku pośredniego **15** tworzył ditymidyloamidofosforan **16** (Schemat 3).



Schemat 3. Synteza dimeru ($\text{P}5' \rightarrow \text{N}3'$) amidofosforanowego poprzez reakcję 5'-azydo-5'-deoksytymidyny z fosforynem silikowym
 Scheme 3. Synthesis of ($\text{P}5' \rightarrow \text{N}3'$) NP-dimer in the reaction of 5'-azido-5'-deoxythymidine with silyl phosphite

W literaturze chemicznej opisane są również przykłady otrzymywania oligonukleozydo- $(\text{P}3' \rightarrow \text{N}5')$ amidofosforanów z wykorzystaniem metody amidofosforanowej. W ten sposób wprowadzono do oligonukleotydu jedno lub więcej wiązań amidofosforanowych umiejscowionych w różnych fragmentach cząsteczki [6]. Substratem w tego typu syntezach była również 5'-azydo-5'-deoksytymidyna (**1**), która w pierwszym etapie poddana była reakcji redukcji. Otrzymana 5'-amino-5'-deoksytymidyna (**4**) w regioselektywnej reakcji z chlorkiem monometoksytrytylowym (MMTrCl) prowadziła do 5'-(MMTr)NH-5'-deoksytymidyny (**17**) (Schemat 4).

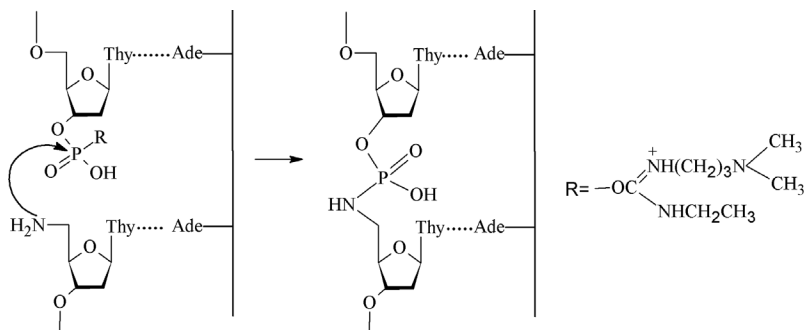


i) H₂, Pd/C; **ii)** MMTTrCl, 4-(Me₂N)Py/Et₃N; **iii)** ROP(NiPr)₂ (**18**), tetrazolidk diizopropylamoniowy; **iv)** 1*H*-tetrazol; **v)** I₂/H₂O; **vi)** H⁺; **vii)** NH₄OH

Schemat 4. Synteza oligonukleotydo-(P5'→N3')amidiofosforanu z wykorzystaniem metody amidofosforynowej
 Scheme 4. Synthesis of oligonucleotide-(P5'→N3')phosphoramidate using phosphoramidite method

Następnie związek **17** poddany reakcji fosfitylacji, przeprowadzonej za pomocą bis(*N,N*-diizopropyl)-2-cyanoetoksyamidofosforynu (**18**) wobec tetrazolidku diizopropylamoniowego, został przekształcony w amidofosforyn **19**. Synteza oligomerów zawierających wiązanie amidofosforanowe bądź 5'-terminalną grupę aminową była przeprowadzana poprzez wprowadzanie monomeru **19** do rosnącego łańcucha oligonukleotydu **20** z wykorzystaniem metody amidofosforynowej. W ten sposób autorzy otrzymali między innymi 16-mer zawierający jedno wiązanie (P3'→N5') amidofosforanowe w centralnej części oligonukleotydu oraz 21-mer z trzema takimi wiązaniami w pobliżu 5'-końca. Surowe produkty poddane były działaniu wodnego roztworu amoniaku w celu usunięcia grup ochronnych na nukleozasadach oraz odcięciu oligonukleotydów od złoża (hydroliza wiązania kowalencyjnego pomiędzy oligonukleotydem i łącznikiem). Następnie oligonukleotydy oczyszczono z zastosowaniem wydajnej chromatografii cieczowej w odwróconym układzie faz (RP HPLC) bądź poprzez elektroforezę na żelu poliakrylamidowym.

Interesujący przykład syntezy DNA zawierającego pojedynczą modyfikację (P3'→N5')amidofosforanową przedstawiła Shabarova [7]. Wykorzystała ona tzw. reakcję chemicznej ligacji do wprowadzania modyfikacji w określone miejsce jednoczy dwuniciowego DNA. Zastosowanie w tym przypadku ligacji enzymatycznej nie było możliwe ze względu na wysoką specyficzność substratową enzymów.



Schemat 5. Tworzenie się struktury dupleksowej poprzez nieenzymatyczną reakcję kondensacji w obecności matrycy

Scheme 5. Duplex formation by non-enzymatic template-directed condensation

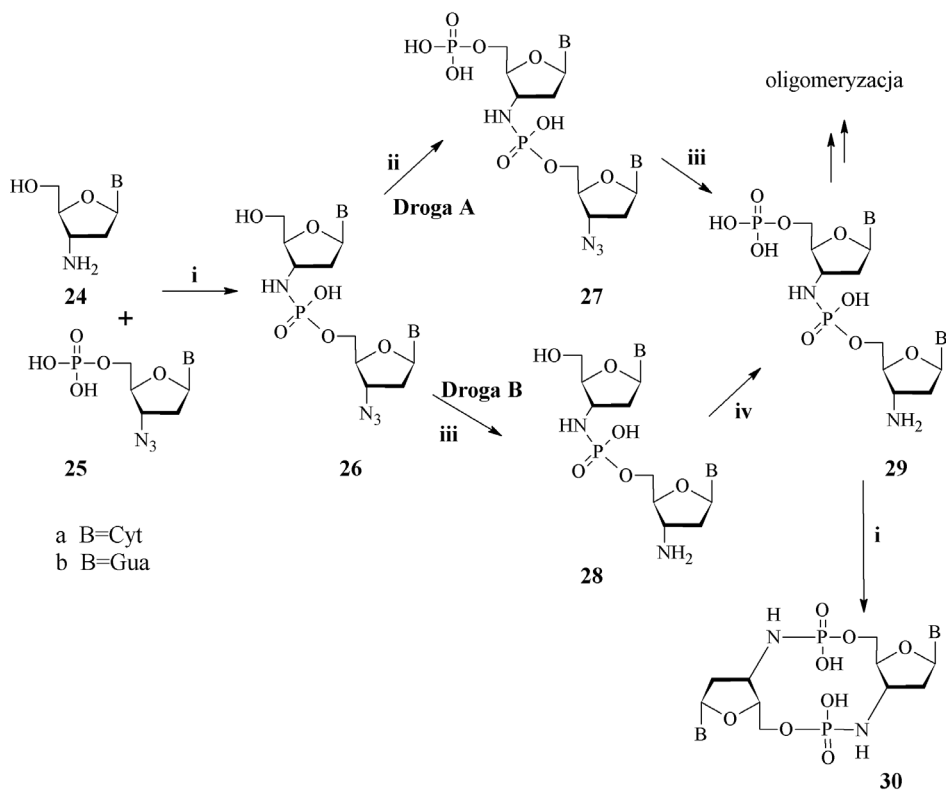
Zaproponowana przez Shabarovą ligacja chemiczna (Schemat 5) polegała na kondensacji w obecności komplementarnej matrycy dwóch fragmentów oligonukleotydu, z których jeden zawierał na 3'-końcu aktywowaną grupę fosforanową [np. za pomocą 1-etylo-3(3-dimetyloaminopropyl) karbodiimidu – EDC], a na 5'-końcu drugiego fragmentu znajdowała się grupa aminowa.

2. SYNTEZA OLIGODEOKSYRYBONUKLEOZYDO-(N3'→P5') AMIDOFOSFORANÓW

Niezwykle interesujący przykład syntezy (N3'→P5')amidofosforanowych pochodnych oligonukleotydów zaprezentował Orgel [8]. Mając na uwadze chemiczne procesy, które mogły wносить istotny wpływ w powstanie życia na Ziemi badał tzw. „chemiczne kopiowanie”, podczas którego same oligonukleotydy, bez udziału enzymów, ulegały replikacji. Przeprowadzone eksperymenty polegały na kondensacji pary komplementarnych monomerów, bądź krótszych fragmentów oligonukleotydów, z których jeden zawierał odpowiednią grupę reaktywną na 3', a drugi na 5'-końcu. W obecności odczynnika kondensującego wspomniane grupy reagowały ze sobą tworząc odpowiednie struktury dupleksowe. Komplementarność reagentów była konieczna po to, aby stanowiły one względem siebie niezbędne do samoreplikacji matryce.

Opisany przez Orgela proces „chemicznego kopiowania” polegał na wykorzystaniu dinukleozydo-(N3'→P5')amidofosforanu (**29**), na którego 5'-końcu znajdowała się grupa fosforanowa, a na 3'-końcu grupa aminowa (Schemat 6). Związek ten

otrzymano w wyniku reakcji pomiędzy 3'-aminowym ugrupowaniem nukleozydu **24** i zaktywowaną za pomocą 1-etylo-3(3-dimetyloaminopropylu) karbodiimidu (EDC) funkcją fosforanową znajdującą się na 5'-końcu 3'-azydonukleozydu (**25**). Powstały w ten sposób dinukleotyd **26** mógł być przekształcony w amidofosforan **29** według dwóch dróg. Jedna z nich (droga A) polegała na fosforylacji 5'-hydroksylowej grupy za pomocą trichlorku fosforu i następczej redukcji grupy 3'-azydkowej w związku **27**. Druga droga (B) wykorzystywała reakcję Staudingera do przekształcenia dinukleotydu **26** w 3'-aminopochodną **28**, która z kolei fosforylowana za pomocą kinazy polinukleotydydowej prowadziła do dinukleozydo-(N3'→P5')amidofosforanu **29** (Schemat 6).



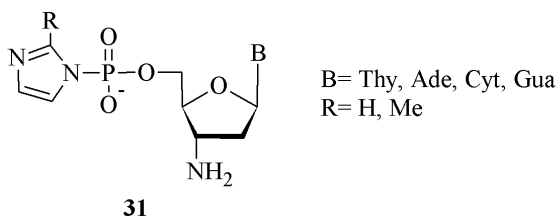
Reagenty: **i**) EDAC/HEPES (pH 7.5); **ii**) $\text{POCl}_3/(\text{EtO})_3\text{PO}$; **iii**) $\text{Ph}_3\text{P/Py/NH}_4\text{OH}$; **iv**) kinaza polinukleotydydowa

Schemat 6. Synteza i oligomeryzacja dimerów 3'-amino-3'-deoksynukleotydu (GC i CG) w środowisku wodnym

Scheme 6. Synthesis and oligomerization of dimers of 3'-amino-3'-deoxynucleotides (GC and CG) in aqueous solution

Uzyskane w ten sposób związki **29** były samokomplementarne, dzięki czemu wobec EDC mogły ulegać w dalszym etapie reakcji oligomeryzacji. Okazało się, że dodatek kationów jedno- i dwuwartościowych znacząco hamował szybkość tego procesu,

a optymalną wydajność uzyskiwano przy zastosowaniu buforu HEPES w 0°C. Produktem polimeryzacji była mieszanina oligonukleotydów amidofosforanowych o różnej długości, przy czym najdłuższym oligomerem był odpowiedni 30-mer. Analiza produktów tej reakcji wykazała, że oprócz polimeryzacji zachodziła konkurencyjna reakcja cykliczacji zaktywowanych związków **29** prowadząca do odpowiednich bis(3'→5')cyklicznych dinukleozydoamidofosforanów (**30**).



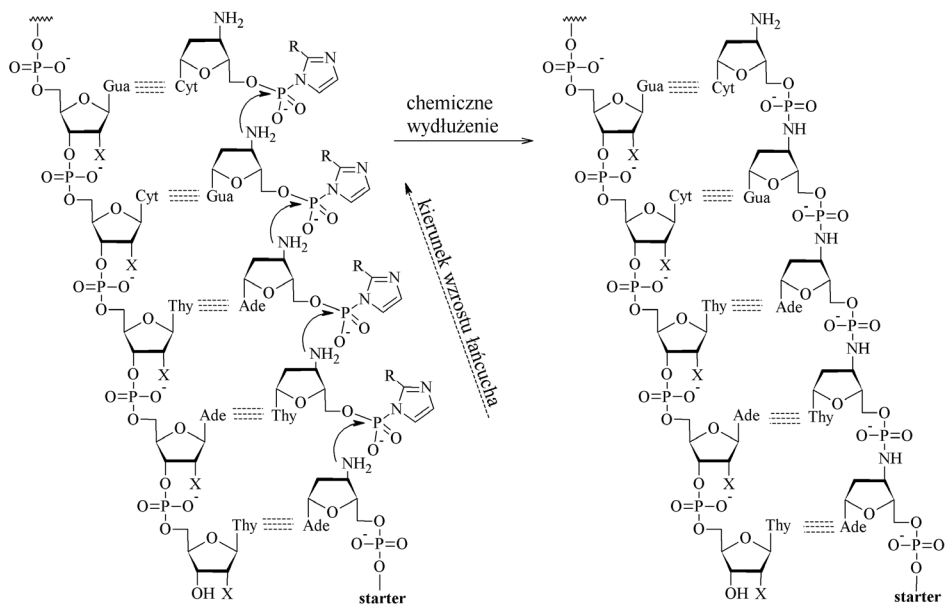
Rysunek 1. Struktura 5'-imidazolofosforanowych oraz 5'-(2-metyloimidazolo)-fosforanowych pochodnych 3'-amino-2',3'-dideoksy-nukleozydów

Figure 1. Structures of the activated 3'-amino-2',3'-dideoxyribonucleoside-5'-phosphorimidazole and 5-phosphor-2-methylimidazole monomers

Opracowaną przez Orgela [8] strategię „chemicznej replikacji” wykorzystał ostatnio Szostak [9], przedstawiając syntezę oligodeoksyrybonukleozydo-(N3'→P5') amidofosforanów, w której 5'-imidazolofosforanowe (3'-NH₂-ImpddN) oraz 5'-(2-metyloimidazolo)-fosforanowe (3'-NH₂-2-MeImpddN) pochodne 3'-amino-2',3'-dideoksynukleozydów (**31**) były wykorzystane jako monomery (Rys. 1) w reakcji wydłużenia odcinka starterowego (tzw. primera) na odpowiedniej matrycy, którą stanowiły cząsteczki DNA lub RNA (Schemat 7).

Przeprowadzone doświadczenia wykazały, że wydajność badanej reakcji w dużym stopniu zależy od aranżacji i konformacji reszty cukrowej w użytej nici matrycowej. Poza przypadkiem kiedy włączana była reszta adenozyiny, reakcje „chemicznego kopiowania” zachodziły w sposób bardziej wydajny, gdy RNA był zastosowany jako matryca. Taki wynik sugeruje, że przyjmowanie struktury helikalnej typu A ma kluczowe znaczenie dla efektywności procesu polimeryzacji. Jednocześnie w każdym przypadku pochodna 2-metyloimidazolowa (**31**, R=Me) okazała się być znacznie bardziej efektywna niż pochodna imidazolowa (**31**, R=H).

Jednakże w opracowaniu wydajnej metody syntezy oligonukleotydów zawierających internukleotydowe wiązania (N3'→P5')amidofosforanowe szczególnie użyteczną okazała się być reakcja oksydacyjnego aminowania (Reakcja Athertona-Todda [10]) polegająca na sprzęganiu w obecności czterochlorku węgla *H*-fosfonianowych diestrów z aminami. Początkowo ten typ reakcji był zastosowany przez Gryaznova i Sokolową do otrzymywania dinukleozydo-(P3'→N5')amidofosforanów, które następnie były wykorzystane do wprowadzenia pojedynczego wiązania amidofosforanowego w określone miejsce syntezowanego na fazie stałej łańcucha oligonukleotydowego [11].



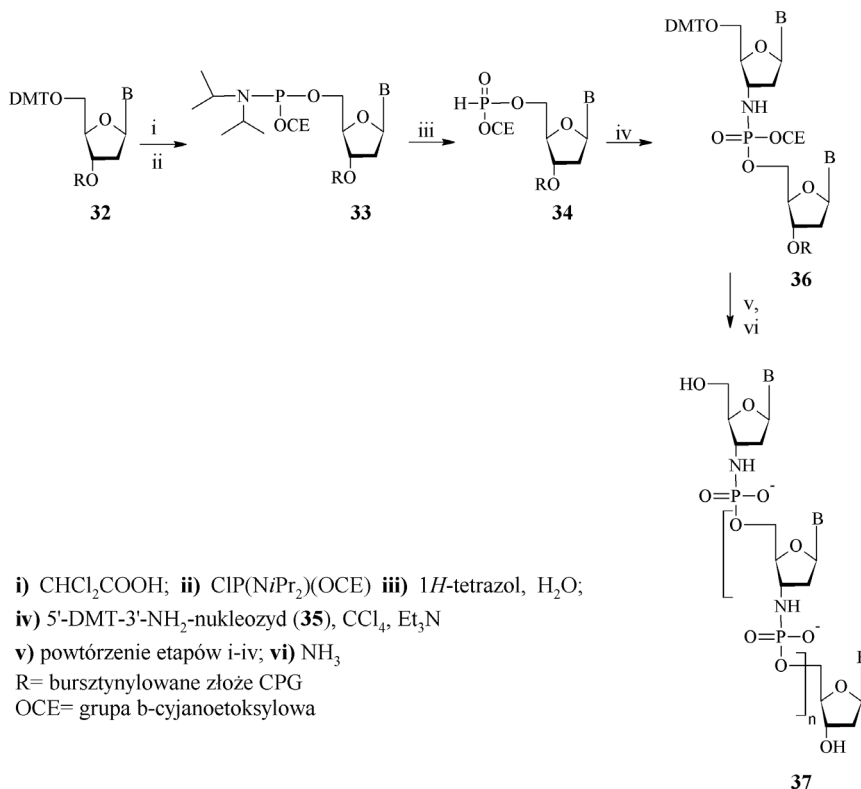
Schemat 7. Reakcja „chemicznej replikacji” zaktywowanych monomerów 3'-aminonukleotydów na matrycy DNA (X = H) lub RNA (X = OH)

Scheme 7. Chemistry of the template-directed „chemical replication” on a DNA (X = H) or an RNA (X = OH) template using activated 3'-aminonucleotide monomers

Następnie Gryznow i Chen w oparciu o reakcję Athertona–Todda opracowali syntezę oligonukleotydów, w których każde wiązanie internukleotydowe było zastąpione wiązaniem (N3'→P5')amidofosforanowym [12].

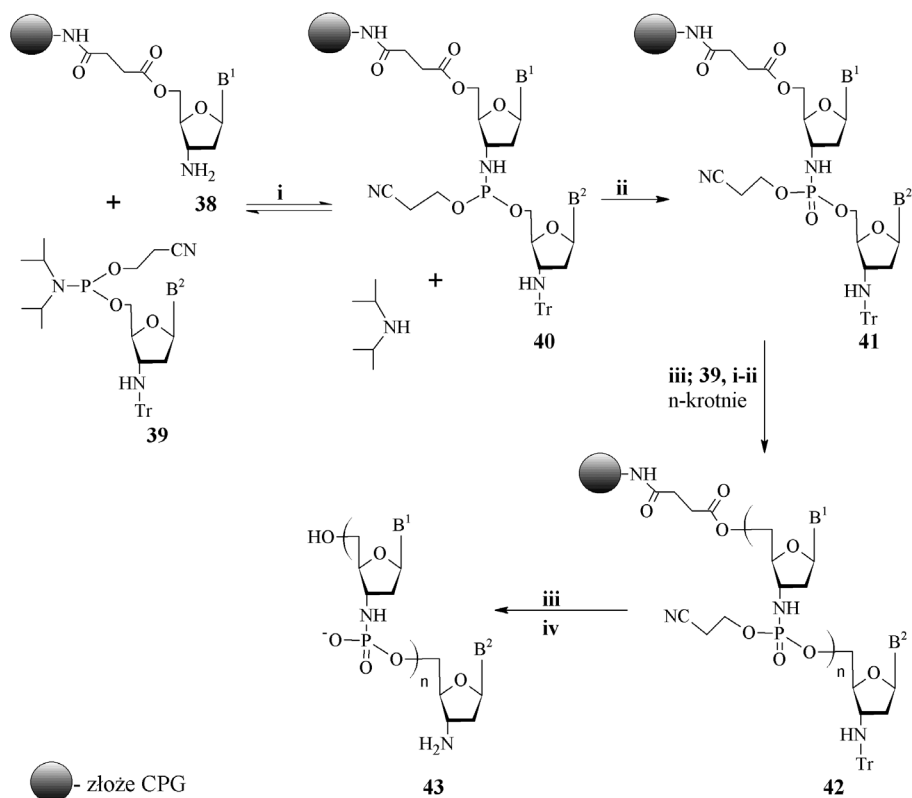
Zaproponowany przez autorów cykl syntetyczny obejmował w pierwszym etapie detrytylację nukleozydu **32** za pomocą 3% kwasu dichlorooctowego (DCA) w CH_2Cl_2 , a następnie fosfitylację uwolnionej 5'-hydroksylowej funkcji za pomocą roztworu 2-cyanoetylo-*N,N*-diisopropylchloroamidofosforanu w chlorku metylenu w obecności *N,N*-diizopropyletyloaminy. Otrzymana 5'-*O*-amidofosforanowa pochodna **33** (Schemat 8) była następnie hydrolizowana do *H*-fosfonianowej pochodnej **34** z wykorzystaniem 1*H*-tetrazolu. Kondensacja 5'-DMT-3'-aminonukleozydu **35** ze związkiem **34** w obecności CCl_4 i Et_3N prowadziła do pożądanego dinukleozydu **36**. Powtórzenie powyższego cyklu reakcji, a następnie odblokowanie i odcięcie oligonukleotydów od złoza za pomocą wodnego roztworu amoniaku pozwalało otrzymywać kilkunastonukleotydowe (N3'→P5')amidofosforany **37** z bardzo dobrymi wydajnościami. Jednakże wadą tej metodologii był stosunkowo długi czas pojedynczego cyklu, który wynosił około 60 minut. Otrzymane amidofosforany w przeciwieństwie do naturalnych oligodeoksyrybonukleotydów, wykazywały wysoką stabilność nukleolityczną wobec fosfodiesterazy z jadu węża. Dodatkowo wprowadzenie 3'-aminowego ugrupowania w miejsce atomu tlenu zmieniało również właściwości hybrydacyjne takich związków. Obserwowano

znaczący wzrost temperatur mięknięcia, świadczący o wzroście trwałości dupleksów utworzonych pomiędzy NP-oligomerami, a DNA i RNA w porównaniu do ich naturalnych odpowiedników.



Schemat 8. Synteza oligonukleotydów-($\text{N}3' \rightarrow \text{P}5'$)amidofosforanowych z wykorzystaniem reakcji Athertona-Todda
 Scheme 8. Synthesis of oligonucleotide-($\text{N}3' \rightarrow \text{P}5'$)phosphoramidate using Atherton-Todd reaction

Inną strategię syntezy oligodeoksyrybonukleozydo-($\text{N}3' \rightarrow \text{P}5'$)-amidofosforanów przedstawiła Fearon i współpracownicy [13]. Opracowana przez nich metodologia wykorzystywała jako wyjściowe monomery 5'- O -(N,N -diizopropylamino-2-cyanoetylo)amidofosforyno-3'-(trytylo)amino-2',3'-dideoksynukleozydy **39** (Schemat 9). Stąd też synteza oligonukleotydu przebiegała od 5'- do 3'-końca. Reakcja tworzenia wiązania internukleotydu zachodziła poprzez prowadzoną wobec $1H$ -tetrazolu wymianę grupy diizopropylaminowej we wprowadzanym amidofosforynie **39** na grupę 3'-aminową pochodzącą od przyłączonego do złoża nukleozydu **38**. Następnie utworzony na tej drodze dinukleozydoamidofosforyn **40** utleniany był w standardowych warunkach ($\text{I}_2/\text{H}_2\text{O}$) do odpowiedniego amidofosforanu **41**. Usunięcie grupy trytylowej z funkcji 3'-aminowej nukleozydu **41** pozwalało powtórzyć powyższy cykl reakcji n -krotnie.



i) 1*H*-tetrazol, CH₃CN; ii) I₂/H₂O, Py/THF; iii) H⁺; iv) NH₄OH

Schemat 9. Synteza oligonukleotydw-(N3'→P5')amidofosforanowych poprzez reakcję wymiany grupy aminowej w amidofosforynie

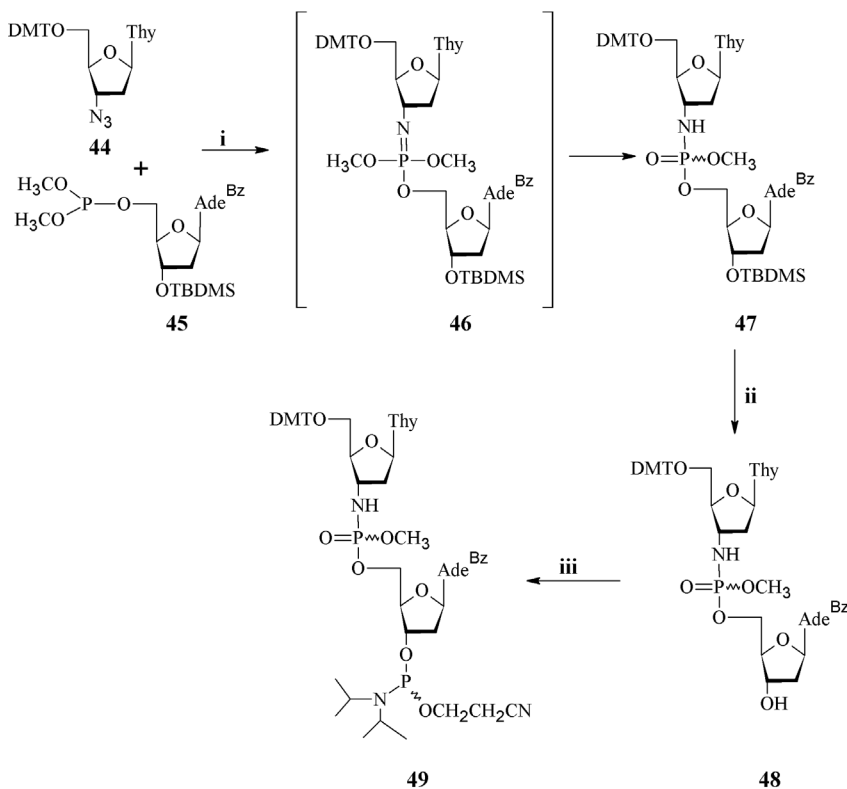
Scheme 9. Synthesis of oligonucleotide-(N3'→P5')phosphoramidates by phosphoramidite amine-exchange reaction

Końcowym etapem syntezy było usunięcie grupy trytylowej z 3'-terminalnej funkcji aminowej oligonukleotydu **42**, a następnie odcięcie oligomeru od złoza i deprotekcja zasad za pomocą stężonego wodnego roztworu amoniaku. Otrzymane oligodeoksyrybonukleotydy **43** oczyszczane były techniką HPLC z wykorzystaniem kolumny z wypełnieniem jonowymiennym. W ten sposób autorzy uzyskali 12–15-mery amidofosforanowe z wydajnościami rzędu 20–50%.

Poza opisanymi powyżej metodami, również w innych laboratoriach prowadzono badania nad otrzymywaniem oligodeoksyrybonukleozydo-(N3'→P5')amidofosforanów. Jednakże zastosowane w tych przypadkach podejścia pozwalały tylko na włączanie pojedynczych modyfikacji amidofosforanowych do łańcucha oligonukleotydu lub na syntezę jedynie odpowiednich dinukleotydwów.

Engels przedstawił syntezę samokomplementarnego dodekameru zawierającego jedno internukleotydo- wiązanie amidofosforanowe w centralnej części

oligomeru [14]. Wykorzystując metodę amidofosforynową otrzymał w pierwszym etapie pentamer fosforanowy do którego przyłączył dinukleotyd **48** zawierający wiązanie (N3'→P5')amidofosforanowe, a następnie kontynuował syntezę oligonukleotydu o określonej długości z wykorzystaniem standardowych monomerów amidofosforynowych. Wiązanie fosfor – azot w dinukleotydzie **48** (Schemat 10) utworzone było w reakcji typu Staudingera, pomiędzy 5'-O-DMT-3'-azydotymidyną (**44**) i fosforem dimetylowym **45**. Powstały iminofosforan (**46**) był następnie w obecności chlorku litu przekształcany do amidofosforanu **47** w transformacji typu Michaelisa–Arbuzova (Schemat 10). Deprotekcja 3'-hydroksylowej funkcji dinukleotydu **47** prowadziła do związku **48**, który po przekształceniu w odpowiedni 3'-amidofosforyn **49** był włączany do łańcucha oligonukleotydu.

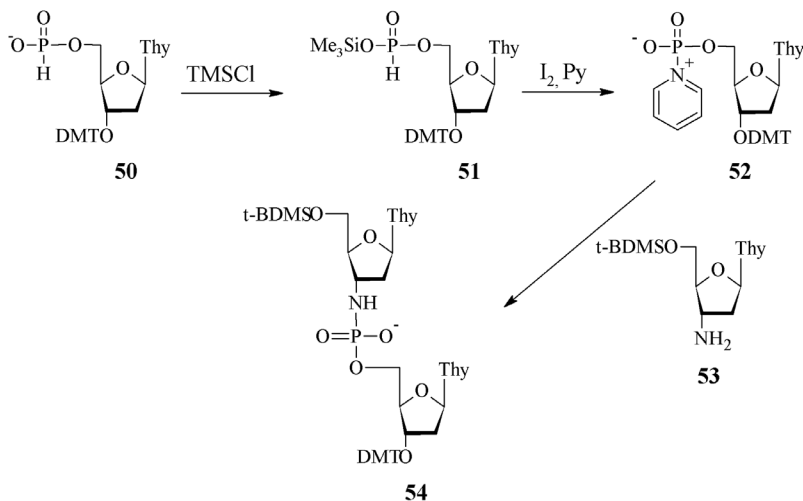


i) LiCl, Py; **ii)** TBAF, THF; **iii)** DIPEA, CIP(NiPr₂)(OCE)

Schemat 10. Synteza dinukleotydu zawierającego wiązanie (N3'→P5')amidofosforanowe
 Scheme 10. Synthesis of (N3'→P5')phosphoramidate dinucleotide

W zespole Stawińskiego została opracowana metoda syntezy ditymidylo-(N3'→P5')amidofosforanu wykorzystująca 5'-H-fosfonianową pochodną tymidyny **50** [15]. Związek ten w reakcji z chlorkiem trimetylosililowym został przekształcony w monosililową pochodną **51**, która potraktowana jodem w pirydynie tworzyła

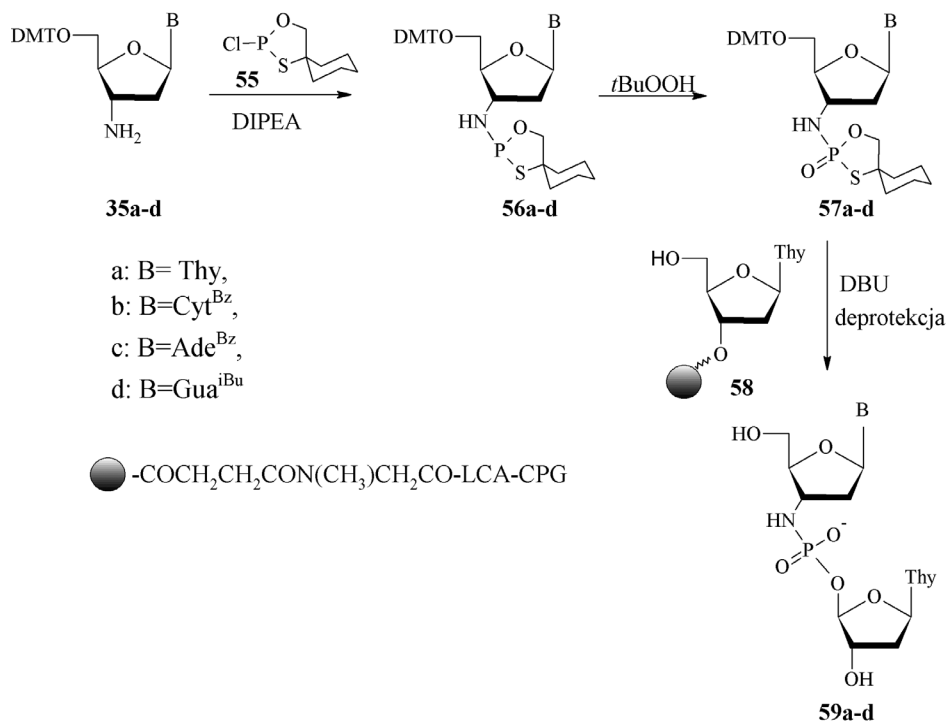
reaktywny związek **52** (Schemat 11). Dodanie do mieszaniny reakcyjnej 3'-amino-nukleozydu **53** prowadziło do pożądanego amidofosforanu **54**. Ze względu na dużą nukleofilowość grupy aminowej, która z łatwością atakowała centrum fosforowe, reakcja zachodziła w sposób ilościowy.



Schemat 11. Synteza ditymidylo-(N3'→P5')amidofosforanu

Scheme 11. Synthesis of dithymidyl-(N3'→P5')phosphoramidate

Dinukleozydo-(N3'→P5')amidofosforany były również otrzymane z wykorzystaniem opracowanej w zespole Steca metody oksatiafosfolanowej [16]. Opisana 1999 roku strategia polegała na syntezie 3'-N-[(2-oxo-4,4-spiro(pentametyleno-1,3,2-oksatiafosfolanylo)]-3'-amino-2,3'-dideoksyrybonukleozydów (**57**, Schemat 12) jako kluczowych związków pośrednich [17]. Były one otrzymywane w dwuetapowej syntezie. Reakcja odpowiednio chronionych w części nukleozasady 5'-O-DMT-3'-amino-2,3'-dideoksyrybonukleozydów (**35**) z 2-chloro-4,4-spiro(pentametyleno-1,3,2-oksatiafosfolanem) (**55**) prowadziła do odpowiednich pochodnych trikoordynacyjnego fosforu (**56**), które *in situ* były w kolejnym etapie utlenione za pomocą nadtlenu tert-butyłowego do odpowiednich pochodnych 2-okso (**57**).



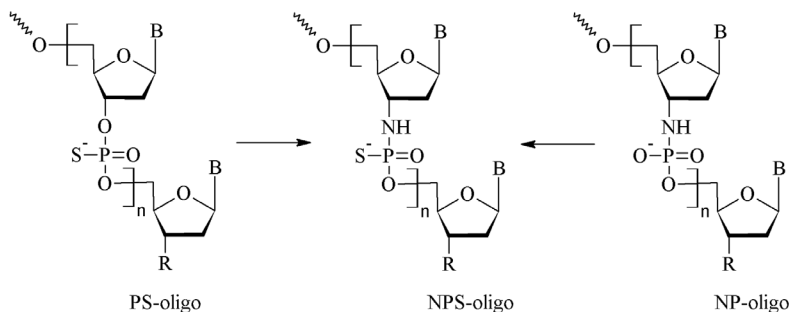
Schemat 12. Synteza dimerów-(N3'→P5')amidofosforanowych z wykorzystaniem metody oksatiafosforanowej
 Scheme 12. Synthesis of (N3'→P5')phosphoramidate dimers using oxathiaphospholane chemistry

Otrzymane w ten sposób monomery **57** w reakcji wobec DBU z 5'-hydroksylową grupą przyłączonej do stałego nośnika tymidyny (**58**) prowadziły do odpowiednich (N3'→P5') dimerów (**59**) z wydajnością w granicach 89–93%.

Jednakże wydłużanie łańcucha oligonukleotydu, pomimo modyfikowania warunków reakcji (np. zmiana czasu kondensacji, rozpuszczalnika, przeprowadzenie dwukrotnej kondensacji) przebiegało z obniżoną wydajnością ok. 50%. Stwierdzona niska rozpuszczalność ditymidylo-(N3'→P5')amidofosforanu (**59a**) w acetonitrylu nasunęła przypuszczenie, że przyczyną niezadowalającej wydajności kondensacji na fazie stałej może być utrudniony kontakt z reagentami wprowadzonymi do kolumny reakcyjnej. Zatem metoda oksatiafosforanowa nie może być zastosowana do syntezy NP-ONs, natomiast stanowi wydajną metodę syntezy dinukleotydów typu (N3'→P5').

3. SYNTEZA OLIGODEOKSYRYBONUKLEOZYDO-(N3'→P5') AMIDOTIOFOSFORANÓW

Opisane uprzednio (N3'→P5')amidofosforanowe analogi oligonukleotydów tworzą niezwykle trwałe duplekisy z komplementarnymi fragmentami DNA i RNA, jak i również tryplekisy z dupleksami DNA oraz wykazują wysoką odporność na działanie nukleaz wewnątrzkomórkowych. Jako oligonukleotydy antysensowne wykazują one porównywalną, a niejednokrotnie nawet zwiększoną aktywność w stosunku do tiofosforanowych oligodeoksyrybonukleotydów [18].

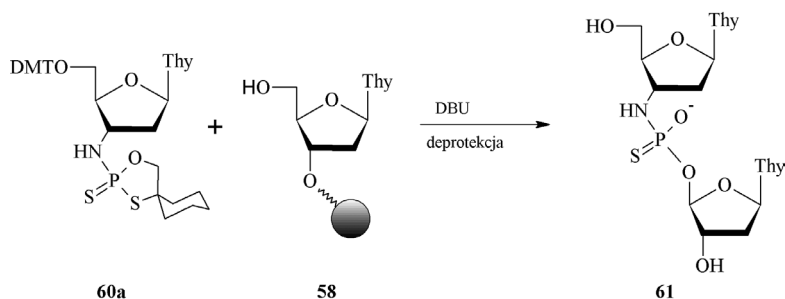


Rysunek 2. Struktura chemiczna PS-oligo, NPS-oligo i NP-oligo
Figure 2. Chemical structure of PS-oligo, NPS-oligo and NP-oligo

Naturalną konsekwencją poszukiwania modyfikowanych oligonukleotydów o potencjalnym zastosowaniu terapeutycznym było wprowadzenie tych dwóch modyfikacji w strukturę jednej cząsteczki (Rys. 3).

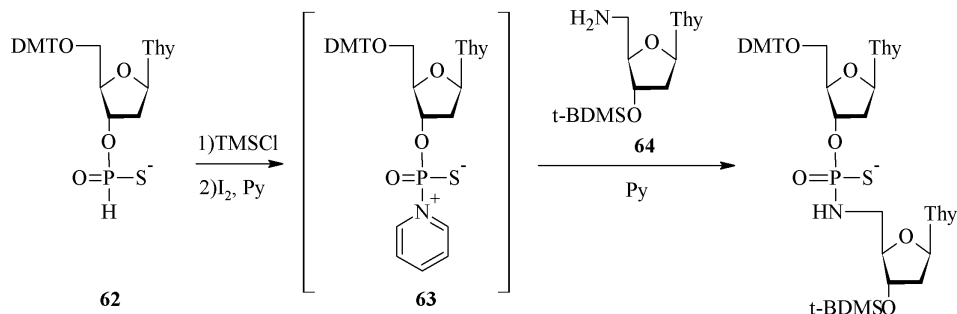
Celowość projektowania tak modyfikowanych oligodeoksyrybo-nukleotydów została potwierdzona przez Gryaznova i współpracowników, którzy wykazali iż NPS-oligonukleotydy charakteryzują się korzystniejszymi właściwościami w porównaniu do NP-ONs [19].

Jednakże pierwszym przykładem syntezy dinukleozydo(N3'→P5')-amidotiofosforanu była synteza odpowiedniej ditymidylowej pochodnej z wykorzystaniem metody oksatiafosfolanowej [17]. Przeprowadzona wobec DBU kondensacja 5'-O-DMT-2',3'-dideoksytymidyno-3'-N-[(2-tio-4,4-spiro-(penta metyleno-1,3,2-oksatiafosfolanu), **60**] z wolną grupą 5'-hydroksylową nukleozydu zawieszono na złożu (**58**) prowadziła do otrzymania oczekiwanego ditymidyl-(N3'→P5')amidotiofosforanu **61** (Schemat 13). Oksatiafosfolan **60** zsyntezowany został w reakcji utlenienia P-III pochodnej **56a** za pomocą elementarnej siarki. Niestety, podobnie jak w przypadku próby syntezy NP-oligo kolejne przyłączenie również nie było zadowalająco wydajne.



Schemat 13. Synteza ditymidylo-(N3'→P5')amidotiofosforanu z wykorzystaniem metody oksatiafosfolanowej
 Scheme 13. Synthesis of dithymidyl-(N3'→P5')thiophosphoramidate using oxathiaphospholane chemistry

Opisana uprzednio procedura syntezy NP-dimerów z wykorzystaniem chemii *H*-fosfonianowej została także użyta do syntezy ditymidylo-(P3'→N5')amidotiofosforanu **65** [15]. W tym przypadku jako substraty wykorzystano 3'-*H*-tiofosfoniową pochodną 5'-DMT-tymidyny **62** oraz 5'-aminotymidynę **64** (Schemat 14).

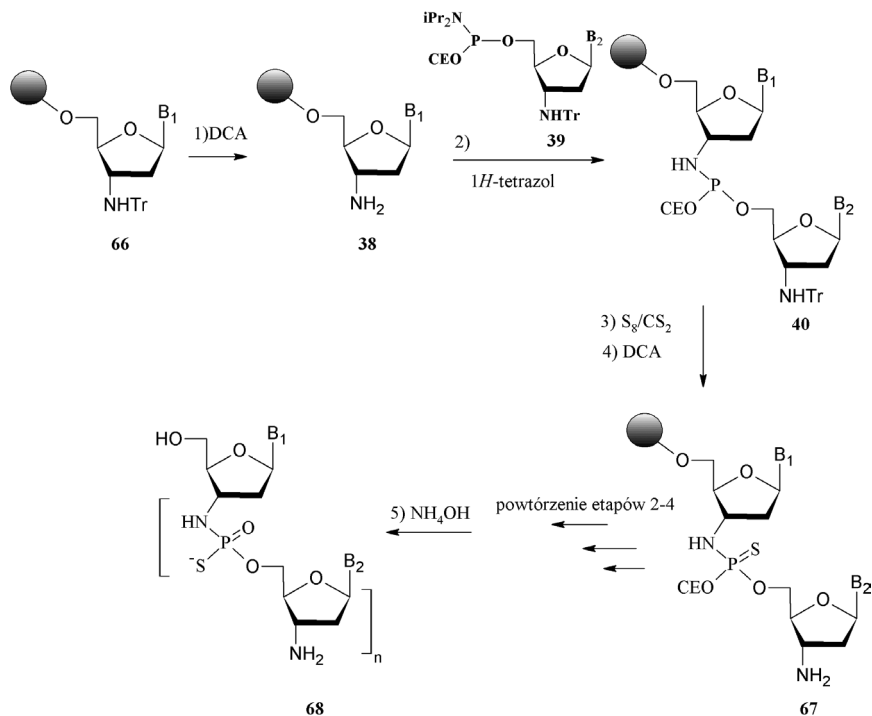


Schemat 14. Synteza ditymidylo-(P3'→N5')amidotiofosforanu
 Scheme 14. Synthesis of dithymidyl-(P3'→N5')thiophosphoramidate

Gryaznov i Pongracz [20] opisali wydajną metodę syntezy amidotiofosforanowych analogów DNA na fazie stałej z wykorzystaniem metody amidofosforynowej. Jako wyjściowe monomery zostały użyte 5'-*O*-(*N,N*-diizopropylamino-2-cyanoetylo)amidofosforyno-3'-(trytylo)-amino-2',3'-dideoksynukleozydy (**39**), które otrzymano wychodząc z 3'-amino-2',3'-dideoksynukleozydów w kilkuetapowej syntezie [21].

Cykl syntetyczny prowadzący do oligodeoksyrybonukleozydo-(N3'→P5')amidotiofosforanów obejmował w pierwszym etapie usunięcie grupy trytylowej z funkcji 3'-aminowej w nukleozydzie **66** za pomocą DCA (Schemat 15). Następnie do otrzymanego 3'-aminonukleozydu (**38**) przyłączony został wobec 1*H*-tetrazolu 5'-*O*-cyanoetylo-*N,N*-diizopropylamidofosforyn 3'-aminonukleozydu (**39**). W kolejnym etapie pochodna trikoordynacyjnego fosforu (**40**) była utleniona do NPS-dimeru **67** za pomocą elementarnej siarki. Powtórzenie powyższego cyklu

n-krotnie z następczym odblokowaniem nukleozad i odcięciu od złoza prowadzi do połączonych NPS-oligonukleotydów (68).



Schemat 15. Synteza oligonukleotydo-(N3'→P5')amidotiofosforanów

Scheme 15. Synthesis of oligonucleotide-(N3'→P5') thiophosphoramidates

4. WŁAŚCIWOŚCI BIOLOGICZNE I FIZYKOCHEMICZNE

Oligodeoksyrybonukleozydo-(N3'→P5')amidofosforany charakteryzują się zwiększoną odpornością na degradację nukleolityczną przez wewnątrzkomórkowe nukleazy zarówno *in vitro* jak i *in vivo*, a co ważniejsze hybrydują do komplementarnych fragmentów DNA i RNA znacznie silniej niż ich naturalne odpowiedniki [12]. Ta ostatnia cecha wyróżnia je spośród innych analogów oligonukleotydów, w przypadku których z reguły, wraz ze wzrostem stabilności nukleolitycznej obserwuje się spadek powinowactwa względem docelowej sekwencji DNA lub RNA. Konsekwencją tego zjawiska jest obserwowany wzrost temperatur mięknienia (T_m)¹ dupleksów utworzonych pomiędzy NP-ONs, a DNA lub RNA. Co więcej proces

¹ Jest to parametr pozwalający określić trwałość kwasów nukleinowych. T_m to temperatura przy której połowa ilości dupletu utworzonego przez ten oligomer ulega dysocjacji. T_m zależy od takich czynników jak: stężenie soli, stężenie, sekwencja oraz długość oligonukleotydu, jak również od obecności czynników denaturujących

formowania się wspomnianych dupleksów jest wysoce zależny od sekwencji. Wykazano, że pojawienie się w 11-merze amidofosforanowym pojedynczego niekomplementarnego nukleozydu (ang. *mismatch*) powoduje obniżenie wartości T_m o około 12°C [22].

Również mobilność chromatograficzna NP-ONs jest inna niż naturalnych oligonukleotydów. Na kolumnach z odwróconą fazą (RP HPLC) wykazują one krótsze czasy retencji niż ich fosforanowe odpowiedniki, podczas gdy w przypadku wypełnień jonowymiennych jak i elektroforezy sytuacja jest odwrotna [23].

Wszystkie zaznaczone powyżej różnice świadczą o znaczącym wzroście hydratacji jak i sztywności szkieletu cukrowo-fosforanowego w amidofosforanowych pochodnych kwasu deoksyrybonukleinowego w porównaniu do jego natywnej formy. Zostało to potwierdzone za pomocą analizy rentgenostrukturalnej odpowiedniego dupleksu [24]. Ustalono, że konformacja pierścienia 2'-deoksyfuranozy w 3'-amino nukleozydach jest w przeważającej mierze typu C3'-endo [25], a dupleksy utworzone przez (N3'→P5')amidofosforanowe analogii DNA przyjmują charakterystyczną dla cząsteczek RNA prawoskrętną formę A. Jednocześnie obecność grupy 3'-aminowej powoduje wzrost ilości cząsteczek wody przypadających na szkielet cukrowo-fosforanowy. W naturalnym DNA w szkielecie cukrowo-fosforanowym występuje wiele akceptorów wiązań wodorowych natomiast brak jest odpowiednich donorów. Zamiana 3' atomu tlenu na funkcję aminową wprowadza do cząsteczki grupę, która może służyć zarówno jako donor jak i akceptor wiązania wodorowego. Stąd też w uzyskanej strukturze krystalograficznej na jedno internukleotydowe ugrupowanie amidofosforanowe przypadało od dwóch do trzech cząsteczek wody. Wykazano, że w większości przypadków dwie cząsteczki wody tworzyły mostek pomiędzy grupą aminową a jednym spośród sąsiadujących niemostrkowych atomów tlenu.

Inną interesującą własnością, którą wykazują amidofosforanowe pochodne oligodeoksyrybonukleotydów jest ich zdolność do tworzenia bardzo trwałych struktur trypleksowych z dupleksami DNA [22]. Szczególna stabilność tego typu kompleksów przypisywana jest, przynajmniej częściowo, pofałdowaniu pierścienia cukrowego typu N. Przyjmowanie takiej konformacji ułatwia znacząco formowanie się właściwych par zasad typu Hoogsteena jak również wpływa na ich trwałość [26].

5. POTENCJALNE ZASTOSOWANIE TERAPEUTYCZNE

NP-oligonukleotydy dzięki strukturalnemu podobieństwu do naturalnego RNA mogą specyficznie wiązać się z białkami oraz innymi oddziałującymi z RNA biomolekułami. Na przykład zaprojektowane oligonukleozydo-amidofosforany, których sekwencja zasad odpowiadała fragmentom RRE i TAR w RNA wirusa HIV-1, były rozpoznawane przez białka Rev i Tat pełniące ważną funkcję w procesie replikacji wirusa HIV [27].

Wśród różnego rodzaju potencjalnych zastosowań NP-ODNs na szczególną uwagę zasługuje ich oddziaływanie z ludzką telomerazą (TA), w stosunku do której wykazuje aktywność inhibitorową.

Enzym ten dobudowuje sześci nukleotydomową sekwencję telomerową d(T-TAGGG)n na końcach chromosomów komórki ulegającej podziałowi [28]. Większość prawidłowych komórek jest zdolna do ograniczonej liczby podziałów, która regulowana jest przez długość telomerów. Telomer skracając się podczas każdego podziału komórki jest odbudowywany za pomocą telomerazy. Aktywność telomerazy zmniejsza się z wiekiem, tak że w większości dojrzałych komórek somatycznych enzym ten nie jest obecny. Jednakże badania próbek pobranych od pacjentów chorych na nowotwory wykazują, iż blisko 90% z nich wykazuje aktywność tego enzymu. Komórki nowotworowe są na ogół całkowicie zależne od aktywności telomerazy. Stąd też prowadzone są badania mające na celu blokowanie procesu nowotworowego przez hamowanie aktywności telomerazy.

Spośród różnego rodzaju związków rozpatrywanych jako inhibitory telomerazy istotne miejsce zajmują oligodeoksyrybonukleozydo-(N3'→P5')amidotiofosforany. Szczególnie atrakcyjnym związkiem okazał się zaprojektowany przez amerykańską firmę biofarmaceutyczną Geron Corporation oligonukleozydo-(N3'→P5')amidotiofosforan (GRN163L) będący 13-merem o sekwencji 5'-TAGGGTTAGACAA-3' [29].

GRN163L został dopuszczony do badań klinicznych pod nazwą Imetelstat. Obserwacje poczynione na kolejnych etapach badań klinicznych wykazały, iż jest on szczególnie aktywny względem nowotworów piersi, płuc oraz nowotworów hematologicznych tj. szpiczaka mnogiego oraz nadpłytkowości samoistnej. Obecnie Imetelstat znajduje się w II fazie badań klinicznych, w której będzie oceniana jego skuteczność w terapii monolekowej jak również w połączeniu z cytotoksyczną chemioterapią.

PODSUMOWANIE

Przeprowadzone w latach 90-tych ubiegłego wieku badania wykazały, że wprowadzenie do oligonukleotydu pojedynczej modyfikacji (P3'→N5')amidofosforanowej nie zmienia jego właściwości hybrydizacyjnych względem komplementarnej nici w porównaniu do naturalnych oligonukleotydów. Jednakże większa ilość takich modyfikacji powoduje destabilizację tworzonych dupleksów [30]. Stąd też oligorybonukleozydo-(P3'→N5')amidofosforany nie są rozpatrywane jako czynniki terapeutyczne, szczególnie w kontekście ich potencjalnego zastosowania jako leków antysensowych. Wprost przeciwnie zachowują się oligonukleozydo-(N3'→P5')amidotiofosforany dla których obserwowano wyraźny wzrost stabilności utworzonych przez nie dupleksów. Stąd też obecnie wysiłki chemików organików skupiają się wyłącznie na poszukiwaniu nowych, efektywniejszych metod syntezy amidofosforanowych analogów kwasów nukleinowych typu (N3'→P5').

PODZIĘKOWANIE

Serdecznie dziękuję pani dr hab. Janinie Baraniak za materiały oraz cenne wskazówki i sugestie, które pozwoliły na powstanie tego artykułu.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] P.C. Zamecnik, M.L. Stephenson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1975**, 280.
- [2] B. Jastorff, H. Hettler, *Chem. Ber.*, 1969, **102**, 4119.
- [3] W.S. Mungall, G.L. Greene, G.A. Heavner, R.L. Letsinger, *J. Org. Chem.*, 1975, **40**, 1659.
- [4] R. Letsinger, G.A. Heavner, *Tetrahedron Lett.*, 1975, **2**, 147.
- [5] T. Hata, I. Yamamoto, M. Sekine, *Chem. Lett.*, 1976, 601.
- [6] W. Bannwarth, *Helv. Chim. Acta*, 1988, **71**, 1517.
- [7] Z.A. Shabarova, *Biochemie*, 1988, **70**, 1323.
- [8] W.S. Zielinski, L.E. Orgel, *Nucleic Acids Res.*, 1987, **15**, 1699.
- [9] S. Zhang, N. Zhang, J.C. Blain, J.W. Szostak, *J. Am. Chem. Soc.*, 2013, **135**, 924.
- [10] F.R. Atherton, H.T. Openshaw, A.R. Todd, *J. Chem. Soc.*, 1945, 660.
- [11] S.M. Gryaznov, N.I. Sokolova, *Tetrahedron Lett.*, 1990, **31**, 3205.
- [12] S.M. Gryaznov, J.-K. Chen, *J. Am. Chem. Soc.*, 1994, **116**, 3143.
- [13] J.S. Nelson, K.L. Fearon, M.Q. Nguyen, S.N. McCurdy, J.E. Frediani, M.F. Foy, B.L. Hirschbein, *J. Org. Chem.*, 1997, **62**, 7278.
- [14] M. Mag, R. Schmidt, J. Engels, *Tetrahedron Lett.*, 1992, **33**, 7319.
- [15] I. Kers, J. Stawiński, A. Kraszewski, *Tetrahedron Lett.*, 1998, **39**, 1219.
- [16] W.J. Stec, A. Grajkowski, A. Kobyłańska, B. Karwowski, M. Koziółkiewicz, K. Misiura, A. Okruszek, A. Wilk, P. Guga, and M. Boczkowska, *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, **117**, 12019.
- [17] J. Baraniak, D. Korczyński, W.J. Stec, *J. Org. Chem.*, 1999, **64** 4533.
- [18] T. Skorski, D. Perrotti, M. Nieborowska-Skroska, S. M. Gryaznov, B. Calabretta, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, **94**, 3966.
- [19] R. Pruzan, D. Zielinska, B. Rebowska-Kocon, B. Nawrot, S.M. Gryaznov, *New J. Chem.*, 2010, **34**, 870.
- [20] K. Pongracz, S.M. Gryaznov, *Tetrahedron Lett.*, 1999, **40**, 7661.
- [21] D. Zielinska, K. Pongracz, S.M. Gryaznov, *Tetrahedron Lett.*, 2006, **47**, 4495.
- [22] C. Escude, C. Giovannangeli, J.-S. Sun, D.H. Lloyd, J.-K. Chen, S.M. Gryaznov, T. Garestier, C. Helene, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1996, **93**, 4365.
- [23] S.M. Gryaznov, *Nucleosides Nucleotides*, 1997, **16**, 899.
- [24] V. Tereshko, S.M. Gryaznov, M. Egli, *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, **120**, 269.
- [25] D. Ding, S.M. Gryaznov, W.D. Wilson, *Biochemistry*, 1998, **37**, 12083.
- [26] R.W. Roberts, D.M. Crothers, *Science*, 1992, **258**, 1463.
- [27] S.M. Gryaznov, *Biochim. Biophys. Acta*, 1999, **1489**, 131.
- [28] E.H. Blackburn, *Mol. Cancer Res.*, 2005, **3**, 477.
- [29] S.M. Gryaznov, A. Asai, Y. Oshima, Y. Yamamoto, K. Pongracz, R. Pruzan, E. Wunder, M. Piaty-szek, S. Li, A. Chin, C. Harley, S. Akinaga, Y. Yamashita, *Nucleosides, Nucleotides & Nucl. Acids*, 2003, **22**, 577.
- [30] S.M. Gryaznov, R.L. Letsinger, *Nucleic Acids Res.*, 1992, **20**, 3403.

**PROLINA – POSPOLITY AMINOKWAS WYJĄTKOWY
KATALIZATOR. CZĘŚĆ II. MIĘDZYCZĄSTECZKOWA
KONDENSACJA ALDOLOWA**

PROLINE AS A COMMON AMINO ACID
AND AN EXCEPTIONAL CATALYST. PART II.
INTERMOLECULAR ALDOL REACTION

**Renata Kołodziejska, Marcin Wróblewski,
Aleksandra Karczmarzka-Wódzka, Renata Studzińska,
Marcin Dramiński**

*Katedra i Zakład Chemii Ogólnej Uniwersytetu Mikołaja Kopernika
Collegium Medicum w Bydgoszczy
ul. Dębowa 3, 85-626 Bydgoszcz
e-mail: renatakol@poczta.fm*

Abstract

Wprowadzenie

1. Międzycząsteczkowa reakcja aldolowa

1.1. Donor keton

1.1.1. Donor keton – akceptor aldehyd

1.1.2. Donor keton – akceptor keton

1.2. Donor aldehyd

1.2.1. Donor aldehyd – akceptor aldehyd

1.2.2. Donor aldehyd – akceptor keton

Uwagi końcowe

Piśmiennictwo cytowane



Mgr Aleksandra Karczmarzka-Wódzka, ukończyła chemię na Uniwersytecie Mikołaja Kopernika w Toruniu. Pracę magisterską wykonała w Zakładzie Chemii Organicznej. Obecnie pracuje w Katedrze i Zakładzie Chemii Ogólnej *Collegium Medicum* w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. W ramach pracy doktorskiej zajmuje się enancjoselektywną redukcją analogów nukleozydowych.



Dr Renata Kołodziejska, pracownik Katedry i Zakładu Chemii Ogólnej *Collegium Medicum* w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. Zainteresowania naukowe Autorki związane są z badaniami nad regio- i stereoselektywnymi właściwościami biokatalizatorów oraz modyfikacją analogów nukleozydów pirymidynowych.



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



Dr Marcin Wróblewski, pracownik Katedry i Zakładu Chemii Ogólnej *Collegium Medicum* w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. Zainteresowania naukowe Autora obejmują syntezę organiczną z wykorzystaniem enzymów jak również syntezę modyfikowanych nukleozydów pirymidynowych.



Prof. dr hab. Marcin Dрамиński, kieruje pracą w Zakładzie Chemii Ogólnej *Collegium Medicum*. Interesuje się chemią i stereochemią syntez związanych z analogami nukleozydów pirymidynowych i dydaktyką przedkliniczną dla studentów medycyny i kierunków pokrewnych.

ABSTRACT

Proline in organic synthesis is used as a small molecular organocatalyst. In a catalytic act proline, similarly to an enzyme, activates reagents, stabilizes transition state and influences an orientation of substrates [1–12]. Proline works as aldolase I (so called microaldolase I). In comparison with other amino acids it shows exceptional nucleophilicity which makes imines and enamines formation easier.

In the intermolecular aldol reaction proline was used for the first time by List and co-workers (Scheme 1) [3, 9, 20]. Since then an immense progress has been observed in this field. Several aldolization reactions were performed in the presence of proline. Reactions of this type proceed between the donor (nucleophile) and the acceptor (electrophile).

In aldol reaction the donors can be both ketones and aldehydes which next are condensed with ketones and aldehydes acting as electrophiles (Scheme 2–18; Tab. 1–7) [21–72]. The presence of proline ensures not only high yield of homo- and heteroaldolization but mainly enables conducting enantio- and diastereoselective synthesis. Intermolecular proline-catalyzed aldol condensation proceeds according to enamine mechanism. *Anti*-aldols, which make a valuable source of intermediates in the synthesis of important biologically active compounds, are mainly obtained in this reaction [35–44, 54, 58, 62, 63, 68, 69, 71].

Keywords: intermolecular aldol reaction, donor, acceptor, proline, *anti*-aldol

Słowa kluczowe: międzycząsteczkowa reakcja aldolowa, donor, akceptor, prolina, *anti*-aldole

WPROWADZENIE

Stereochemia ma szczególne znaczenie w przemyśle farmaceutycznym ze względu na istotne dla każdego organizmu żywego interakcje lek–receptor. Z tego powodu dąży się do opracowania prostych i praktycznych metod syntezy związków chiralnych w postaci czystej enancjomerycznie.

Natura dysponuje szczególnym narzędziem (enzymem), który w niskiej temperaturze przeprowadza syntezę asymetryczną. Białko katalityczne stabilizuje stan przejściowy oraz umożliwia właściwą orientację substratu w miejscu aktywnym dając czysty enancjomerycznie produkt.

Poszukuje się katalizatorów uniwersalnych, które nie tylko zapewniają wyjątkową stereoselektywność, ale również wykazują szeroką specyficzność substratową. Kryterium to spełnia małowcząsteczkowy katalizator, jakim jest prolina. Aminokwas ten posiada wszystkie niezbędne właściwości do przeprowadzenia asymetrycznej transformacji. W akcie katalitycznym prolina podobnie jak enzym, aktywuje substrat, stabilizuje stan przejściowy i wpływa na właściwą orientację substratu [1–12].

Pomimo, iż prolina po raz pierwszy została użyta jako katalizator już w latach siedemdziesiątych, dopiero 25 lat później jej właściwości katalityczne zostały w pełni docenione. Obecnie ten prosty katalizator (odpowiednik aldolazy typu I) wykorzystuje się w reakcjach kondensacji aldolowych, Mannicha, Michaela oraz Dielsa-Aldera.

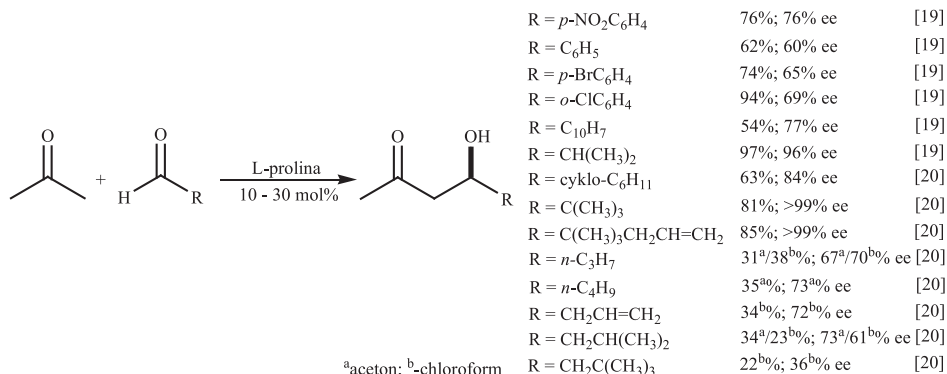
Mechanizm katalizowany w obecności proliny może zachodzić przez enaminy lub iminowy stan przejściowy. W pierwszym z nich prolina w wyniku utworzenia enaminy zwiększa charakter nukleofilowy reagenta. Natomiast w mechanizmie iminowym aktywowany jest elektrofil, podobnie jak w reakcji katalizowanej kwasami Brönsteda lub Lewisa [13–18]. W każdym z tych mechanizmów obie formy iminowa i enaminy istnieją obok siebie i wzajemnie się uzupełniają, z tego powodu List [16] reakcję, w której prolina pełni funkcję katalizatora nazwał „ying i yang asymetryczną aminokatalizą”.

W tej części pracy poświęcono na przedstawieniu enancjoselektywnych reakcji, międzycząsteczkowej kondensacji aldolowej katalizowanej L-proliną. Reakcje kondensacji aldolowej międzycząsteczkowej, podobnie jak reakcje kondensacji aldolowej wewnątrzcząsteczkowej, w obecności proliny przebiegają według mechanizmu enaminyowego.

1. MIĘDZYZĄSTECZKOWA REAKCJA ALDOŁOWA

W 2000 roku przeprowadzono po raz pierwszy międzycząsteczkową enancjoselektywną kondensację aldolową katalizowaną proliną. List i Barbas [3, 19, 20] w reakcji acetonu z aromatycznymi aldehydami oraz α -podstawionymi aldehydami alifatycznymi w obecności L-proliny otrzymali aldole z wysoką wydajnością i o dużej czystości optycznej ($ee > 99\%$) (Tab. 3). W tych warunkach nie udało się jednak

uzyskać produktów krzyżowej kondensacji w reakcji acetonu z α -niepodstawionymi aldehydami. Aldehydy posiadające protony w pozycji α enolizują i mogą ulegać homodimeryzacji. List i in. [3, 20] przeprowadzili krzyżową kondensację w mniej polarnym rozpuszczalniku (aceton lub mieszanina aceton/chloroform), zmniejszając tym samym ryzyko samokondensacji aldehydów. W reakcji z α -niepodstawionymi aldehydami otrzymali selektywnie produkty krzyżowe z czystością optyczną około 70% ee i z dużo mniejszą wydajnością rzędu 22–35% (Schemat 1). Jeden z tak uzyskanych aldoli posłużył jako związek wyjściowy w syntezie naturalnego feromonu korników – (S)-ipsenolu [20].



Schemat 1. Bezpośrednia krzyżowa kondensacja aldolowa katalizowana L-proliną

Scheme 1. Proline-catalyzed direct cross aldol reactions

Od momentu przeprowadzenia pierwszej krzyżowej kondensacji aldolowej katalizowanej proliną obserwuje się lawinowy postęp w tej dziedzinie. L-prolina okazała się wyjątkowo skutecznym katalizatorem, w selektywnej reakcji aldolowej katalizowanej proliną otrzymuje się całą gamę ważnych związków o właściwościach biologicznie czynnych.

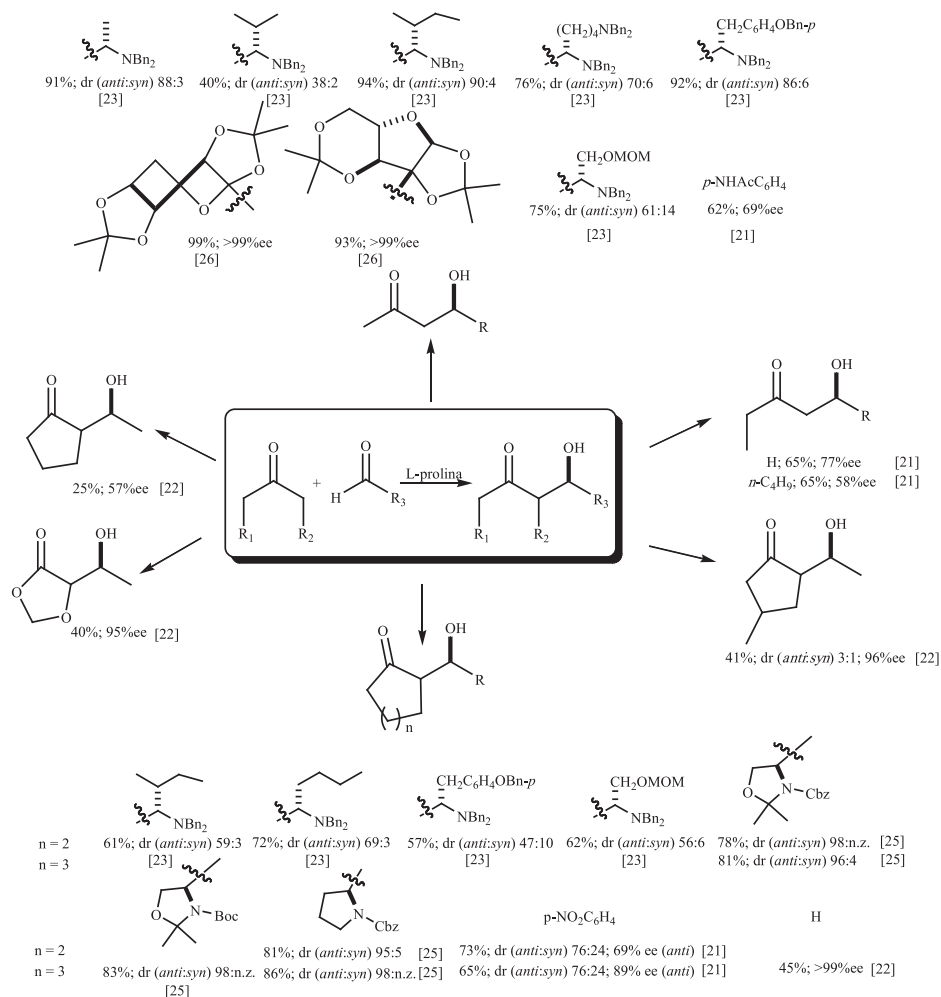
Generalnie każda międzycząsteczkowa kondensacja krzyżowa może przebiegać w układzie:

- donor–keton i akceptor–aldehyd lub keton,
- donor–aldehyd i akceptor–aldehyd lub keton.

1.1. DONOR KETON

1.1.1. Donor keton – akceptor aldehyd

Najczęściej krzyżowa kondensacja aldolowa przebiega pomiędzy ketonem pełniącym rolę donora i aldehydem–akceptorem.



Ac - acyl, Bn - benzyl; MOM - metoksymetyl; Cbz - karboksybenzyl; Boc - t-butoksybenzyl

Schemat 2. Reakcja kondensacji aldolowej katalizowanej L-proliną różnych ketonów z aldehydami

Scheme 2. L-proline catalyzed aldol reaction of various ketones with aldehydes

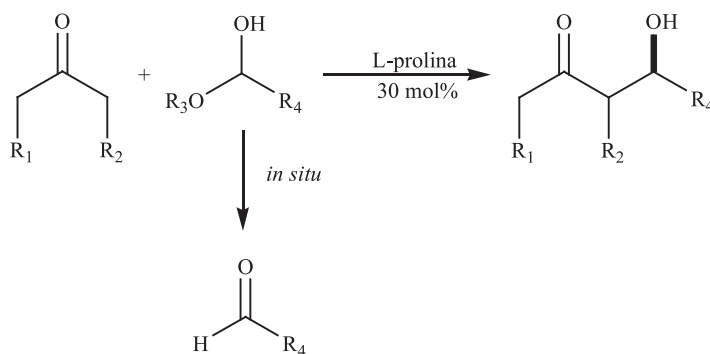
Na Schemacie 2 przedstawiono przykłady uzyskanych produktów międzycząsteczkowej kondensacji aldolowej różnych ketonów z aldehydami [21–26].

Wydajność otrzymanych aldoli wzrasta wraz ze wzrostem charakteru elektrofilowego aldehydów. Obecność podstawników elektronoakceptorowych zwiększa elektrofilowość karbonylowego atomu węgla, który staje się bardziej podatny na atak czynnika nukleofilowego. Na przykład w reakcji 4-nitrobenzaldehydu z cykloalkanonami otrzymano z ponad 60% wydajnością w przewadze diastereoizomer o konfiguracji *anti* (Schemat 2) [21]. Podobnie kondensacja aldolowa α -aminoaldehydów zawierających zabezpieczoną grupę aminową z alifatycznymi ketonami przebiega

również z dobrą wydajnością i diastereoselektywnie (Schemat 2). Otrzymuje się γ -amino- β -hydroksyketony o wysokiej czystości diastereoizomerycznej [23–25].

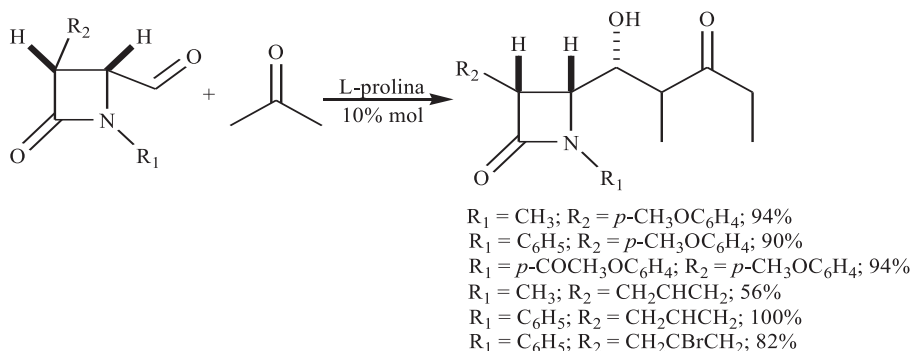
Natomiast w reakcji zaktywowanego fluorem acetaldehydu generowanego *in situ* z hemiacetalu trifluoroacetaldehydu z cykloalkanonami otrzymuje się β -hydroksy- β -trifluorometyloketony z dobrą wydajnością, diastereoselektywnością i wysoki nadmiarem enancjomerycznym (Tab. 1, pozycja 4,6) [27]. W zależności od zastosowanego ketonu uzyskano preferencyjnie jeden z dwóch możliwych diastereoizomerów. W reakcji z cyklopentanem otrzymano izomer *syn*, a w reakcji z cykloheksanem diastereoizomer *anti*. W Tabeli 1 przedstawiono wydajności chemiczne i optyczne fluoropochodnych (Tab. 1).

Tabela 1. Synteza fluoroaldoli
Table 1. Synthesis of fluoroaldols



Numer	R1	R2	R3	R4	Wydajność (%)	dr (%) (<i>anti/syn</i>)	ee (%)
1	H	H	H	CF ₃	64	–	38
2	H	H	CF ₂ CF ₃	CF ₃	97	–	41
3	CH ₃	H	H	CF ₂ CF ₃	69	–	44
4	(CH ₂) ₂		C ₂ H ₅	CF ₃	96	2:98	78
5	(CH ₂) ₂		H	CF ₂ CF ₃	77	6:94	77
6	(CH ₂) ₃		C ₂ H ₅	CF ₃	68	96:4	91
7	(CH ₂) ₃		H	CF ₂ CF ₃	71	99:4	93

Ciekawym przykładem diastereoselektywnej kondensacji aldolowej, w której bierze udział akceptor dodatkowo zaktywowany podstawnikiem wyciągającym elektrony jest reakcja 4-oksoazetydno-2-karbaldehydu z acetonem [28]. Użycie proliny jako katalizatora umożliwiłoby uzyskanie czystych diastereoizomerycznie γ -amino- β -hydroksyketonów (dr *anti/syn* 100:0). Na Schemacie 3 podano wydajności otrzymanych aldoli.

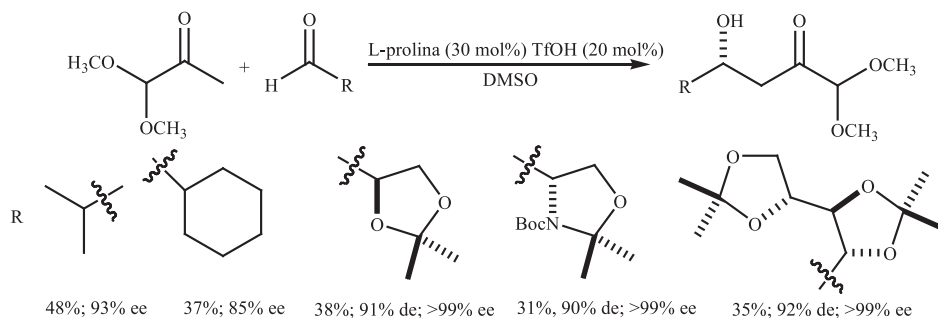


Schemat 3. Diastereoselektywna kondensacja aldolowa katalizowana prolina pomiędzy 4-oksoazetydno-2-karbaldehydami i acetonem

Scheme 3. Proline-catalyzed diastereoselective direct aldol reaction between 4-oxoazetidine-2-carbaldehydes and acetone

Ważną grupą związków poddawanych krzyżowej kondensacji aldolowej są ketony zawierające heteroatomy w pozycji α względem grupy karbonylowej. Prawdopodobnie heteroatom stabilizuje enaminyowy stan przejściowy i w ten sposób wpływa na poprawę selektywności katalizatora.

Użycie ketonów z dwoma heteroatomami w pozycji α , podstawionych do tego samego atomu węgla, w reakcji z alifatycznymi i aromatycznymi aldehydami umożliwia syntezę polifunkcyjnych aldoli (Schemat 4). Otrzymane krzyżowe produkty charakteryzowały się wysoką czystością optyczną (73 - >99% ee) oraz diastereoizomeryczną (dr = 19:1) [29].



Schemat 4. Synteza polifunkcyjnych aldoli

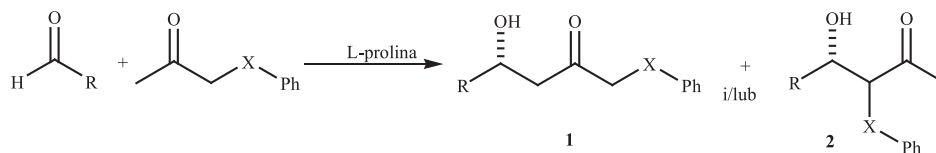
Scheme 4. Synthesis of multifunctionalized aldols

W reakcji kondensacji katalizowanej prolina fenylooksoacetonu lub fenylo-tioacetonu z aldehydami aromatycznymi uzyskano jeden z możliwych regioizomerów (Tab. 2, związek 2). Zastosowanie fenylooksoacetonu umożliwiło otrzymanie z dobrą wydajnością diastereoizomeru *anti* o wysokiej czystości optycznej, podczas gdy użycie fenylo-tioacetonu jako donora prowadzi z reguły do uzyskania aldoli bez

określonej preferencji [30]. Tylko w jednym przypadku (Tab. 2, numer 10) wychodząc z fenyltioacetonu otrzymano w przewodzie jeden z izomerów.

Tabela 2. Bezpośrednia kondensacja aldolowa fenylloksio(tio)acetonu z aldehydami.

Table 2. Direct aldol reaction of aldehydes with phenylthioacetone

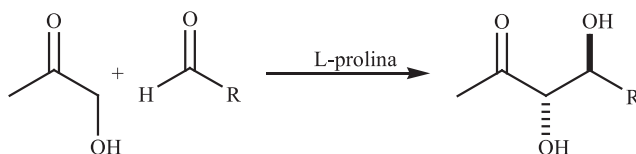


Numer	R	X	Stosunek 1:2	Sumaryczna wydajność (%)	dr (%) (anti/syn)	ee 1 (%)	ee 2 (%)
1	<i>p</i> -NO ₂ C ₆ H ₄	O	<1:99	65	>99:1	–	71
2	<i>p</i> -CNC ₆ H ₄	O	<1:99	70	80:20	–	90 (<i>anti</i>)
3	<i>p</i> -ClC ₆ H ₄	O	<1:99	70	75:25	–	99 (<i>anti</i>)
4	C ₆ H ₅	O	<1:99	66	85:15	–	64 (<i>anti</i>)
5		O	50:50	70	96:4	96	93 (<i>anti</i>)
6	<i>p</i> -NO ₂ C ₆ H ₄	S	<1:99	40	60:40	–	0
7	<i>p</i> -CNC ₆ H ₄	S	20:80	35	60:40	–	0
8	<i>p</i> -ClC ₆ H ₄	S	50:50	40	50:50	78	0
9	C ₆ H ₅	S	99:<1	27	–	68	–
10		S	95:5	40	99:1	95	–

Bardzo dobre rezultaty uzyskano w katalizowanej prolina kondensacji aldolowej z użyciem hydroksyacetonu jako donora [31, 32]. Jest to jedna z alternatywnych metod syntezy polihydroksylowych związków biologicznie czynnych poza układem fizjologicznym. Reakcja przebiegała z wysoką regioselektywnością. Wiązanie C–C powstawało w wyniku addycji aldehydów aromatycznych i alifatycznych do hydroksyacetonu w pozycji α w stosunku do grupy wodorotlenowej. Zastosowanie katalizatora umożliwiło przeprowadzenie kondensacji z wysoką enancjoselektywnością i diastereoselektywnością. W każdym przypadku niezależnie od konfiguracji katalizatora i aldehydu pełniącego funkcję akceptora otrzymano w przewodzie *anti* 1,2-ketodiole. Szczególnie wysoką regio- i diastereoselektywność uzyskano w reakcji hydroksyacetonu z α -podstawionymi aldehydami (Tab. 3, numer 1–3, 9–13).

Kondensacja hydroksyacetonu z α -aminoaldehydami umożliwia otrzymanie γ -amino- α,β -dihydroksyketonów [23].

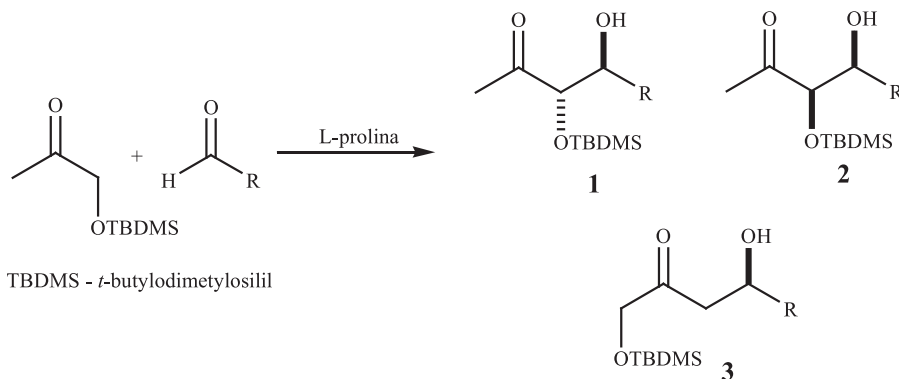
Tabela 3. Bezpośrednia kondensacja aldolowa hydroksyacetonu z aldehydami w obecności L-proliny
 Table 3. L-proline-catalyzed direct aldol reaction of hydroxyacetone with aldehydes



Numer	R	Wydajność (%)	dr (%) (<i>anti/syn</i>)	ee (%)	Lit.
1	cyklo-C ₆ H ₁₁	60	>20:1	>99	31, 32
2	CH(CH ₃) ₂	62	>20:1	>99	31, 32
3		51	>20:1	>95	31, 32
4	<i>o</i> -ClC ₆ H ₄	95	1,5:1	67	31, 32
5	CH ₂ C(CH ₃) ₃	38	1,7:1	>97	31, 32
6		40	2:1	>97	31, 32
7	C ₆ H ₅	83	1:1	80	31, 32
8	C ₁₀ H ₇	62	3:1	79	31, 32
9		83	79:4		23
10		80	76:4		23
11		78	74:4		23
12		70	59:11		23
13		70	69:9		23

W reakcji z hydroksyacetonem z zabezpieczoną grupą hydroksylową otrzymano również z dobrą wydajnością i diastereoselektywnością aldole. Kondensacja z aldehydami aromatycznymi lub nasyconymi alifatycznymi umożliwia uzyskanie preferencyjnie regioizomeru (1) (Tab. 4, numer 1–9), podczas gdy w reakcji z nienasyconymi aldehydami otrzymuje się głównie aldole (3) (Tab. 4, numer 10–12) [32].

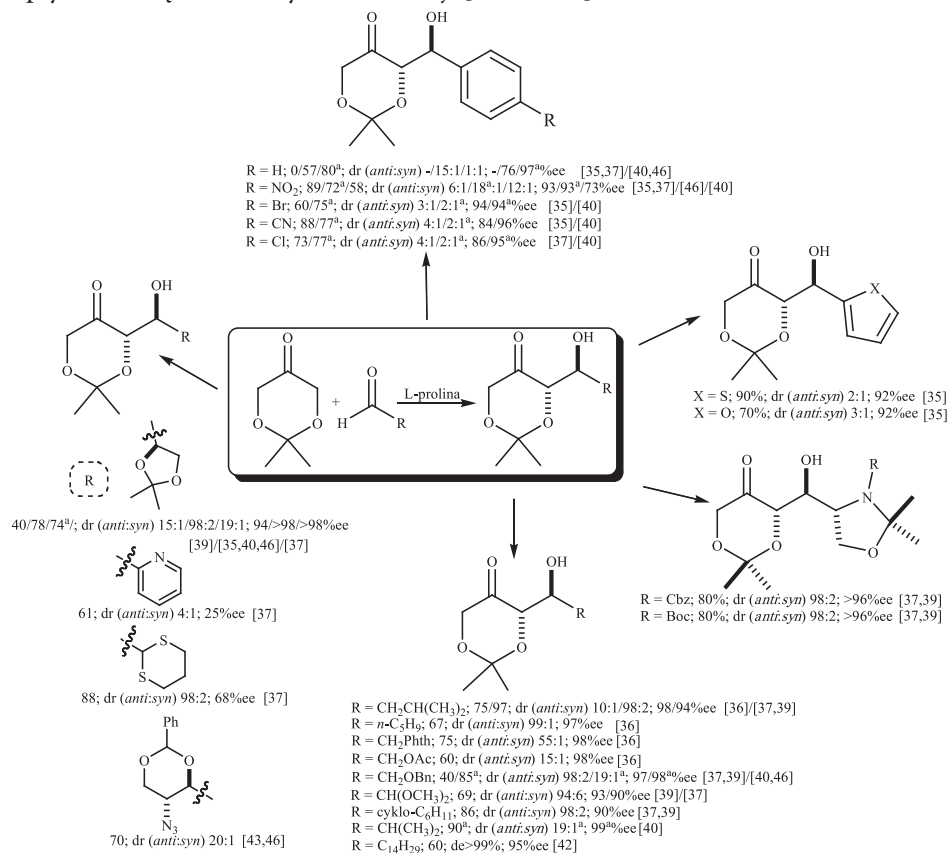
Tabela 4. Kondensacja pochodnych α -oksoacetonu z aldehydami katalizowana L-proliną.
 Table 4. L-proline-catalyzed aldol addition of α -ketoacetone derivatives to various aldehydes



Numer	R	Wydajność (%)	1:2:3	ee 1/2 (%)
1	C ₆ H ₅	90	75:20:5	40/41
2	<i>p</i> -CH ₃ C ₆ H ₄	82	83:15:2	56:45
3	<i>p</i> -CH ₃ OC ₆ H ₄	84	62:32:6	28:41
4	<i>m</i> -CH ₃ OC ₆ H ₄	74	67:27:6	65:65
5	<i>o</i> -CH ₃ OC ₆ H ₄	80	60:30:10	62:72
6	<i>p</i> -ClC ₆ H ₄	77	53:40:7	72:48
7	<i>p</i> -NO ₂ C ₆ H ₄	86	90:7:3	90:15
8		68	80:15:5	84:75
9		60	80:10:10	95:95
10		40	0:0:100	<10
11		54	12:8:18	95
12		83	20:10:70	43

Inną pochodną acetonu stosowaną jako donor w reakcji kondensacji aldolowej katalizowanej L-proliną był dihydroksyaceton (DHA). W organizmie żywym dihydroksyaceton w postaci estrów kwasu fosforowego(V) pełni rolę substratu w syntezie węglowodanów [33].

W reakcji DHA z aldehydami uzyskano produkty kondensacji z bardzo dobrą wydajnością. Enancjo- i diastereoselektywność nie była jednak zadowalająca [34]. W poszukiwaniu innych sposobów na skuteczną aldolizację zmodyfikowano DHA poprzez zablokowanie grup hydroksylowych. W reakcji cyklicznego acetalu 1,3-dihydroksyacetonu (2,2-dimetylo-1,3-dioksan-5-on) z aldehydami otrzymano z wysoką czystością optyczną szereg związków polihydroksylowych na przykład pochodne węglowodanów (pochodne D-rybozy, L-liksozy, L-rybulozy L-tagatozy), azacukrów i fitosfingozyn (Schemat 5). Uzyskano, podobnie jak dla hydroksyacetonu, w przewodzie stereoizomery o konfiguracji *anti* [35–45]. Najlepsze wyniki otrzymano stosując alifatyczne α -podstawione aldehydy, podczas gdy reakcja z aromatycznymi aldehydami, z wyjątkiem 4-nitrobenzaldehydu, przebiega z niewielką selektywnością. Dodatek niewielkiej ilość wody do mieszaniny reakcyjnej miał wpływ na zwiększenie szybkości reakcji [40, 46–49].



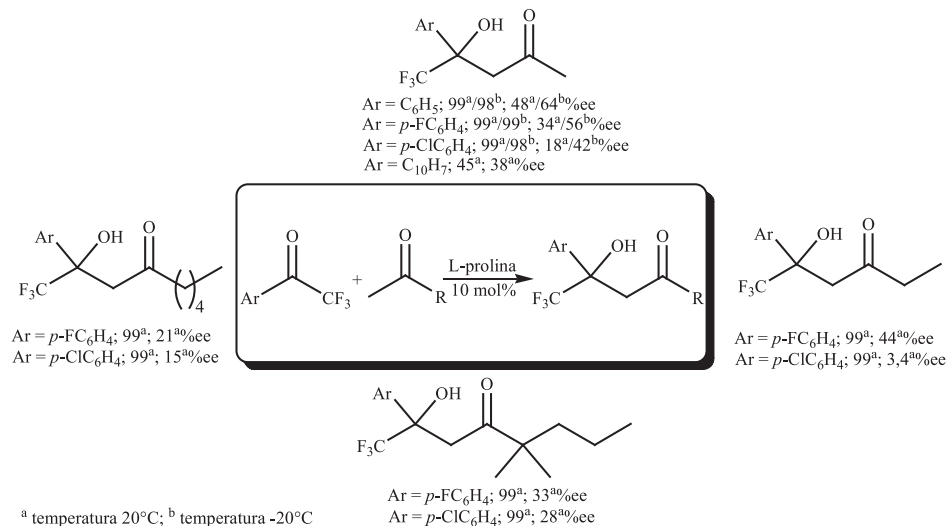
^az dodatkiem wody

Schemat 5. Asymetryczna kondensacja 2,2-dimetylo-1,3-dioksan-5-onu z aldehydami w obecności L-proliny
Scheme 5. L-proline-catalyzed asymmetric aldol reaction of 2,2-dimethyl-1,3-dioxane-5-one with aldehydes

1.1.2. Donor–keton – akceptor–keton

Nieenolizujące ketony, które nie posiadają protonów w pozycji α mogą pełnić w reakcji kondensacji aldolowej rolę akceptora. Ketony–akceptory z reguły posiadają podstawniki wyciągające elektrony, które zwiększają charakter elektrofilowy karbonylowego atomu węgla.

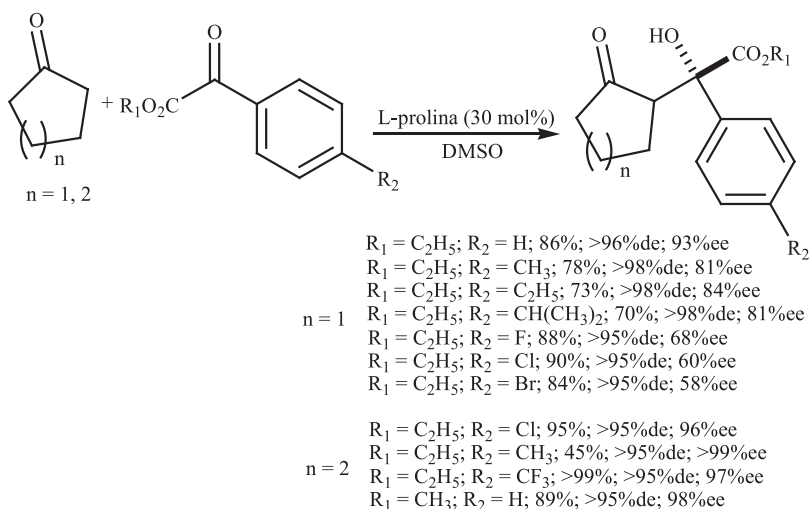
Na przykład pochodne α,α,α -trifluoroacetofenonu w reakcji z enolizującymi alifatycznymi ketonami pełnią funkcje akceptora i w wyniku reakcji otrzymuje się fluoroaldole, alkohole trzeciorzędowe (Schemat 6) [50].



Schemat 6. Asymetryczna kondensacja aromatycznych fluoroketonów z metyloketonami katalizowana L-proliną

Scheme 6. L-proline catalyzed asymmetric aldol reaction between methyl ketones and aryl-fluoroketones

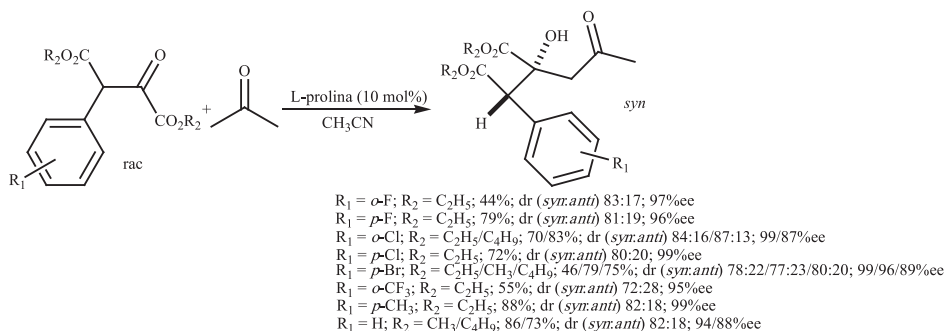
Krzyżowej kondensacji aldolowej katalizowanej proliną ulegają również związki 1,2-karbonylowe na przykład α -ketoestry [51–52]. Grupa estrowa jako podstawnik elektronoakceptorowy zwiększa elektrofilowość ketonów, α -ketoestry w bezpośredniej reakcji z innymi ketonami pełnią funkcję akceptorów. Na przykład w obecności proliny kondensuje się estry kwasu aryloglikolowego z alifatycznymi ketonami cyklicznymi (Schemat 7). Reakcja przebiega całkowicie diastereoselektywnie (dr > 95%) z dobrą enancjoselektywnością, uzyskuje się *anti*-izomer o konfiguracji absolutnej S.



Schemat 7. Asymetryczna bezpośrednia kondensacja aldolowa cyklopentanu lub cykloheksanu z pochodnymi kwasu fenyloglikolowego w obecności L-proliny

Scheme 7. L-proline-catalyzed direct asymmetric aldol reaction of cyclopentanone or cyclohexanone with phenylglyoxylate derivatives

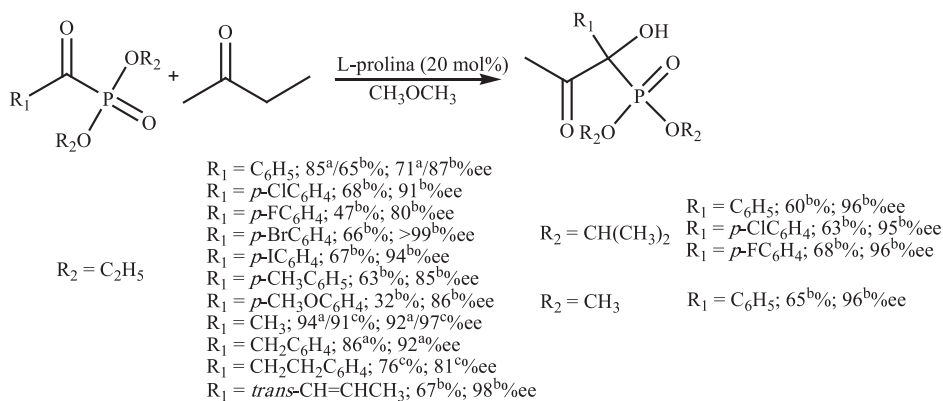
W wyniku dynamicznego rozdzielania kinetycznego mieszaniny racemicznej estrów kwasu bursztynowego z nadmiarem acetonu można uzyskać preferencyjnie jeden z diastereoizomerów o konfiguracji *syn* (Schemat 8) [53].



Schemat 8. Dynamiczny rozdział kinetyczny estrów kwasu 2-okso-3-arylbursztynowego w reakcji aldolizacji katalizowanej L-proliną

Scheme 8. Dynamic kinetic resolution of 2-oxo-3-aryl-succinates by L-proline-catalyzed aldolization

Kondensacja nieenolizujących ketonów α -ketofosfonianów z podstawnikami alkilowymi lub aryłowymi prowadzi do uzyskania α -hydroksyfosfonianów z nowym centrum stereogenicznym (Schemat 9) [54]. Otrzymane w wyniku kondensacji aldolowej katalizowanej L-proliną pochodne kwasu α -hydroksyfosfonowego należą do grupy związków biologicznie czynnych, inhibitorów enzymów, działających między innymi przeciwnowotworowo i przeciwwirusowo.



^a temperatura pokojowa; ^b temperatura -30°C; ^c temperatura 0°C

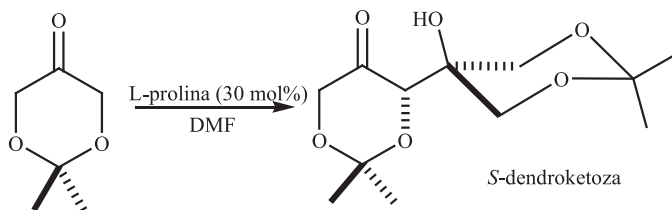
Schemat 9. Enancjoselektywna synteza estrów kwasu α -hydroksyfosfonowego

Scheme 9. Enantioselective synthesis of α -hydroxy phosphonates

W reakcji kondensacji aldolowej uzyskano również α -hydroksyfosfoniany z dwoma centrami asymetrii: czteropodstawiony atom węgla i atom fosforu. L-prolina umożliwia rozdział mieszanin racemicznych α -ketofosfonianów i formy uwodnionej formylofosfonianów przez kondensację z innymi ketonami. W wyniku reakcji otrzymuje się z dobrą wydajnością diastereoizomery różniące się konfiguracją na atomie fosforu [55].

Opisane wcześniej fenyllooksoaceton i fenyltioaceton w reakcji z aldehydami pełnią funkcję donorów. Mogą też pełnić rolę akceptora wówczas, jeśli do układu reakcyjnego doda się aceton. W rezultacie powstają aldole z dobrą wydajnością, jednak z niezbyt wysoką czystością optyczną [30].

Przykładem reakcji, w której keton pełni rolę zarówno akceptora, jaki i donora jest reakcja samokondensacji 2,2-dimetylo-1,3-dioksan-5-onu (Schemat 10). Uzyskano z 57% wydajnością pochodną (*S*)-dendroketozy o wysokiej 95% czystości optycznej [37].



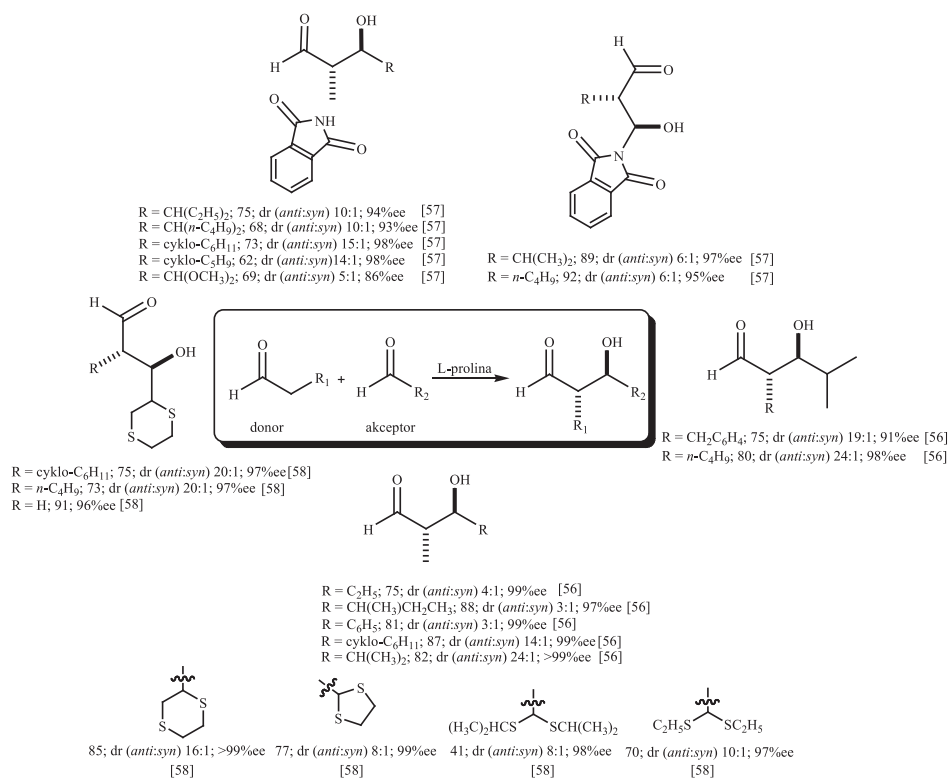
Schemat 10. Samokondensacja 2,2-dimetylo-1,3-dioksan-5-on katalizowana L-proliną

Scheme 10. L-proline-catalyzed asymmetric self-aldolization of 2,2-dimethyl-dioxan-5-one

1.2. DONOR-ALDEHYD

1.2.1. Donor aldehyd – akceptor aldehyd

Ruchliwość protonu w pozycji α niepodstawionych aldehydów umożliwia przeprowadzenie homo i heteroaldolizację, w której aldehyd pełni rolę zarówno akceptora jak i (lub) donora. Zdecydowanie łatwiej przeprowadza się homoaldolizację. Przykładem tego typu reakcji jest homodimeryzacja aldehydu propionowego, w której aldehyd pełni podwójną rolę: akceptora i donora. W dimetyloformamidzie uzyskano produkt kondensacji z 91% wydajnością i wysokim 99% nadmiarem enancjomerycznym.



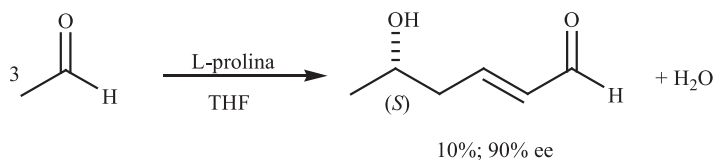
Schemat 11. Enancjoselektywna bezpośrednia krzyżowa kondensacja aldolowa aldehydów

Scheme 11. Enantioselective direct aldehyde cross-aldol reaction

Otrzymanie krzyżowych aldoli w reakcji dwóch różnych cząsteczek aldehydów jest wyzwaniem, ponieważ obok oczekiwanego produktu powstaje homoaldol. W celu zminimalizowania konkurencyjnej reakcji samokondensacji należy do aldehydu, pełniącego funkcję akceptora, powoli dodawać aldehyd donora. W reakcji dwóch różnych aldehydów stosując powyższą metodę skutecznie przeprowadzono

krzyżową kondensację aldolową uzyskując w obecności L-proliny liniowe aldole z dobrą wydajnością oraz enancjo- i diastereo selektywnością (Schemat 11) [56–59].

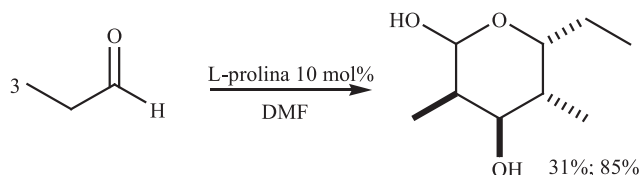
Innym przykładem tego typu reakcji jest trimeryzacja acetaldehydu w obecności L-proliny, w której Barbas i współpracownicy [60] otrzymali z 10% wydajnością 5-hydroksy-2(*E*)-heksenal z 90% ee (Schemat 12).



Schemat 12. Samokondensacja acetaldehydu katalizowana L-proliną

Scheme 12. L-proline-catalyzed self-aldol reaction of acetaldehyde

Samokondensacja trzech cząsteczek aldehydu na przykład propionowego w DMF umożliwia otrzymanie δ -laktolu (Schemat 13).

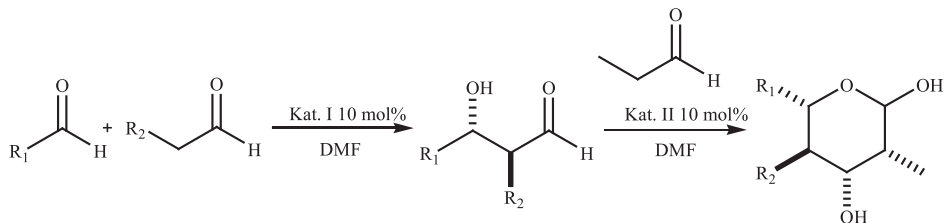


Schemat 13. Samokondensacja propanalu katalizowanej L-proliną

Scheme 13. L-proline-catalyzed self-aldolization reaction of propionaldehyde

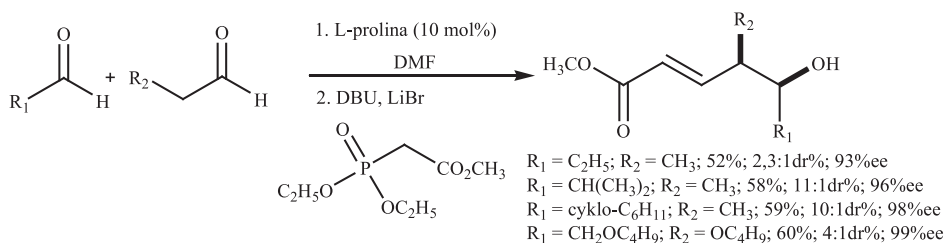
Serię triketydów, krzyżowych aldoli, uzyskuje się w reakcji trzech cząsteczek aldehydów poprzez dodanie do aldehydu-akceptora, aldehydu-donora (Tab. 5) [61]. Uzyskane δ -laktole utlenia się do δ -laktonów, z których można zsyntetyzować związki biologicznie czynne – heksozy. Na przykład w wyniku powyższych reakcji otrzymuje się 2,4,6-tri-*O*-benzyloalozę z 28% wydajnością w postaci pojedynczego diastereoizomeru z 99% ee [62, 63].

Tabela 5. Bezpośrednia dwu etapowa enancjoselektywna synteza heksoz katalizowana prolina
 Table 5. Two-step direct proline-catalyzed enantioselective synthesis of hexoses



Numer	R ₁	R ₂	Kat. I	Kat. II	Wydajność (%)	ee (%)	Lit.
1	C ₂ H ₅	CH ₃	L-Pro	D-Pro	29	99	[62]
2	CH(CH ₃) ₂	CH ₃	L-Pro	D-Pro/L-Pro	42/32	>99	[62]/[61]
3	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	CH ₃	L-Pro	D-Pro	24	>99	[62]/[61]
4	cyklo-C ₆ H ₁₁	CH ₃	L-Pro	D-Pro	41	>99	[62]
5	<i>n</i> -C ₄ H ₉ OCH ₂	OC ₄ H ₉	L-Pro	D-Pro	39	>99	[62]

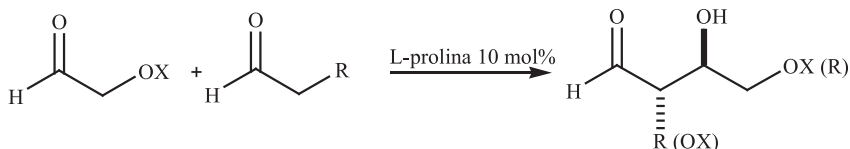
Poliketydy i syntony węglowodanów syntetyzuje się na przykład w tandemowej reakcji: krzyżowa kondensacja/reakcja Hornera-Wittiga-Emmons (HWE) (Schemat 14). L-prolina zapewnia wysoką czystość optyczną (93–98% ee) otrzymanych α,β -nienasyconych δ -hydroksyestrów [64].



Schemat 14. Krzyżowa kondensacja/reakcja HWE
 Scheme 14. Tandem cross-aldol/HWE reactions

Kondensacji aldolowej ulegają również pochodne hydroksyaldehydów. Szereg związków polihydroksylowych otrzymanych w wyniku kondensacji α -oksoaldehydów z zabezpieczoną grupą hydroksylową w reakcji z alifatycznymi aldehydami, może stanowić budulec w syntezie węglowodanów (Tab. 6). Pochodne glikoaldehydów w zależności od użytego alifatycznego aldehydu pełnią funkcję donora lub akceptora. Reakcja przebiega enancjoselektywnie (94–99% ee), otrzymano w przewadze diastereoizomer o konfiguracji *anti* [58, 63, 65]. Czystość optyczna otrzymanych prekursorów cukrów jest związana z obecnością L-proliny. Prawdopodobnie to właśnie aminokwasy mogły pełnić istotną rolę w ewolucji homochiralności świata, poprzez katalizowanie enancjoselektywnej syntezy węglowodanów [66, 67].

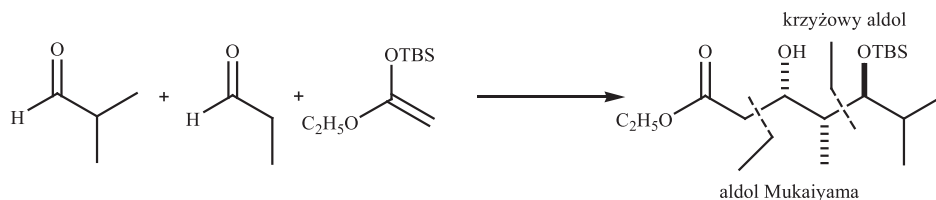
Tabela 6. Bezpośrednia kondensacja α -oksoaldehydów z różnymi aldehydami
 Table 6. Direct aldol reaction of α -oxoaldehydes with various aldehydes



Numer	R	OX	Wydajność (%)	dr (%) <i>anti:syn</i>	ee (%)	Lit.
1	CH ₃ (d)	OTIPS (a)	75	4:1	99	[65]
2	CH ₃ (d)	OTBDPS (a)	84	5:1	99	[65]
3	CH(CH ₃) ₂ (d)	OTIPS (a)	54	4:1	99	[65]
4	CH(CH ₃) ₂ (d)	OTBDPS (a)	64	4:1	94	[65]
5	(CH ₃) ₂ (a)	OTIPS (d)	43	8:1	99	[65]
6	(CH ₃) ₂ (a)	OC4H9 (d)	33	7:1	96	[65]
7		OTBDMS (d)	52	13:1	70	[58]
8		H (d)	88	>20:1	>99	[58]

TIPS – triizopropylsilan; TBDMS - *t*-butylodimetylosilil; TBDPS – *t*-butylodifenylosilil; d – donor; a – akceptor

Reakcja kondensacji międzycząsteczkowej umożliwia również uzyskanie innego naturalnie występującego związku – prelaktonu B (Schemat 15) [68]. Związek ten otrzymuje się w reakcji dwóch cząsteczek aldehydów z enolowym eterem sililowym. Reakcja ta przebiega dwuetapowo: kondensacja aldolowa i tak zwana kondensacja aldolowa typu Mukaiyama.



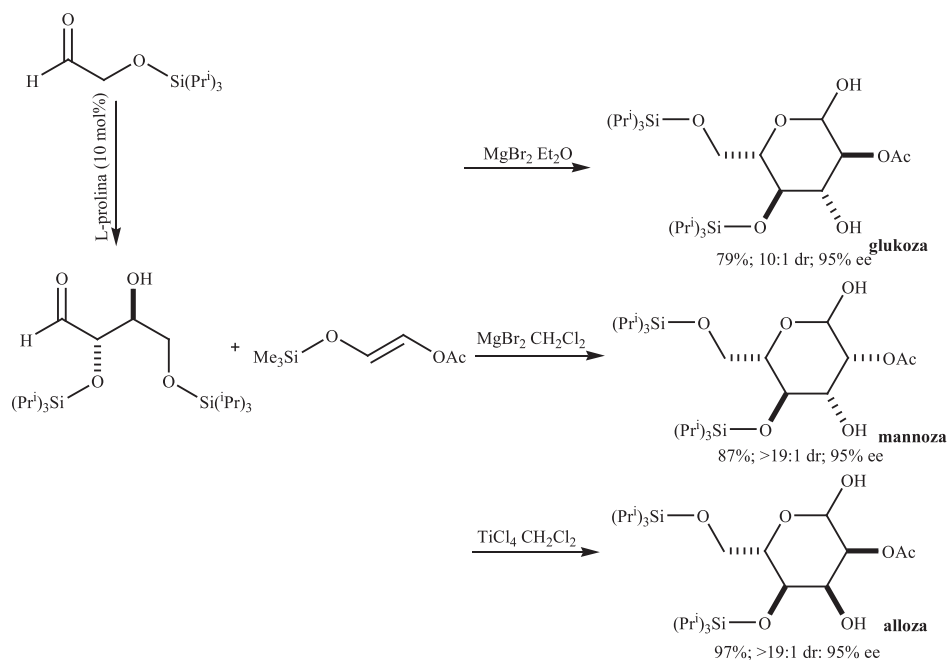
Schemat 15. Synteza prelaktonu B

Scheme 15. Synthesis of prelactone B

W pierwszym etapie jeśli zastosuje się α -oksoaldehydy z zabezpieczoną grupą wodorotlenową i w etapie następnym skondensuje z enolowym eterem sililowym otrzymuje się sześciocłonowe pochodne węglowodanów [63, 69]. Na przykład

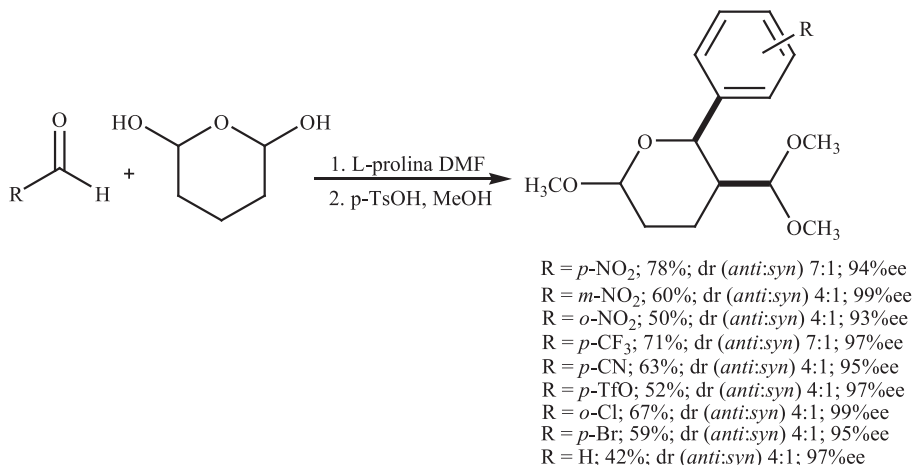
w wyniku reakcji otrzymanego w pierwszym etapie dimeru z α -triizopropylsilyloksyacetaldehydu z α -oksyenolosilanem można uzyskać w zależności od zastosowanych warunków reakcji pochodne glukozy, mannozy lub allozy (Schemat 16). Obecność L-proliny zapewnia wysoką enancjoselektywność i diastereoselektywność kondensacji aldolowej i ostatecznie uzyskuje się węglowodany z wysoką czystością optyczną (około 95% ee).

W dwuetapowej reakcji typu domino: kondensacja adolowa/wewnątrzcząsteczkowa reakcja tworzenia acetalu syntezowano pochodne tetrahydropirano z trzema asymetrycznymi atomami węgla (Schemat 17). Substratem reakcji jest tetrahydro-2*H*-pirano-2,6-diol, który w roztworze wodnym jest w równowadze z aldehydem glutarowym. Kondensacja tetrahydro-2*H*-pirano-2,6-diol z aldehydami aromatycznymi prowadzi do aldoli, które ostatecznie ulegają przekształceniu w pochodne tetrahydropirano. L-prolina zapewniła wysoką enancjoselektywność etapu pierwszego [70].



Schemat 16. Asymetryczna synteza pochodnych glukozy, mannozy, allozy katalizowana L-proliną

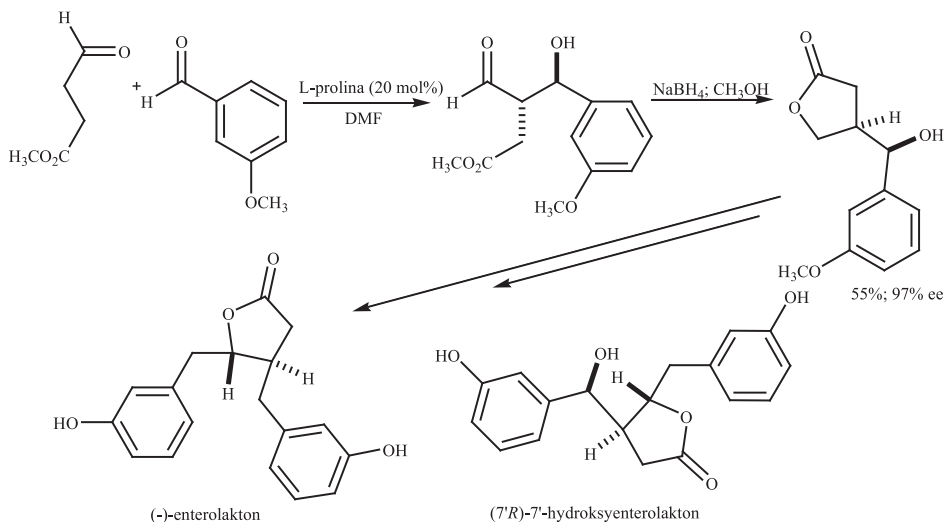
Scheme 16. L-proline-catalyzed asymmetric synthesis of mannose, glucose, and allose derivatives



Schemat 17. Synteza tetrahydropiranów

Scheme 17. Synthesis of tetrahydropyrans

Przeprowadzenie kondensacji aldolowej katalizowanej L-proliną umożliwiło otrzymanie (–)-enterolaktonu i (7*R*)-7'-hydroksyenterolaktonu wykazujących między innymi aktywność przeciwnowotworową (Schemat 18). W pierwszym etapie w wyniku krzyżowej kondensacji aldolowej w reakcji 4-oksomaślanu metylu z aldehydami uzyskano aldole, które zredukowano *in situ* NaBH₄ do 3-(α-hydroksyalkilo)-4-butyrolaktonów [71].


 Schemat 18. Asymetryczna synteza (–)-enterolaktonu i (7*R*)-7'-hydroksyenterolaktonu

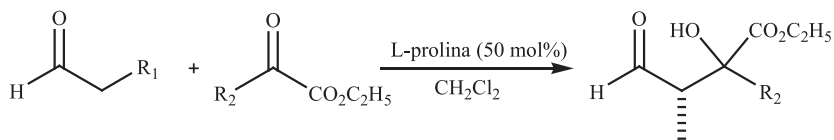
 Scheme 18. Asymmetric synthesis of (–)-enterolactone and (7*R*)-7'-hydroxyenterolactone

1.2.2. Donor aldehyd – akceptor keton

Aldehydy mogą pełnić również rolę donora w reakcji z ketonami. Na przykład w asymetrycznej reakcji katalizowanej prolina α -nierozgałęzione aldehydy ulegają kondensacji z nieenolizującymi ketonami: ketomalonianem dietylu lub trifluoropirogronianem etylu. W reakcji ketomalonianu dietylu z aldehydami alifatycznymi otrzymano aldole z wysokimi nadmiarami enancjomerycznymi (Tab. 7) [72].

Tabela 7. Reakcja różnych aldehydów z aktywowanymi związkami karbonyłowymi w obecności L-proliny jako katalizatora

Table 7. Reaction of different aldehydes with activated carbonyl compounds in the presence of L-proline as the catalyst



Numer	R ₁	R ₂	Wydajność (%)	ee (%)
1	CH ₃	CO ₂ C ₂ H ₅	90	90
2	C ₂ H ₅	CO ₂ C ₂ H ₅	91	85
3	CH(CH ₃) ₂	CO ₂ C ₂ H ₅	88	85
4	CH ₂ CH=CH ₂	CO ₂ C ₂ H ₅	94	88
5	(CH ₂) ₅ CH ₃	CO ₂ C ₂ H ₅	91	84
6	C ₆ H ₅	CO ₂ C ₂ H ₅	97	0
7	H	CF ₃	81	0
8	CH ₃	CF ₃	98	67/81 (dr 3/2)

UWAGI KOŃCOWE

Prolina należy do grupy uniwersalnych małowcząsteczkowych organokatalizatorów. W reakcji kondensacji aldolowej działa jak mikroaldolaza typu I. Aktywuje donor poprzez utworzenie enaminyowego stanu przejściowego. Atak z określonej strony enaminyowego intermediatu umożliwia otrzymanie aldoli o wysokiej czystości enancjo- i diastereoizomerycznej. Czyste enancjomeryczne produkty kondensacji stanowią ważną grupę związków przejściowych w syntezie związków biologicznie czynnych.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] S.K. Panday, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2011, **22**, 1817.
- [2] S.G. Zlotin, A.S. Kucherenko, I.P. Beletskaya, *Russian Chemical Reviews*, 2009, **78**, 737.
- [3] B. List, *Tetrahedron*, 2002, **58**, 5573.
- [4] B. List, *Acc. Chem. Res.*, 2004, **4**, 548.
- [5] P.I. Dalko, *Enantioselective Organocatalysis: Reactions and Experimental Procedures*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KgaA Weinheim, 2007.
- [6] M.J. Gaunt, C.C.C., Johansson, A. McNally, N.T. Vo, *Drug Discovery Today*, 2007, **12**, 8.
- [7] M. Movassaghi, E.N. Jacobsen, *Science*, 2002, **298**, 1904.
- [8] M. Stodulski, J. Młynarski, *Wiad. Chem.*, 2010, **64**, 5.
- [9] H. Gröger, J. Wilken, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2001, **40**, 529.
- [10] C. Palomo, M. Oiarbide, J.M. García, *Chem. Eur. J.*, 2002, **8**, 37.
- [11] J. Seayad, B. List, *Org. Biomol. Chem.*, 2005, **3**, 719.
- [12] B. Alcaide, P. Almendros, *Eur. J. Org. Chem.*, 2002, 1595.
- [13] S. Bahmanyar, K.N. Houk, H.J. Martin, B. List, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**, 2475.
- [14] S. Bahmanyar, K.N. Houk, *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, **123**, 12911.
- [15] B. List, L. Hoang, H.J. Martin, *PNAS*, 2004, **101**, 5839.
- [16] B. List, *Chem. Commun.*, 2006, 819.
- [17] D.A. Bock, Ch.W. Lehmann, B. List, *PNAS*, 2010, **107**, 20636.
- [18] W. Notz, F. Tanaka, C.F. Barbas III, *Acc. Chem. Res.*, 2004, **37**, 580.
- [19] B. List, R.A. Lerner, C.F. Barbas III, *J. Am. Chem. Soc.* 2000, **122**, 2395.
- [20] B. List, P. Pojarliev, Ch. Castello, *Organic Letter*, 2001, **4**, 573.
- [21] K. Sakthivel, W. Notz, T. Bui, C.F.F. Barbas III, *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, **123**, 5260.
- [22] J. Casas, H. Sundén, A. Córdova, *Tetrahedron Letters*, 2004, **45**, 6117.
- [23] Q. Pan, B. Zou, Y. Wang, D. Ma, *Org. Lett.*, 2004, **6**, 1009.
- [24] I. Kumar, C.V. Rode, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2006, **17**, 763.
- [25] I. Kumar, C.V. Rode, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2007, **18**, 1975.
- [26] I. Izquierdo, M.T. Plaza, R. Robles, A.J. Mota, F. Franco, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2001, **12**, 2749.
- [27] K. Funabiki, H. Yamamoto, H. Nagaya, M. Matsui, *Tetrahedron Letters*, 2006, **47**, 5507.
- [28] B. Alcaide, P. Almendros, A. Luna, M.R. Torres, *J. Org. Chem.*, 2006, **71**, 4818.
- [29] D. Enders, T. Gasperi, *Chem. Commun.*, 2007, 88.
- [30] A.M. Bernard, A. Frongia, P.P. Piras, F. Secci, M. Spiga, *Tetrahedron Letters*, 2008, **49**, 3037.
- [31] W. Notz, B. List, *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, **122**, 7386.
- [32] H. Liu, L. Peng, T. Zhang, Y. Li, *New J. Chem.*, 2003, **27**, 1159.
- [33] D. Enders, M. Voith, A. Lenzen, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2005, **44**, 1304.
- [34] A. Córdova, W. Notz, C.F. Barbas III, *J. Org. Chem.*, 2002, **67**, 301.
- [35] J.T. Suri, S. Mitsumori, K. Albertshofer, F. Tanaka, C.F. Barbas III, *J. Org. Chem.*, 2006, **71**, 3822.
- [36] J.T. Suri, D.B. Ramachary, C.F. Barbas III, *Org. Lett.*, 2005, **7**, 1384.
- [37] Ch. Grondal, D. Enders, *Tetrahedron*, 2006, **62**, 329.
- [38] Ch. Grondal, D. Enders, *Adv. Synth. Catal.*, 2007, **349**, 694.
- [39] D. Enders, Ch. Grondal, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2005, **44**, 1210.
- [40] I. Ibrahim, W. Zou, Y. Xu, A. Córdova, *Adv. Synth. Catal.*, 2006, **348**, 211.
- [41] D. Enders, A.A. Narine, *Org. Chem.*, 2008, **73**, 7857.
- [42] D. Enders, J. Paleček, Ch. Grondal, *Chem. Commun.*, 2006, 655.
- [43] F. Calderón, E.G. Doyagüez, A. Fernández-Mayoralas, *J. Org. Chem.*, 2006, **71**, 6258.
- [44] F. Calderón, E.G. Doyagüez, P.H.-Y. Cheong, A. Fernández-Mayoralas, K.N. Houk, *J. Org. Chem.*, 2008, **73**, 7916.

- [45] J. Mlynarski, B. Gut, *Chem. Soc. Rev.*, 2012, **41**, 587.
- [46] I. Ibrahim, A. Córdova, *Tetrahedron Letters*, 2005, **46**, 3363.
- [47] N. Zotova, A. Franzke, A. Armstrong, D.G. Blackmond, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 15100.
- [48] M. Raja, V.K. Singh, *Chem. Commun.*, 2009, 6687.
- [49] M. Gruttadauria, F. Giacalone, R. Notoa, *Adv. Synth. Catal.* 2009, **351**, 33.
- [50] L.-H. Qiu, Z.-X. Shen, Ch.-Q. Shi, Y.-H. Liu, Y.-W. Zhang, *Chin. J. Chem.*, 2005, **23**, 584.
- [51] O. Tokuda, T. Kano, W.-G. Gao, T. Ikemoto, K. Maruoka, *Org. Lett.*, 2005, **7**, 5103.
- [52] J. Xiang, B. Li, *Chin. J. Chem.*, 2010, **28**, 617.
- [53] Y. Wang, Z. Shen, B. Li, Y. Zhang, Y. Zhang, *Chem. Commun.*, 2007, 1284.
- [54] S. Samanta, C.-G. Zhao, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 7442.
- [55] S. Samanta, S. Perera, C.-G. Zhao, *J. Org. Chem.*, 2010, **75**, 1101.
- [56] A.B. Northrup, D.W.C. MacMillan, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, **124**, 6798.
- [57] R. Thayumanavan, F. Tanaka, C.F. Barbas III, *Org. Lett.*, 2004, **6**, 3541.
- [58] R.I. Storer, D.W.C. Macmillan, *Tetrahedron*, 2004, **60**, 7705.
- [59] N. Mase, F. Tanaka, C.F. Barbas III, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2004, **43**, 2420.
- [60] A. Córdova, W. Notz, C.F. Barbas III, *J. Org. Chem.*, 2002, **67**, 301.
- [61] N.S. Chowdari, D.B. Ramachary, A. Córdova, C.F. Barbas, III, *Tetrahedron Letters*, 2002, **43**, 9591.
- [62] J. Casas, M. Engqvist, I. Ibrahim, B. Kaynak, A. Córdova, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2005, **44**, 1343.
- [63] U. Kazmaier, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2005, **44**, 2186.
- [64] G.-L. Zhao, W.-W. Liao, A. Córdova, *Tetrahedron Letters*, 2006, **47**, 4929.
- [65] A.B. Northrup, I.K. Mangion, F. Hettche, D.W.C. MacMillan, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2004, **43**, 2152.
- [66] A. Córdova, M. Engqvist, I. Ibrahim, J. Casas, H. Sundén, *E. Chem. Commun*, 2005, 2047.
- [67] A. Córdova, I. Ibrahim, J. Casas, H. Sundén, M. Engqvist, E. Reyes, *Chem. Eur. J.*, 2005, **11**, 4772.
- [68] P.M. Pihko, A. Erkkilä, *Tetrahedron Lett.*, 2003, **44**, 7607.
- [69] A.B. Northrup, D.W.C. MacMillan, *Science*, 2004, **305**, 1752.
- [70] D. Hazeldar, H. Ishikawa, D. Hashizume, H. Koshino, Y. Hayashi, *Org. Lett.*, 2008, **10**, 1445.
- [71] S. Hajra, A.K. Giri, S. Hazra, *J. Org. Chem.*, 2008, **73**, 3935.
- [72] A. Bøgevig, N. Kumaragurubaran, K.A. Jørgensen, *Chem. Commun.*, 2002, 620.

Praca wpłynęła do Redakcji 24 kwietnia 2013

AKTYWNOŚĆ BIOLOGICZNA POCHODNYCH THIAZOLO[4,5-*d*]PIRYMIDYNY

BIOLOGICAL ACTIVITY OF THIAZOLO[4,5-*d*]PYRIMIDINE DERIVATIVES

Lilianna Becan

*Katedra i Zakład Technologii Leków
Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu
ul. Borowska 211a, 50-556 Wrocław
e-mai: lilianna.becan@umed.wroc.pl*

Abstract

Wykaz stosowanych skrótów

Wprowadzenie

1. Aktywność biologiczna

- 1.1. Aktywność przeciwbakteryjna i przeciwgrzybicza
- 1.2. Aktywność przeciwwirusowa
- 1.3. Działanie antyparkinsonowskie
- 1.4. Działanie przeciwłękowe i przeciwdepresyjne
- 1.5. Działanie przeciwbólowe i przeciwzapalne
- 1.6. Aktywność antyproliferacyjna
- 1.7. Pestycydy

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane



Dr n. farm. Lilianna Becan ukończyła Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej Akademii Medycznej we Wrocławiu (obecnie Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich). Obecnie jest adiunktem w Katedrze i Zakładzie Technologii Leków tej uczelni. Stopień doktora nauk farmaceutycznych uzyskała w 1998 r. Zajmuje się syntezą nowych pochodnych tiazolo[4,5-*d*]pirymidyny oraz izoksazolo[4,5-*d*]pirymidyny o potencjalnej aktywności biologicznej.

ABSTRACT

Thiazolo[4,5-*d*]pyrimidine is one of the six structural isomers of the bicyclic ring system containing thiazole moiety fused with the pyrimidine. There are six structural isomers depending on the position of the nitrogen atoms. The isomer [4,5-*d*] does not contain the bridge-head nitrogen and can be considered as 7-thio analogue of the natural purine bases such as guanine and adenine. Due to the great of their biological potential the newly synthesized compounds are evaluated for various pharmacological activities. This review presents numerous thiazolo[4,5-*d*]pyrimidine derivatives reported for their interesting biological activity including antibacterial [2, 3, 5, 7, 8, 10, 19], antifungal [2–6, 9, 10], antiviral [11–13], analgesic [18, 19], antidepressant [17] and anticancer properties [23–26]. Some urea and thiourea derivatives exhibited significant antiparkinsonian activity [14–16]. Tumor necrosis factor (TNF) promotes an inflammatory response, which in turn causes many of the clinical problems associated with autoimmune disorders. Ethyl 4-(2-amino-5,7-dioxo-3,4,5,7-tetrahydro-thiazolo[4,5-*d*]pyrimidin-6(2*H*)-yl)butanoate derivatives **29** (Fig. 24) as a TNF α inhibitors have a potential use in the treatment of diseases such as refractory asthma, psoriasis, rheumatoid arthritis, irritable bowel syndrome, and other [21]. Blockade of the CXCR2 receptor by thiazolo[4,5-*d*]pyrimidine-2(3*H*)-ones also represents an attractive strategy for treatment of inflammatory diseases [20]. Recently there have been developed CX₃CR1 receptor antagonists for the treatment of multiple sclerosis [22]. Isatoribine, 5-amino-3- β -D-ribofuranosyl-3*H*-thiazolo[4,5-*d*]pyrimidin-2-one (**20**) (Fig. 15) is a small molecule toll-like receptor 7 (TLR7) agonist and an activator of innate immunity. Its orally bioavailable analogue ANA 975 (Fig. 16) has been reported for probable use in treating disease states associated with abnormal cell growth, such as cancer and has anti HCV activity [13]. Thiazolo[4,5-*d*]pyrimidines inhibit the growth of the weeds which implies that they have a potential as herbicides [27].

Keywords: thiazolo[4,5-*d*]pyrimidine derivatives, synthesis, biological activity

Słowa kluczowe: pochodne tiazolo[4,5-*d*]pirymidyny, synteza, aktywność biologiczna

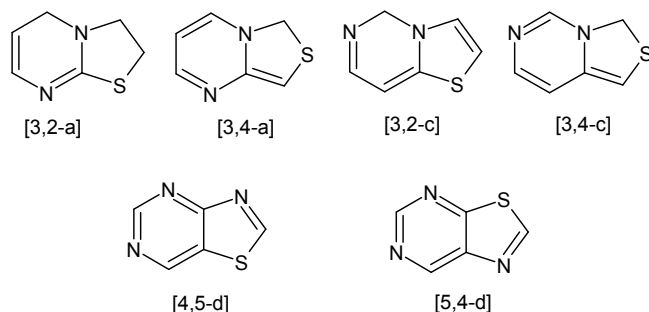
WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

DNA	– kwas deoksyrybonukleinowy (ang. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
RNA	– kwas rybonukleinowy (ang. <i>ribonucleic acid</i>)
MIC	– minimalne stężenie hamujące (ang. <i>minimal inhibitory concentration</i>)
IZ	– strefa zahamowania wzrostu (ang. <i>inhibition zone</i>)
IC ₅₀	– stężenie przy którym proliferacja komórek zostaje zahamowana w 50% (ang. <i>inhibitory concentration</i>)
CRH	– kortykoliberyna, hormon uwalniający kortykotropinę (ang. <i>corticotropin-releasing hormone</i>)
CRH-1	– receptor kortykoliberyny 1 (ang. <i>corticotrophin-releasing hormone receptor 1</i>)
TLR-7	– receptory, które uczestniczą w indukcji odpowiedzi immunologicznej, receptory TLR są przezbłonowymi glikoproteidami (ang. <i>Toll-like receptor</i>)
MDA	– dialdehyd malonowy, marker stresu oksydacyjnego (ang. <i>malondialdehyde</i>)
GSH	– glutation, tripeptyd o właściwościach przeciwutleniających (ang. <i>glutathione</i>)
GSH-Px	– peroksydaza glutationowa, enzym chroniący komórki przed utlenianiem (ang. <i>glutathione peroxidase</i>)
SOD	– dysmutaza nadtlenkowa, metaloproteina, enzym katalizujących dysmutację anionorodnika nadtlenkowego do tlenu oraz nadtlenku wodoru. (ang. <i>SuperOxide Dismutase</i>)
HEK 293	– ludzkie embrionalne komórki nerkowe 293, łatwe w hodowli i transfekcji (ang. <i>Human Embryonic Kidney 293 cells</i>)
ED ₅₀	– dawka efektywna, powoduje dany efekt u 50% osobników (ang. <i>effective dose</i>)
NLPZ	– niesteroidowe leki przeciwzapalne (ang. <i>Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs</i>)
IL-8	– interleukina 8, polipeptyd z rodziny chemokin (ang. <i>intrleukin-8</i>)
GRO α	– czynnik stymulujący wzrost czerniaka (ang. <i>growth regulated oncogene-alpha</i>)
CXCR2	– receptor interleukiny 8, beta (ang. <i>interleukin 8 receptor, beta</i>)
CX ₃ CR1	– receptor fraktaliny (ang. <i>fractaline receptor</i>)

TNF α	– czynnik martwicy nowotworów, glikoproteina, cytokina związana z procesem zapalnym (ang. <i>Tumor Necrosis Factor</i>)
NCI	– Narodowy Instytut Raka (ang. <i>National Cancer Institute</i>)
EGFR	– receptor naskórkowego czynnika wzrostu (ang. <i>epidermal growth factor receptor</i>)

WPROWADZENIE

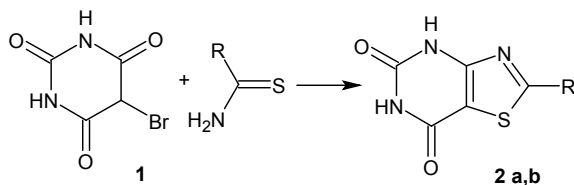
Układ tiazolopirymidyny składa się z dwóch pierścieni heterocyklicznych, sześciocząłowej pirymidyny sprzężonej z pięciocząłowym tiazolem. Istnieje sześć izomerów strukturalnych tego układu, cztery z nich posiadają mostkowy atom azotu: tiazolo[3,2-*a*]pirymidyna, tiazolo[3,4-*a*]pirymidyna, tiazolo[3,2-*c*]pirymidyna i tiazolo[3,4-*c*]pirymidyna. Dwa kolejne izomery: tiazolo[4,5-*d*]pirymidyna oraz tiazolo[5,4-*d*]pirymidyna nie posiadają mostkowego azotu i mogą być uważane za odpowiednio 7 i 9-tio analogi puryn.



Rysunek 1

Figure 1

W niniejszej pracy zostanie przedstawiona aktywność biologiczna pochodnych tiazolo[4,5-*d*]pirymidyny. Izomer ten jest przedmiotem badań od 70 lat. Pierwszą syntezę pochodnych tiazolo[4,5-*d*]pirymidyny przeprowadzili w 1943 r. Erlenmeyer i Furger [1]. W reakcji kwasu 5-bromobarbiturowego (**1**) oraz tioformamidu lub tioacetamidu, otrzymali tiazolo[4,5-*d*]pirymidyno-5,7(4*H*,6*H*)-dion (**2a**) i jego 2-metylową pochodną **2b**.

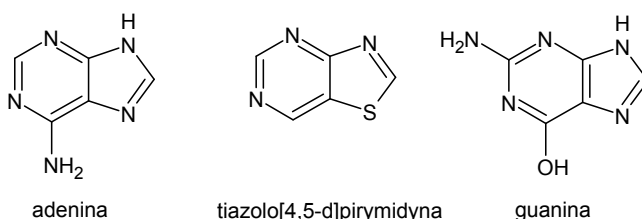


Schemat 1

Scheme 1

1. AKTYWNOŚĆ BIOLOGICZNA

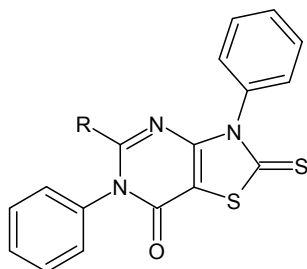
Pochodne tiazolo[4,5-*d*]pirymidyny nie zostały dotychczas wprowadzone do lecznictwa, lecz z przeglądu rezultatów badań dostępnych w piśmiennictwie naukowym wynika, że wiele z nich wykazuje różnorodną aktywność biologiczną. Związki te mogą być uważane za 7-tio analogi strukturalne naturalnych zasad purynowych, adeniny i guaniny. Atom azotu w pozycji 7 imidazo[4,5-*d*]pirymidyny (puryny) został w nich zastąpiony atomem siarki. Podobieństwo budowy pochodnych tiazolo[4,5-*d*]pirymidyny do fizjologicznych puryn powoduje, że mogą one wpływać na przebieg procesu syntezy DNA i RNA. Działają poprzez wiązanie się z wysokim powinowactwem z różnymi białkami docelowymi, receptorami i enzymami. Modyfikacje struktury naturalnych puryn są uznaną metodą syntezy związków biologicznie aktywnych, w tym leków przeciwnowotworowych, immunosupresyjnych czy przeciwwirusowych funkcjonujących w lecznictwie od wielu lat.



Rysunek 2
Figure 2

1.1. AKTYWNOŚĆ PRZECIWBAKTERYJNA I PRZECIWGRZYBICZA

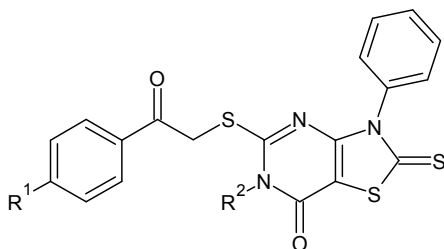
Wiele tiazolo[4,5-*d*]pirymidyn wykazuje aktywność przeciwbakteryjną i przeciwgrzybiczą. Badania mikrobiologiczne najczęściej polegają na pomiarze strefy zahamowania wzrostu (IZ) i minimalnego stężenia hamującego wzrost patogenu (MIC). Prowadzone są w porównaniu do wzorców, którymi są stosowane w lecznictwie antybiotyki i środki przeciwgrzybicze. Nie ma korelacji między strukturą chemiczną substancji wzorcowych a budową badanego związku. Działanie hamujące wzrost bakterii *Staphylococcus aureus* (MIC = 20–30 µg/ml) zostało zaobserwowane u 3,6-difenylo-2-tioksotiazolo[4,5-*d*]pirymidyn-7(6*H*)-onów **3a-c**, podstawionych w pozycji 5 grupą azydową, trifenylofosforanyldenową i aminową. Związki te oraz 5-chloro pochodna **3d** były umiarkowanie aktywne wobec *Bacillus subtilis* (MIC = 50–80 µg/ml). Dodatkowo zaobserwowano dobrą aktywność związków **3a** i **3d** przeciwko *Escherichia coli* (MIC=30–40 µg/ml) [2].



- 3** a) $R = N_3$
 b) $R = N=P(C_6H_5)_3$
 c) $R = NH_2$
 d) $R = Cl$

Rysunek 3
 Figure 3

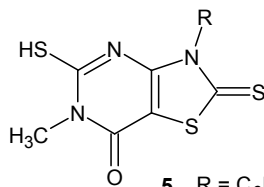
Aktywnością bakteriostatyczną wobec *Pseudomonas aeruginosa* równą wzorcowej tobramycynie wykazały się związki **4a** i **4d** ($MIC = 8 \mu g/ml$). *Escherichia coli* i *Enterococcus faecalis* były wrażliwe na działanie związku **4b** ($MIC = 1 \mu g/ml$). Natomiast pochodna z rodnikiem 4-bromofenylowym **4c** była dwukrotnie bardziej aktywna od tobramycyny wobec *Staphylococcus aureus* ($MIC = 2 \mu g/ml$), na drożdżaki *Candida krusei* i *parapsilosis* działała silniej od wzorcowego flukonazolu [3].



- 4** a) $R^1 = CH_3, R^2 = C_2H_5$
 b) $R^1 = CH_3, R^2 = C_6H_5$
 c) $R^1 = Br, R^2 = C_6H_5$
 d) $R^1 = Br, R^2 = CH_3$

Rysunek 4
 Figure 4

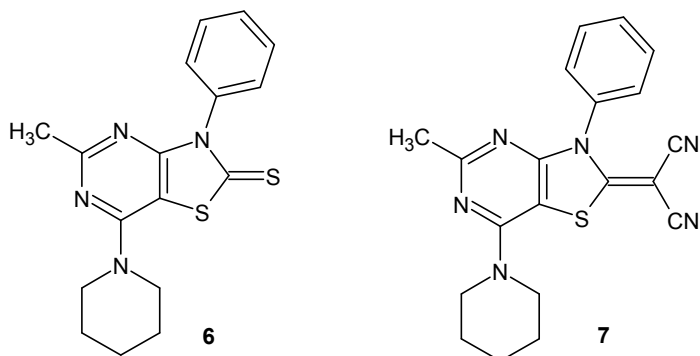
Dobłą aktywność wobec wymienionych drożdżaków posiadają również 5-tio pochodne **5**, działają przeciwgrzybiczo porównywalnie z flukonazolem [4].



- 5** $R = C_6H_5, CH_3$

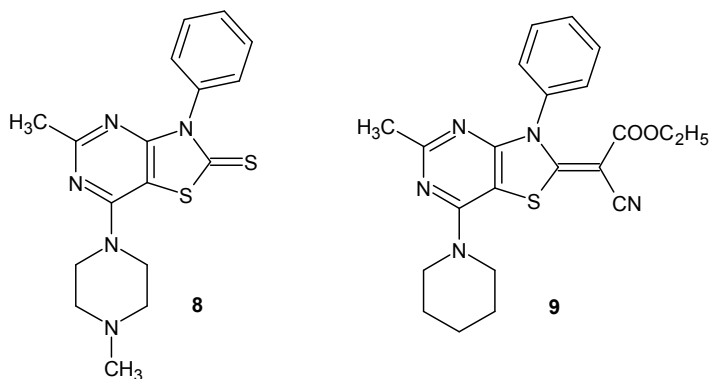
Rysunek 5
 Figure 5

Aktywność przeciwbakteryjna pochodnych 7-amino-3-metylotiazolo[4,5-*d*]-pirymidyny była określana w stosunku do ampicyliny. Najaktywniejsze pochodne **6** i **7** posiadały 50% aktywności wzorca wobec Gram(-) bakterii *Escherichia coli*.



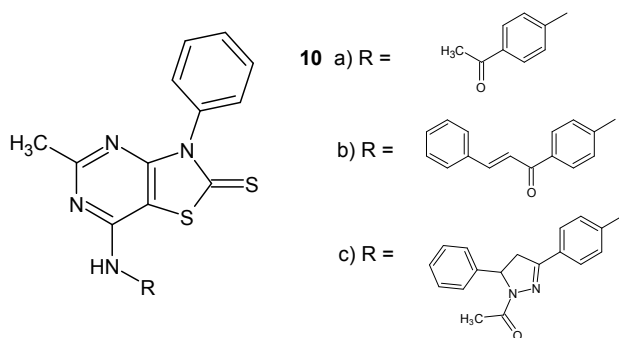
Rysunek 6
Figure 6

Związki o zbliżonej budowie 8 i 9 w stosunku do *Pseudomonas aeruginosa* wykazały się tylko 30% aktywnością w porównaniu do wzorca.



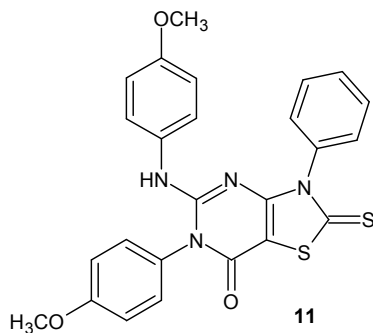
Rysunek 7
Figure 7

Pochodne 6 oraz 10a-c miały też niewielkie działanie przeciwgrzybicze wobec *Candida albicans* (MIC = 31,25 µg/ml), w porównaniu do klotrimazolu (MIC = 5 µg/ml) [5].



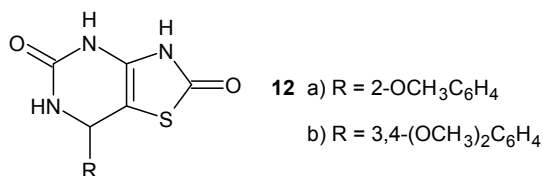
Rysunek 8
Figure 8

Bardzo aktywna wobec szczepów *Candida albicans*, *Aspergillus Niger*, *Aspergillus clavatus* była seria pochodnych z różnymi podstawnikami w 3,4 i 5 pozycji układu tiazolopirymidyny. Wykazano wartości MIC w zakresie 0,2–25,6 $\mu\text{g/ml}$, były one porównywalne z wzorcami, którymi były flukonazol (MIC = 0,5–16 $\mu\text{g/ml}$) i nystatyna (MIC = 7–8 $\mu\text{g/ml}$). Warunkiem szerokiego spectrum działania tych związków były rodniki fenyłowe z grupami elektrodonorowymi. Największą aktywność wykazał 3-fenylo-5-metoksyfenyloamino-6-metoksyfenylo-2-tioksotiazolo[4,5-*d*]-pirymidyn-7(6*H*)-on (**11**) [6].



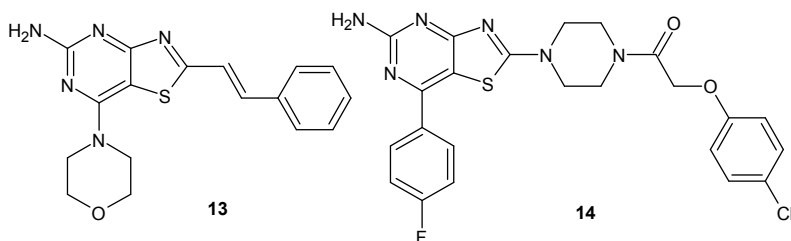
Rysunek 9
Figure 9

7-Arylo-6,7-dihydrotiazolo[4,5-*d*]pirymidyno-2,5(3*H*,4*H*)-diony **12a** i **12b** wykazały aktywność przeciwbakteryjną wobec *Staphylococcus aureus* (**12a** MIC = 72 $\mu\text{g/ml}$, **12b** MIC = 102 $\mu\text{g/ml}$). W badaniach jako wzorec została zastosowana sól sodowa cefuroksymu o MIC = 1,2 $\mu\text{g/ml}$ [7].



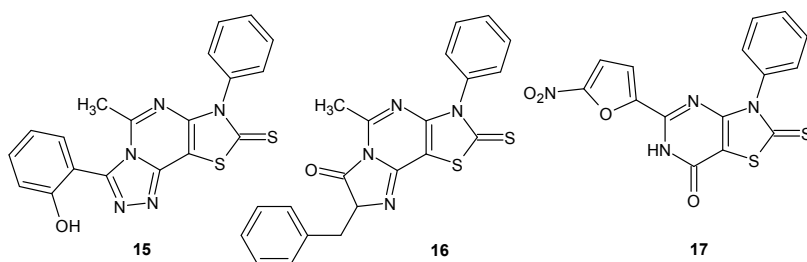
Rysunek 10
Figure 10

Główną drogą transportu białek bakteryjnych przez błony cytoplazmatyczne jest system sekrecji Sec. Zasadniczym komponentem tego systemu jest białko SecA, podstawowe u wszystkich bakterii a nieobecne u ludzi, które w związku z tym może być celem leków przeciwbakteryjnych. Dotychczas w piśmiennictwie opisano niewiele struktur heterocyklicznych będących inhibitorami SecA, wśród nich tiazolo[4,5-*d*]pirymidyny. Badania prowadzono wobec *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli*, patogenów odpowiedzialnych za zakażenia szpitalne i opornych na antybiotyki. Wśród wielu testowanych pochodnych dwie najaktywniejsze **13** i **14** hamowały powyżej 50% aktywność enzymów bakteryjnych [8].



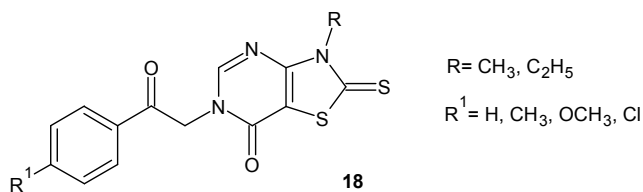
Rysunek 11
Figure 11

Aktywność nowych związków sprawdza się również pomiarem strefy zahamowania wzrostu IZ. 7-Fenyl-3-(2-hydroksyfenyl)-5-metylotiazolo-[5,4-*e*][1,2,4]triazolo[4,3-*c*]pirymidyno-8(7*H*)tion (**15**), 8-benzylo-3-fenyl-5-metylo-2-tiokso-3,8-dihydroimidazo[1,2-*c*]tiazolo[5,4-*e*]pirymidyn-7(2*H*)on (**16**) oraz 3-fenyl-5(5-nitrofurano-2-yl)-2-tioksotiazolo[4,5-*d*]pirymidyn-7(6*H*)-on (**17**) były bardzo aktywne wobec *Candida albicans* (IZ > 15 mm) i *Bacillus subtilis* (IZ = 11–15 mm) [9].



Rysunek 12
Figure 12

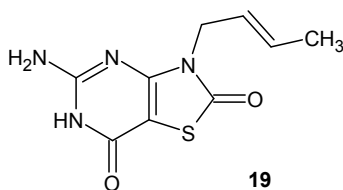
Szereg 3-alkilo-6-(2-arylo-2-okso-1-etylo)-2-tioksotiazolo[4,5-*d*]pirymidyn-2(3*H*)-onów **18** było testowanych na aktywność przeciwbakteryjną (wobec *Escherichia coli* i *Staphylococcus aureus*) oraz przeciwgrzybiczą (wobec *Candida albicans*). Rezultaty były porównywalne z działaniem substancji standardowych, chloramfenikolu i ketokonazolu, nie znaleziono jednak żadnych zależności między strukturą a biologiczną aktywnością nowych pochodnych [10].



Rysunek 13
Figure 13

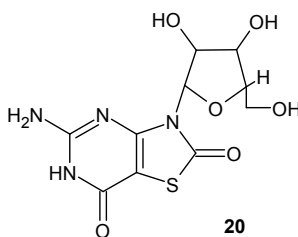
1.2. AKTYWNOŚĆ PRZECIWWIRUSOWA

Obecnie stosowane leki przeciwwirusowe mają strukturę analogów purynowych (acyklowir, gancyklowir, entekawir). Szereg 3-alkilo-5-aminotiazolo[4,5-*d*]pirymidyno-2,7(3*H*,6*H*)-dionów zostało przetestowanych w kierunku aktywności przeciw wirusom cytomegalii oraz opryszczki. Zbadano również ich toksyczność w stosunku do komórek szpiku kostnego. Najbardziej aktywny związek **19** okazał się inhibitorem wirusa opryszczki (IC₅₀ < 4,4 μM). Hamował także namnażanie się siedmiu szczepów wirusa cytomegalii w stężeniu 10-krotnie niższym niż referencyjny gancyklowir oraz był od niego mniej toksyczny [11].



Rysunek 14
Figure 14

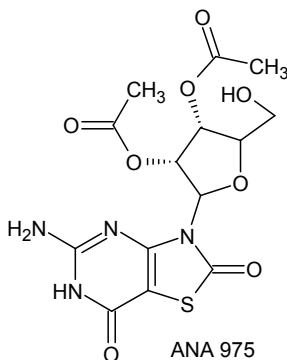
Podobny w swej strukturze analog nukleozydu 5-amino-3- β -*D*-rybofuranozylotiazolo[4,5-*d*]pirymidyno-2,7(3*H*,6*H*)-dion (**20**), w testach *in vivo* wykazał bardzo silną aktywność przeciw wirusowi *Semliki Forest*. Po jego podaniu przeżyło 92% zarażonych myszy, w grupie kontrolnej żadna.



Rysunek 15
Figure 15

Związek **20** wykazał większą immunoreaktywność niż nukleozyd macierzysty. Aktywność przeciwwirusowa obserwowana jedynie w warunkach *in vivo* sugerowała, że za działanie odpowiada interferon, którego produkcja znacząco wzrastała pod wpływem podania testowanego związku [12].

W wyniku kolejnych badań wykazano, że pochodna **20**, znana obecnie pod nazwą Isatoribine jest agonistą receptora TLR-7, indukującego syntezę endogennego interferonu i aktywującego układ odpornościowy. W testach klinicznych wykazano skuteczność Isatoribiny w zapaleniu wątroby wywołanym przez wirusa HCV. Otrzymano szereg analogów Isatoribiny, m.in. związek ANA 975, który po podaniu doustnym ulega w organizmie przekształceniu do substancji czynnej w wyniku hydrolizy enzymatycznej [13].



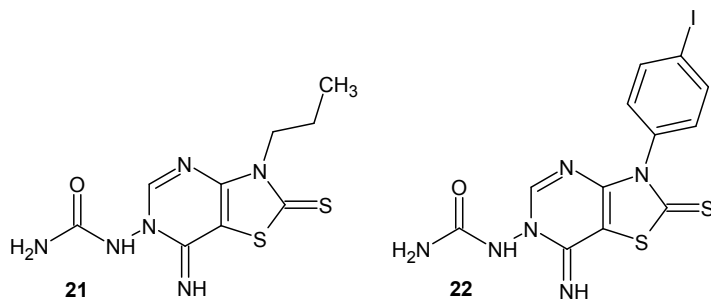
Rysunek 16

Figure 16

W badaniach przeprowadzonych na komórkach Vero mierzono aktywność przeciw wirusowi opryszczki (*Herpes simplex*), w porównaniu do leku przeciwwirusowego Aphidicolinu. Przedstawione wcześniej na Rysunku 11 pochodne **15** i **17** posiadały 50–60% aktywności przeciwwirusowej leku referencyjnego [9].

1.3. DZIAŁANIE ANTY-PARKINSONOWSKIE

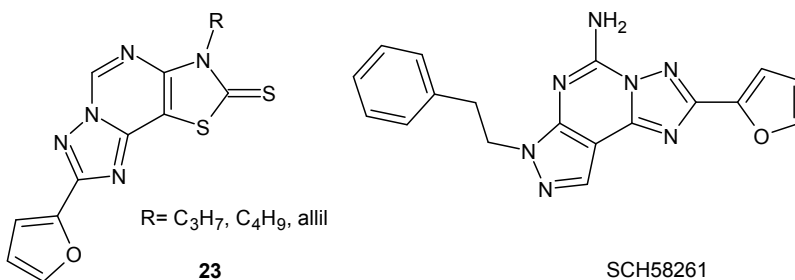
Obecnie duże znaczenie w terapii choroby Parkinsona przypisuje się antagonistom receptorów adenozynowych A_{2A} . Zlokalizowany w prążkowie podtyp A_{2A} receptora adenozynowego bierze udział w regulacji aktywności motorycznej, modulując aktywację receptora dopaminowego D_2 . Receptory adenozynowe A_{2A} i dopaminowe D_2 działają przeciwstawnie w obrębie neuronów prążkowiec. Blokada receptorów A_{2A} na szlaku nigrostriatalnym i zahamowanie interakcji adenozyny z tym receptorem może okazać się korzystne w leczeniu choroby Parkinsona. Na modelach zwierzęcych zaobserwowano też efekt neuroprotektynny. Powinowactwo do receptorów adenozynowych *in vitro* posiadają pochodne 7-imino-2-tiokso-3,7-dihydro-2H-tiazolo[4,5-d]pirymidyny z ugrupowaniem mocznika w pozycji 6. Optimum aktywności wykazał związek **21** z podstawnikiem trójwęglowym w pozycji 3. Zarówno dłuższe jak i krótsze łańcuchy węglowe wpływają na zmniejszenie aktywności, korzystnie działa wprowadzenie rodnika aromatycznego, zwłaszcza w przypadku obecności halogenu w pozycji para pierścienia (związek **22**) [14].



Rysunek 17

Figure 17

Trójpięścieniowe pochodne tiazolo[4,5-*d*]pirymidyny **23** silnie blokowały receptor A_{2A} i odwracały indukowaną haloperidolem katelepsję i akinezję u myszy. Badanie *in vitro* wykazało ich powinowactwo do tego receptora porównywalne ze standardowym antagonistą SCH58261 [15].

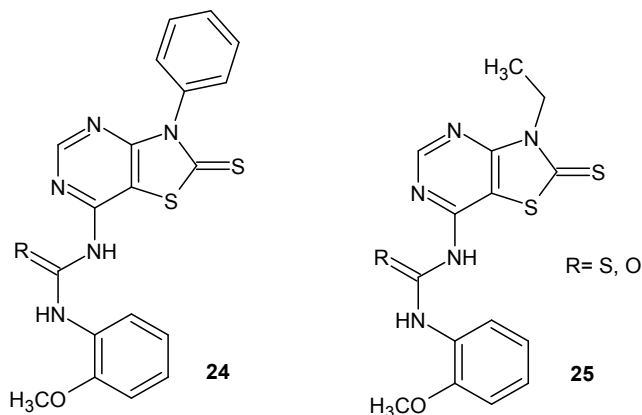


Rysunek 18

Figure 18

Nowe pochodne tiazolo[4,5-*d*]pirymidyny **24** i **25** z podstawnikami 2-metoksyfenylenoureidowym i 2-metoksyfenylenotioureidowym w pozycji 7 były testowane *in vivo* na myszach, u których wywołano katelepsję przez podanie haloperidolu. Jednocześnie badano poziom stresu oksydacyjnego przez oznaczenie stężeń dialdehydu malonowego MDA i glutationu GSH oraz zmierzenie aktywności dysmutazy nadtlenkowej SOD i peroksydazy glutationu GSH-Px. W grupie poddanej działaniu haloperidolu zaobserwowano peroksydację lipidów, obniżony poziom GSH i spadek aktywności enzymów SOD i GSH-Px. Podanie badanych ureidów i tioureidów 30 minut przed haloperidolem znacząco zmniejszyło stres oksydacyjny i przywróciło aktywność enzymów oraz wartości GSH i MDA niemal do poziomów próby kontrolnej. W teście indukowanej haloperidolem katelepsji związki **24** i **25** okazały się skuteczniejsze od wzorcowej lewodopy. Obecność grupy metoksylowej w pozycji orto pierścienia aromatycznego zwiększa aktywność antykateleptyczną i właściwości antyoksydacyjne pochodnych. Dobre właściwości lipofilowe związ-

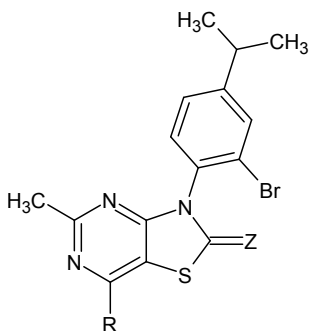
ków warunkują penetrację do ośrodkowego układu nerwowego i dają możliwość zastosowania ich w leczeniu schorzeń neurodegeneracyjnych [16].



Rysunek 19
Figure 19

1.4. DZIAŁANIE PRZECIWLĘKOWE I PRZECIWDOPRESYJNE

Wśród pochodnych omawianego układu znajdują się antagoniści receptorów dla kortykoliberyny (CRH) o potencjalnym zastosowaniu jako leki przeciwłękowe i przeciwdepresyjne. Ten 41-aminokwasowy peptyd, syntetyzowany w podwzgórze, odgrywa znaczącą rolę w regulacji odpowiedzi na stres u ssaków a także może być wydzielany w nadmiarze (hipersekrecja) u pacjentów z depresją. Wysokie powinowactwo *in vitro* do receptorów kortykoliberyny CRH-R1 posiadają niektóre pochodne 2-tiokso i 2-okso tiazolo[4,5-*d*]pirymidyny **26** z ugrupowaniem aminowym w pozycji 7. Testy zostały przeprowadzone na komórkach linii HEK 293E, na których uprzednio transfekowano i poddano ekspresji ludzkie receptory CRH-1. Ze wstępnych badań między strukturą i aktywnością wynika, że niecykliczne podstawniki alkiloaminowe zwiększają powinowactwo do receptorów, szczególnie korzystne jest wprowadzenie łańcucha etylowego i *n*-propylowego. Najsilniejsze działanie wykazują związki podstawione ugrupowaniami dialkoksy [17].



Z= O, S

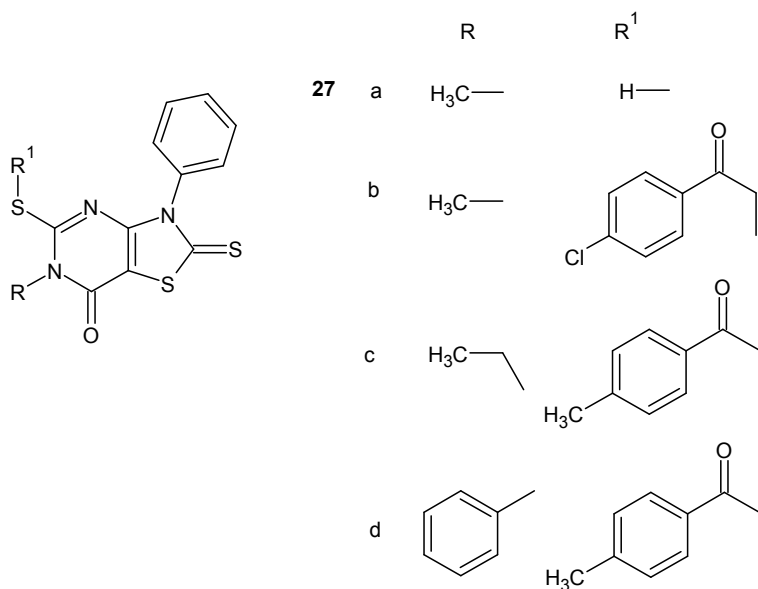
R= N(C₂H₅)₂, N(C₃H₇)CH₂-cyklo-C₃H₅,N(C₂H₅)C₄H₉, N(CH₃CH₂CHCH₃)₂,N(CH₂CH₂OCH₃)₂, morfolino**26**

Rysunek 20

Figure 20

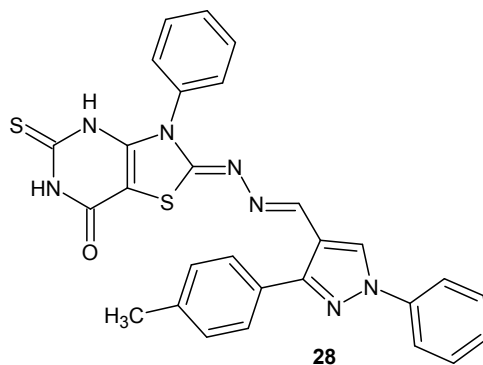
1.5. DZIAŁANIE PRZECIWBÓLOWE I PRZECIWZAPALNE

Większość niesteroidowych leków przeciwzapalnych wykazuje działanie gastrotoksyczne. Poszukiwane są nowe związki, które przy zachowaniu aktywności leczniczej byłyby pozbawione niepożądanego wpływu na układ pokarmowy. Wyniki badań biologicznych *in vivo* wykazują aktywność przeciwzapalną tiazolopirymidyn **27 b i c** porównywalną z fenylbutazonem (test hamowania obrzęku mysich łapek, wywołanego karageniną). Działanie przeciwbólne mierzono w teście „przeciągania się”, jako leku referencyjnego użyto kwasu acetylosalicylowego. Najaktywniejsze okazały się pochodne **27 a i d**. Cząsteczki o największej aktywności zostały przebadane na szczurach pod kątem wartości ED₅₀ (dawka efektywna, która powoduje efekt u 50% badanych osobników) i potencjału wrzodotwórczego. W badanej grupie zwierząt nie zaobserwowano zmian struktury śluzówki żołądka, w przeciwieństwie do grupy kontrolnej, której podawano fenylbutazon. Nowe pochodne tiazolopirymidyny nie działają ulcerogennie, przy aktywności porównywalnej z klasycznymi NLPZ [18].



Rysunek 21
Figure 21

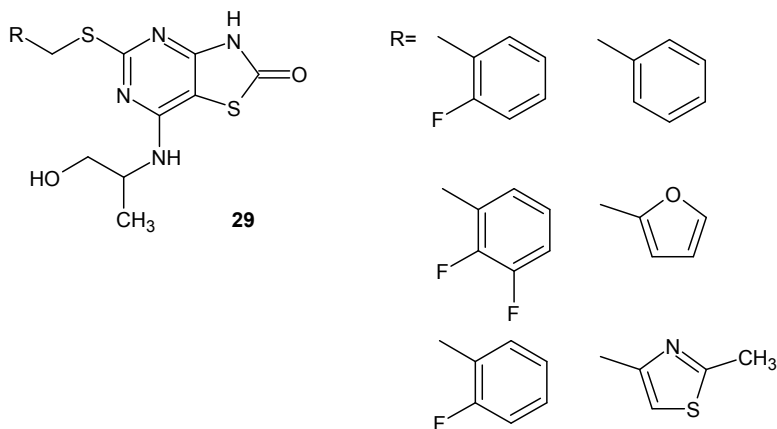
Związek **28** charakteryzuje się w warunkach *in vivo* jednoczesnym działaniem przeciwbakteryjnym i aktywnością przeciwzapalną porównywalną z ampicyliną i indometacyną, przy minimalnej ulcerogenności [19].



Rysunek 22
Figure 22

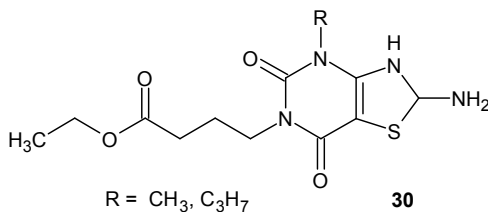
Chemokiny stanowią jedną z grup mediatorów stanu zapalnego, należą do nich m.in. interleukina 8 (IL-8) i onkogen α (GRO α), które poprzez receptor CXCR2 aktywują i rekrutują neutrofile do miejsc toczącego się stanu zapalnego. Podwyższony poziom IL-8 obserwuje się w przebiegu zapalenia stawów, astmy, wrzodziejącego zapalenia jelita grubego, łuszczycy i przewlekłej obturacyjnej choroby płuc.

Poszukiwanie antagonistów receptorów CXCR2 dla IL-8 wydaje się być atrakcyjną strategią postępowania w terapii procesów zapalnych. Seria silnych antagonistów receptora CXCR2, 5-tiobenzylu pochodne 7-(1-hydroksypropan-2-yl)otiazolo[4,5-*d*]pirymidyn-2(3*H*)-onu **29** cechuje się wysokim powinowactwem oraz dobrą biodostępnością biologiczną w badaniach na szczurach, przy podaniu doustnym. Aktywność tych pochodnych warunkują ugrupowanie 5-tiobenzylowe, optymalnie podstawione dwoma atomami fluoru oraz obecność aminoalkoholu w pozycji 7. Otrzymano również szereg pochodnych z grupą aminową w pozycji 2, które silnie blokowały receptor, niestety cechowały się słabą biodostępnością [20].



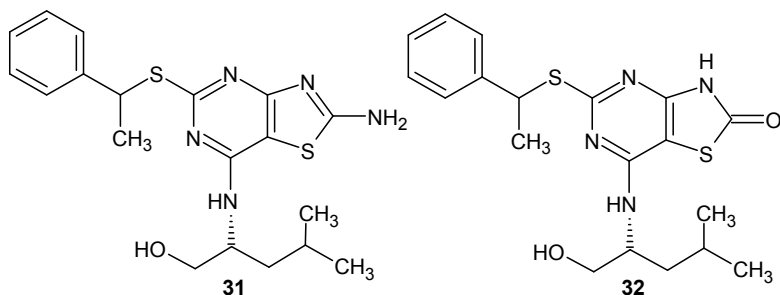
Rysunek 23
Figure 23

Czynnik martwicy nowotworów (TNF) promuje odpowiedź zapalną, która z kolei powoduje wiele problemów klinicznych związanych z chorobami autoimmunologicznymi. Pochodne estru etylowego kwasu 4-[2-amino-5,7-di-oksotiazolo[4,5-*d*]pirymidyn-6-yl]-masłowego **30** są inhibitorami uwalniania TNF α . Mogą być użyteczne w leczeniu tych chorób, w których nadmierne wytwarzanie cytokin prozapalnych odgrywa główną rolę takich jak reumatoidalne zapalenie stawów, stwardnienie rozsiane, astma, łuszczyca i zapalenie jelit [21].



Rysunek 24
Figure 24

Fraktalina, jedna z ok. 50 znanych chemokin, stanowi ważny czynnik w patogenezie chorób o podłożu zapalnym i autoimmunologicznym. Podwyższone stężenie fraktaliny stwierdzono w przebiegu m.in. stwardnienia rozsianego. 5-Tio podstawione 7-amino-5-tioiazolo[4,5-*d*]pirymidyny są selektywnymi antagonistami receptora fraktaliny CX₃CR1, pierwszymi które mogą być stosowane doustnie w leczeniu stwardnienia rozsianego. Z szeregu przebadanych związków pochodne z rodnikiem leucynolu w pozycji 7 oraz podstawnikiem α -metylobenzylovym w pozycji 5 **31** i **32** charakteryzowały się wysoką selektywnością i powinowactwem do receptora oraz dobrymi właściwościami fizykochemicznymi [22].



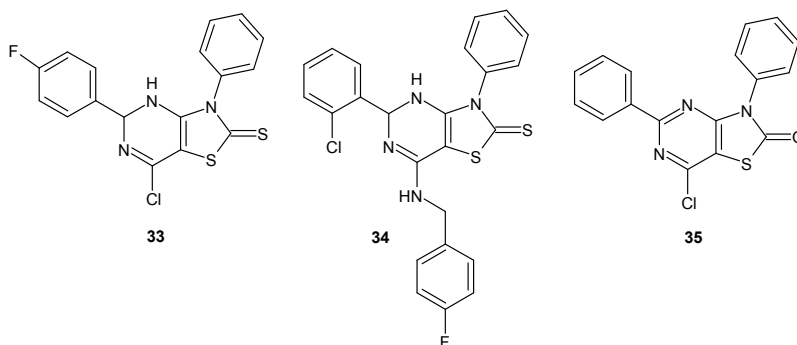
Rysunek 25
Figure 25

1.6. AKTYWNOŚĆ PRZECIWNOWOTWOROWA

W terapii nowotworów stosowane są m.in. leki będące analogami puryn i nukleozydów purynowych, należące do antymetabolitów m.in. merkaptopuryna, fludarybina, tioguanina, kladrybina. Aktywność cytostatyczna pochodnych izomeru 4,5-*d* tiazolopirymidyny może wynikać z ich podobieństwa strukturalnego do naturalnych zasad purynowych.

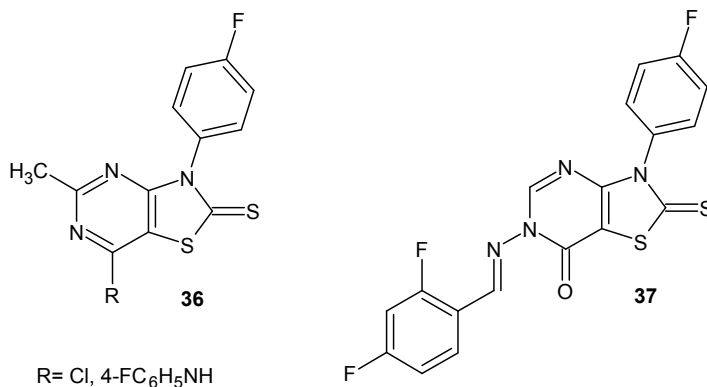
Badania screeningowe prowadzone są w warunkach *in vitro*. National Cancer Institute (NCI, Bethesda, USA) badane substancje poddaje wstępnym testom w dawce 10⁻⁵ mola, na 60 liniach ludzkich komórek nowotworowych wywodzących się z 9 paneli reprezentujących białaczkę, czerniaka, raka płuc, okrężnicy, piersi, jajnika, prostaty nerki i mózgu.

Większość pochodnych tiazolo[4,5-*d*]pirymidyny wykazujących nasiloną aktywność antyproliferacyjną posiada w swojej strukturze ugrupowania aromatyczne i podstawniki elektroujemne. Silnym działaniem wobec linii HOP-92 niedrobnokomórkowego raka płuc i IGROV-1 raka jajnika cechuje się pochodna **33**. Związek **34** jest bardzo aktywny wobec nowotworów ośrodkowego układu nerwowego [23]. 7-Chloro-3,5-difenylotiazolo[4,5-*d*]pirymidyn-2(3*H*)-on (**35**) najsilniej hamuje wzrost linii UO-31 raka nerki oraz NCI-H522 niedrobnokomórkowego raka płuc [24].



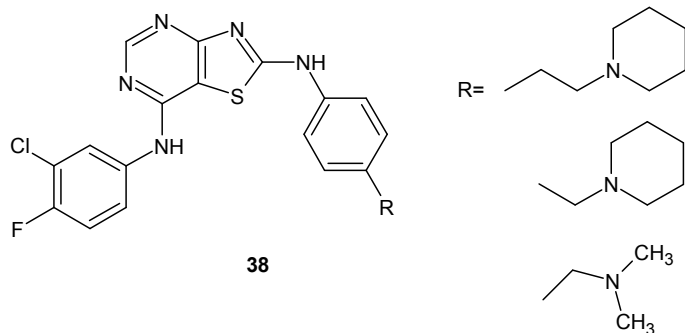
Rysunek 26
Figure 26

Znaczną aktywnością antyproliferacyjną w badaniach w NCI wykazały się również 3-(*p*-fluorofenylowe) pochodne **36** i **37** [25].



Rysunek 27
Figure 27

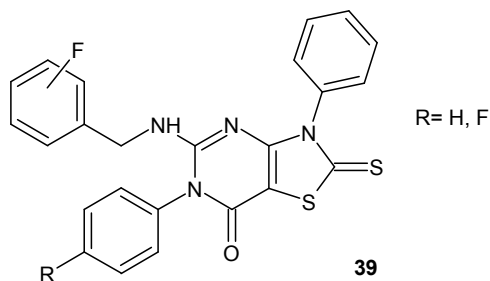
Substancje hamujące nadmierną aktywację receptora naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR) mogą znaleźć potencjalne zastosowanie jako leki przeciwnowotworowe. Należą do nich pochodne 2,7-diaminotiazolo[4,5-*d*]pirymidyny **38**, które w warunkach *in vitro* wykazują silne działanie antyproliferacyjne wobec ludzkiego gruczolakoraka jajnika linii SK-OV 3. Najlepsze efekty cytostatyczne mają miejsce, gdy w pozycji 7 znajdują się halogeny, w położeniu meta aniliny. Podstawniki przy pierścieniu w pozycji 2 nie mają wpływu na aktywność [26].



Rysunek 28
Figure 28

1.7. PESTYCYDY

Stosowane w agrochemii herbicydy, insektycydy i fungicydy często zawierają podstawniki fluorowane, które korzystnie wpływają na aktywność środków ochrony roślin. Szereg 5-arylo/alkiloamino-3-fenilo-6-arylo-2,3-dihydrotiazolo[4,5-*d*]pirymidyn-7(6*H*)-onów **39**, w dawce 100 mg/ml hamowało wzrost chwastnicy jednostronnej i rzepaku. Wyniki powyżej 95% osiągnęły związki z podstawnikiem zawierającym atom fluoru, w pozycji 5 tiazolopirymidyny, niezależnie od położenia tego atomu w pierścieniu aromatycznym [27].



Rysunek 29
Figure 29

PODSUMOWANIE

Obecnie jako substancje lecznicze zarejestrowane są dwa związki zawierające w swojej cząsteczce układ tiazolopirymidyny – ritanseryna i setoperon, antagoniści receptora serotoninowego 5-HT_{2A}. W obydwu przypadkach są to pochodne izomeru tiazolo[3,2-*a*]pirymidyny. Natomiast tiazolo[4,5-*d*]pirymidyny nie zostały dotychczas wprowadzone do lecznictwa. Trwają badania kliniczne 5-amino-3-β-*D*-

rybofuranozylotiazolo[4,5-*d*]pirymidyno-2,7(3*H*,6*H*)-dionu (**20**) i jego analogów [13]. Struktura ta jest przedmiotem badań od lat 90 ubiegłego wieku, w tym czasie modyfikowano ją w celu polepszenia rozpuszczalności, uzyskania biodostępności przy podaniu doustnym, zmniejszenia toksyczności. Obecnie zakończona jest I faza badań klinicznych na zdrowych ochotnikach oraz chorych na HCV, istnieje szansa na rejestrację pochodnej tiazolo[4,5-*d*]pirymidyny jako leku.

Opisane związki wykazują różnorodną aktywność biologiczną. Ich strukturalne podobieństwo do endogennych zasad purynowych, adeniny i guaniny może być jednym z czynników warunkujących działanie. Z przeglądu piśmiennictwa naukowego wynika, że pochodne tiazolo[4,5-*d*]pirymidyny mają działanie przeciwbakteryjne [2, 3, 5, 7, 8, 10, 19], przeciwgrzybicze [2–6, 9, 10], przeciwwirusowe [11–13] i mogą być użyteczne w leczeniu zakażeń i infekcji. Wywierają antagonistyczny efekt wobec indukowanej haloperidolem katepsji u myszy i stresu oksydacyjnego z czego wynika ich działanie przeciwparkinsonowskie [14–16]. Jako antagoniści receptorów CXCR2 oraz inhibitory uwalniania TNF α mogą być użyteczne w leczeniu tych chorób, w których nadmierne wytwarzanie cytokin prozapalnych odgrywa główną rolę, są to choroby autoimmunologiczne, takie jak reumatoidalne zapalenie stawów, stwardnienie rozsiane, astma, łuszczyca, zapalenie jelit i przewlekła obturacyjna choroba płuc [20, 21]. Wśród pochodnych omawianego układu znajdują się antagoniści receptorów dla kortykoliberyny (CRH) o potencjalnym zastosowaniu jako leki przeciwłękowe i przeciwdepresyjne [17]. Ostatnio opracowano syntezę 7-amino-5-tiotiazolopirymidyn, antagonistów receptora CX₃CR1, do stosowania w leczeniu stwardnienia rozsianego [22]. Niektóre tiazolo[4,5-*d*]pirymidyny, szczególnie z podstawnikami elektronegatywnymi, wykazują działanie cytostatyczne na wiele linii ludzkich komórek nowotworowych [23–26]. Hamują też wzrost roślin, stąd możliwość ich zastosowania w rolnictwie [27].

PIŚMIENICTWO CYTOWANE

- [1] H. Erlenmeyer, H.P. Furger, *Helv. Chim. Acta*, 1943, **26**, 366.
- [2] E.A.M. Badawey, S.M. Rida, A.A. Hazza, H.T.Y. Fahmy, Y.M. Gohar, *Eur. J. Med. Chem.*, 1993, **28**, 91.
- [3] H. Urgun, A. Balkan, M. Özalp, *Arzneim.-Forsch./Drug Res.*, 2000, **50**, 1115.
- [4] A. Balkan, H. Urgun, M. Özalp, *Arzneim.-Forsch./Drug Res.*, 2001, **51**, 839.
- [5] N.S. Habib, R. Soliman, A.A. El-Tombary, S.A. El-Hawash, O.G. Shaaban, *Arch. Pharm. Res.*, 2007, **30**, 1511.
- [6] M. Chhabria, I. Rathod, K. Vala, P. Patel, *Med. Chem. Res.*, 2011, **20**, 1450.
- [7] J.D. Akbari, K.B. Mehta, S.J. Pathak, H.S. Joshi, *Indian Journal of Chemistry*, 2008, **47B**, 477.
- [8] M-Y. Jang, S. De Jonghe, K. Segers, J. Anne, P. Herdewijn, *Bioorg. Med. Chem.*, 2011, **19**, 702
- [9] M.A. El-Sherbeny, F.A. Badria, S.A. Kheira, *Med. Chem. Res.*, 1996, **6**, 28.
- [10] S. Demirayak, I. Kayagil, Y. Tunali, *J. Fac. Pharm. Istanbul*, 2005–2006, **38**, 79.
- [11] A.F. Lewis, G.R. Revankar, S.M. Fennewald, J.H. Huffman, R.F. Rando, *J. Heterocyclic Chem.*, 1995, **32**, 547.

- [12] K. Nagahara, J.D. Anderson, G.D. Kini, N.K. Dalley, S.B. Larson, D.F. Smee, B.S. Sharma, W.B. Jolley, R.K. Robins, H.B. Cottam, *J. Med. Chem.*, 1990, **33**, 407.
- [13] G.J. Haley, J.R. Lennox, A.X. Xiang, S.E. Webber, S.E. USPTO Patent Appl. No. 20080020989, 2008.
- [14] P.M. Luthra, C.B. Mishra, P.K. Jha, S.K. Barodia, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2010, **20**, 1214.
- [15] C.B. Mishra, S.K. Barodia, A. Prakash, J.B.S. Kumar, P.M. Luthra, *Bioorg. Med. Chem.*, 2010, **18**, 2491.
- [16] F. Azam, I.A. Alkskas, M.A. Ahmed, *Eur. J. Med. Chem.*, 2009, **44**, 3889.
- [17] J.P. Beck, M.A. Curry, R.J. Chorvat, L.W. Fitzgerald, P.J. Gilligan, R. Zaczek, G.L. Trainor, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1999, **9**, 1185.
- [18] A. Balkan, Z. Gören, H. Urgan, Ü. Çalis, A. Çakar Nur, P. Atilla, T. Uzbay, *Arzneim.-Forsch./Drug Res*, 2002, **52**, 462.
- [19] A.A. Bekhit, H.T.Y. Fahmy, S.A.F. Rostom, A.M. Baraka, *Eur. J. Med. Chem.*, 2003, **38**, 27.
- [20] I. Walters, C. Austin, R. Austin, R. Bonnert, P. Cage, M. Christie, M. Ebden, S. Gardiner, C. Grahames, S. Hill, F. Hunt, R. Jewell, S. Lewis, I. Martin, D. Nicholls, D. Robinson, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2008, **18**, 798.
- [21] D.A. Carson, H.B. Cottam, L. Deng, US Patent No. 7098216, 2006.
- [22] S. Karlström, G. Nordval, D. Sohn, A. Hettman, D. Turek, K. Åhlin, A. Kers, M. Claesson *et al*, *J. Med. Chem.*, 2013, **56**, 3177.
- [23] L. Becan, E. Wagner, *Arzneim.-Forsch./Drug Res.*, 2008, **58**, 521.
- [24] L. Becan, E. Wagner, *Med. Chem. Res.*, 2013, **22**, 2376.
- [25] H.T.Y. Fahmy, S.A.F. Rostom, M.N. Saudi, J.K. Zjawiony, D.J. Robins, *Arch. Pharm. Med. Chem.*, 2003, **3**, 1.
- [26] R. Lin, S.G. Johnson, P.J. Connolly, S.K. Wetter, E. Binnun, T.V. Hughes, W.V. Murray, N.B. Pandey, S.J. Moreno-Mazza, M. Adams, A.R. Fuentes-Pesquera, S. A. Middleton, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2009, **19**, 2333.
- [27] Y. Liang, S. Fan, W.Y. Mo, H.W. He, *J. Fluorine Chem.*, 2007, **128**, 879.

Praca wpłynęła do Redakcji 13 września 2013

**SYNTEZY POCHODNYCH UKŁADU
PIRAZOLO[4,3-*c*]HETEROCYKLICZNEGO**
SYNTHESIS OF PYRAZOLO[4,3-*c*]HETEROCYCLIC
DERIVATIVES

Anna Wójcicka

*Katedra i Zakład Technologii Leków,
Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu
ul. Borowska 211A, 50-556 Wrocław
e-mail: anna.wojcicka@umed.wroc.pl

Abstract

Wykaz stosowanych symboli i oznaczeń

Wprowadzenie

1. Syntezy układu pirazolo[4,3-*c*]pirydyny
 - 1.1. z pochodnychpirydyny
 - 1.2. z pochodnychpirazolu
2. Syntezy układu pirazolo[4,3-*c*]chinoliny
 - 2.1. z pochodnychchinoliny
 - 2.2. z pochodnychpirazolu
 - 2.3. z innych substratów
3. Syntezy innych układów pirazolo[4,3-*c*]heterocyklicznych
 - 3.1. Syntezy układu pirazolo[4,3-*c*]izochinoliny
 - 3.2. Syntezy układu pirazolo[4,3-*c*]naftyrydyny
 - 3.3. Syntezy układu pirazolo[4,3-*c*]tiazyny
 - 3.4. Syntezy układu pirazolo[4,3-*c*]cynnoliny
 - 3.5. Syntezy innych pochodnych

Uwagi końcowe

Piśmiennictwo cytowane

Dr inż. Anna Wójcicka ukończyła biotechnologię na Wydziale Chemii Politechniki Wrocławskiej. Pracuje na stanowisku adiunkta w Katedrze i Zakładzie Technologii Leków Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu. Stopień doktora nauk farmaceutycznych uzyskała w 2009 roku na Wydziale Farmaceutycznym AM we Wrocławiu. Zajmuje się syntezą pochodnych 2,7-naftyrydyny oraz pirolo[3,4-*c*]pirydyny o potencjalnej aktywności biologicznej.

ABSTRACT

The broad spectrum of biological activity of pyrazolo[4,3-*c*]heterocyclic derivatives is the main of reason for the preparation of new compounds containing this scaffold. This review presents most of the literature data on the synthesis of pyrazolo[4,3-*c*]heterocyclic derivatives. This isomer system containing pyrazole moiety condensed with a heterocyclic ring can be synthesized from a different substrates, but that synthesis may be classified into two main categories: annulation of the pyrazole ring onto heterocyclic derivatives or annulation of the heterocyclic ring onto pyrazole analogs. The main goal of this study is the presentation of various methods for the preparation of the pyrazolo[4,3-*c*]pyridine (Rys. 2) [1–15], pyrazolo[4,3-*c*]quinoline (Rys. 3) [16–63], pyrazolo[4,3-*c*]isoquinoline [64, 65], pyrazolo[4,3-*c*]naphththyridine [66–68], pyrazolo[4,3-*c*]thiazine [69–72], pyrazolo[4,3-*c*]cinnoline [73, 74], pyrazolo[4,3-*c*]quinolizine [75], and pyrazolo[4,3-*c*]pyridazine [76] derivatives.

Keywords: pyrazolo[4,3-*c*]heterocyclic derivatives, pyrazolo[4,3-*c*]pyridine, pyrazolo[4,3-*c*]quinoline, pyrazolo[4,3-*c*]naphththyridine, synthesis

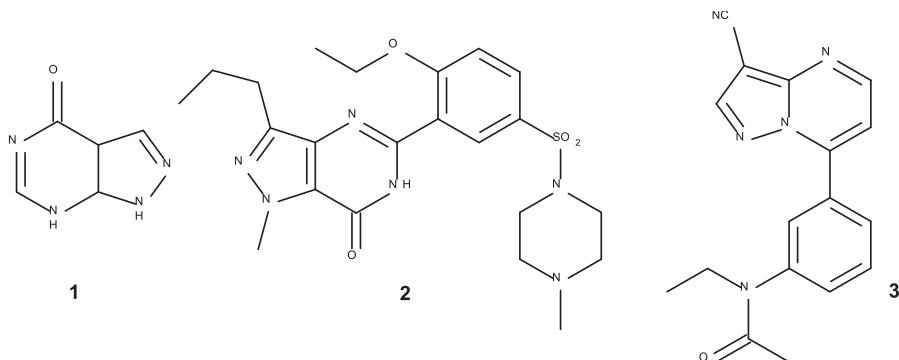
Słowa kluczowe: pochodne pirazolo[4,3-*c*]heterocykliczne, pirazolo[4,3-*c*]pirydyny, pirazolo[4,3-*c*]chinoliny, pirazolo[4,3-*c*]naftyrydyny, synteza

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

Ar	- aromat (ang. <i>aromate</i>)
Bu	- butyl (ang. <i>butyl</i>)
DMF	- <i>N,N</i> -dimetyloformamid (ang. <i>N,N-dimethylformamide</i>)
DMSO	- dimetylosulfotlenek (ang. <i>dimethyl sulfoxide</i>)
DTBMP	- 2,6-di- <i>t</i> -butylo-4-metylopirydyna (ang. <i>2,6-di-t-butyl-4-methylpyridine</i>)
Et	- etyl (ang. <i>ethyl</i>)
Me	- metyl (ang. <i>methyl</i>)
MW	- mikrofała (ang. <i>microwave</i>)
Ph	- fenyl (ang. <i>phenyl</i>)
PIFA	- bis(trifluorooctan) fenylojodyny III (ang. <i>phenyliodine(III) bis(trifluoroacetate)</i>)
TFA	- kwas trifluorooctowy (ang. <i>trifluoroacetic acid</i>)
TEO	- trietyloortomrówczan (ang. <i>triethyloortoformate</i>)
Tf	- trifluorometanosulfonian CF_3SO_3^- (ang. <i>trifluoromethanesulfonate</i>)
Ts	- <i>p</i> -toluenosulfonian (ang. <i>p-toluenesulfonyl</i>)

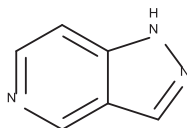
WPROWADZENIE

W ostatnich kilkudziesięciu latach wzrasta zainteresowanie naukowców pochodnymi zawierającymi pierścień pirazolu skondensowany z innym układem heterocyklicznym, ze względu na ich szerokie spektrum aktywności biologicznej. Przykładem takich związków wprowadzonych do lecznictwa są: stosowany w leczeniu dny moczanej allopurinol **1**, inhibitor fosfodiesterazy – sildenafilil **2** czy nasenny zaleplon **3** (Rys. 1) [1].



Rysunek 1. Heterocykliczne pochodne pirazolu stosowane w lecznictwie
Figure 1. Heterocyclic pyrazole derivatives used in medical treatment

W niniejszej pracy przedstawiono dotychczas poznane i opisane w piśmiennictwie chemicznym metody syntezy pochodnych układu pirazolo[4,3-*c*]heterocyklicznego.

1. SYNTEZY UKŁADU PIRAZOLO[4,3-*C*]PIRYDYNY

4

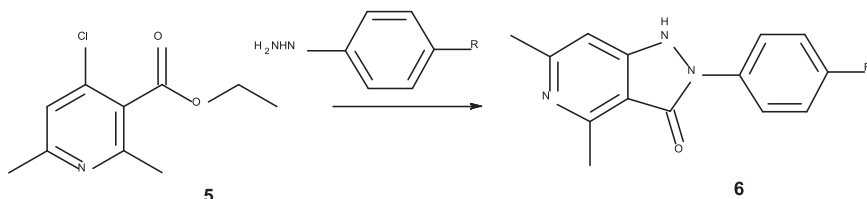
Rysunek 2. Izomer pirazolo[4,3-*c*]pirydyny
Figure 2. The pyrazolo[4,3-*c*]pyridine isomer

Układ pirazolo[4,3-*c*]pirydyny **4** (Rys. 2) można otrzymać w wyniku dobudowania pierścienia pirazolu do pochodnej pirydyny lub wychodząc z pochodnej pirazolu, dobudować skondensowany z nim pierścień pirydyny

1.1. Z POCHODNYCH PIRYDINY

Najczęściej opisywaną metodą syntezy układu pirazolo[4,3-*c*]pirydyny jest reakcja addycji nukleofilowej hydrazyny do pochodnych pirydyny zawierających ugrupowanie estrowe lub pochodnych pirydynonu.

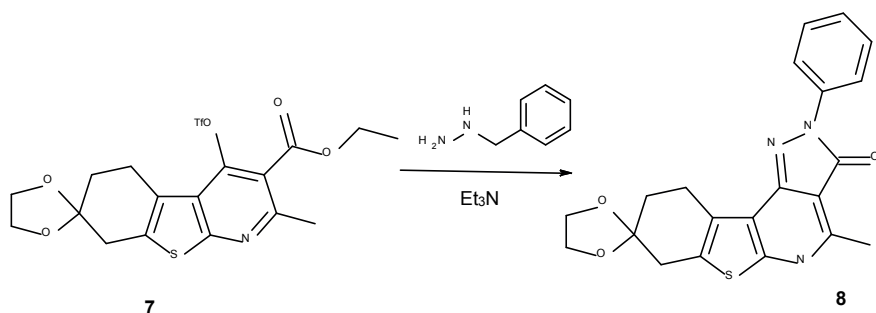
Ester etylowy kwasu 4-chloro-2,6-dimetylonikotynowego (**5**) w reakcji z pochodnymi fenylhydrazyny ulega cyklokondensacji do odpowiednich pochodnych 4,6-dimetylo-(2-fenyleno)pirazolo[4,3-*c*]pirydyn-3-onu **6** (Schemat 1) [2].



Schemat 1

Scheme 1

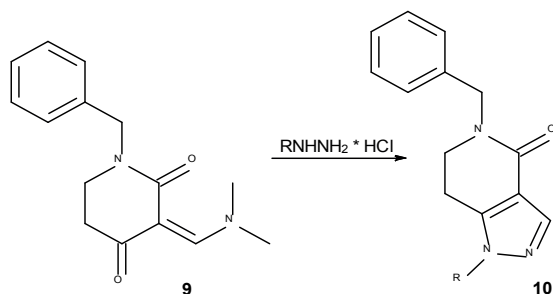
Spiropochodna estru benzotiofeno[2,3-*b*]pirydyny **7** w reakcji cyklizacji z benzylhydrazyną wobec trietyloaminy daje odpowiednią pochodną pirazolo[4,3-*c*]benzo[*b*]tieno[2,3-*b*]pirydyny **8** (Schemat 2) [3].



Schemat 2

Scheme 2

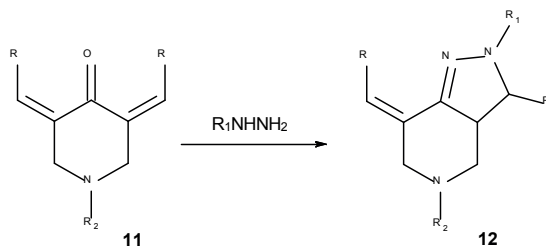
W reakcji cyklokondensacji 1-benzyl-3-[(dimetyloamino)metylideno]piperidyno-2,4-dionu (**9**) z pochodnymi hydrazyny otrzymuje się pochodne 5-benzyl-6,7-dihydropirazolo[4,3-*c*]pirydyn-4-onu **10** (Schemat 3) [4].



Schemat 3

Scheme 3

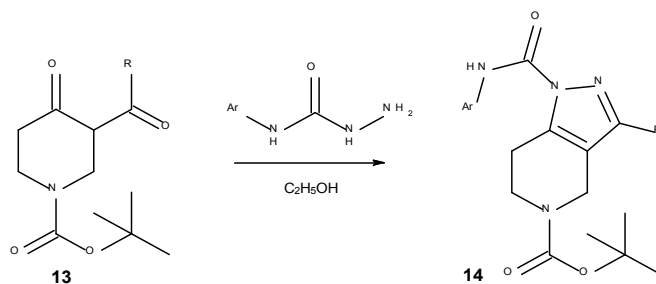
Pochodne piperydynonu **11** poddane reakcji z pochodnymi hydrazyny wobec etoksyłanu lub bezwodnika octowego i katalizatora cyklizują do odpowiednich pochodnych pirazolo[4,3-*c*]pirydyny **12** (Schemat 4) [5–7].



Schemat 4

Scheme 4

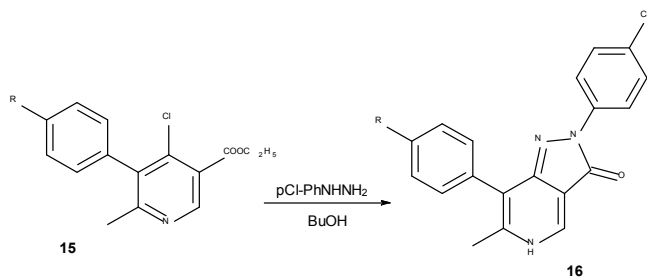
Ketopochodne piperydynonu **13** ulegają cyklocondensacji z semikarbazydami do karbamoilopochodnych pirazolo[4,3-*c*]pirydyny **14** (Schemat 5) [8].



Schemat 5

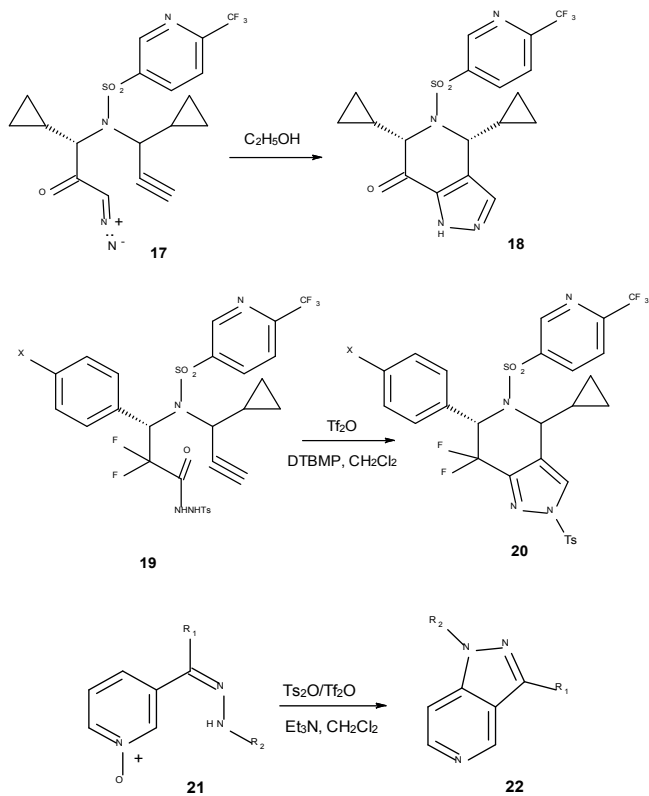
Scheme 5

W reakcji cyklocondensacji pochodnych estru kwasu 4-chloropirydyno-3-karboksylowego **15** z chlorofenylhydrazyną powstają pochodne pirazolo[4,3-*c*]pirydyn-3-onu **16** (Schemat 6) [9].



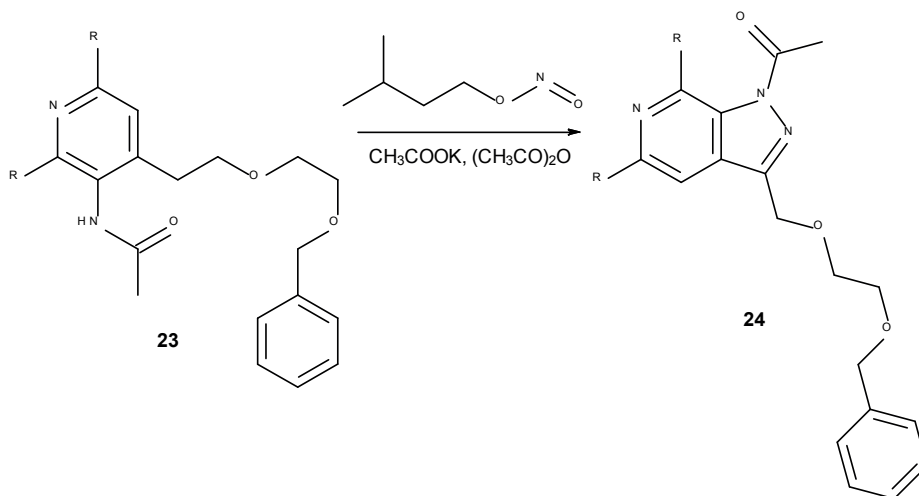
Schemat 6
Scheme 6

Układ pirazolo[4,3-*c*]pirydyny **18**, **20**, **22** można otrzymać w wyniku wewnątrzcząsteczkowej cykloaddycji diazoketonu **17** [10] lub hydrazonów **19** [10] i **21** (Schemat 7) [11].



Schemat 7
Scheme 7

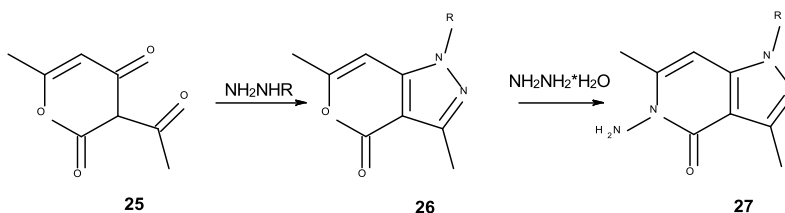
Pochodne acetyloaminopirydyny **23** w reakcji z azotym tertbutyłu wobec metoksylanu potasu i bezwodnika octowego cyklizują do odpowiednich ketopochodnych pirazolo[4,3-*c*]pirydyny **24** (Schemat 8) [12].



Schemat 8
Scheme 8

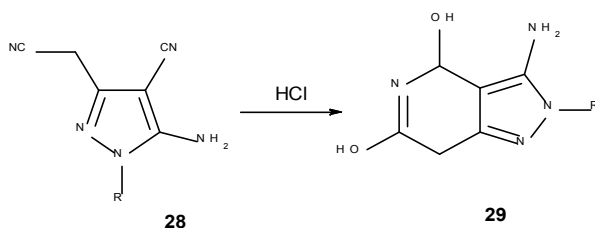
1.2. Z POCHODNYCH PIRAZOLU

3-Acetylo-6-metylopirano-2,4-diol (**25**) w reakcji cyklocondensacji z pochodnymi hydrazyny daje pochodne pirano[4,3-*c*]pirazol-4-onu **26**, które wobec wodzianu hydrazyny ulegają przegrupowaniu do odpowiednich pochodnych pirazolo[4,3-*c*]pirydyny **27** (Schemat 9) [13].



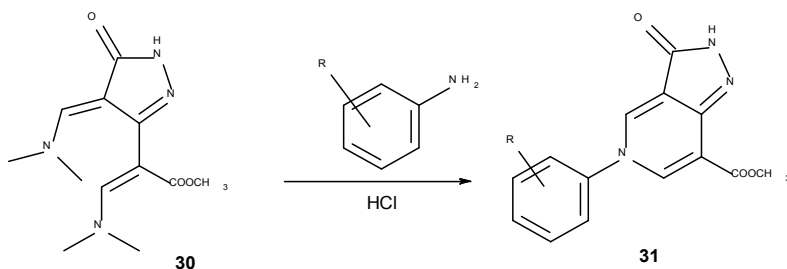
Schemat 9
Scheme 9

W wyniku wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji pochodnych 5-amino-3-cyano-metylopirazolo-4-karbonitrylu **28** w kwasie solnym powstają *N*-pochodne 3-amino-4,7-dihydropirazolo[4,3-*c*]pirydyno-4,6-diolu **29** (Schemat 10) [14].



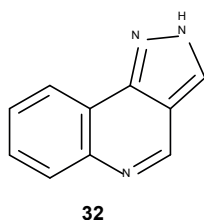
Schemat 10
Scheme 10

Diaminopochodna pirazol-3-onu **30** w reakcji kondensacji z pochodnymi aniliny daje odpowiednie pochodne pirazolo[4,3-*c*]pirydyn-3-onu **31** (Schemat 11) [15].



Schemat 11
Scheme 11

2. SYNTETY UKŁADU PIRAZOLO[4,3-*C*]CHINOLINY

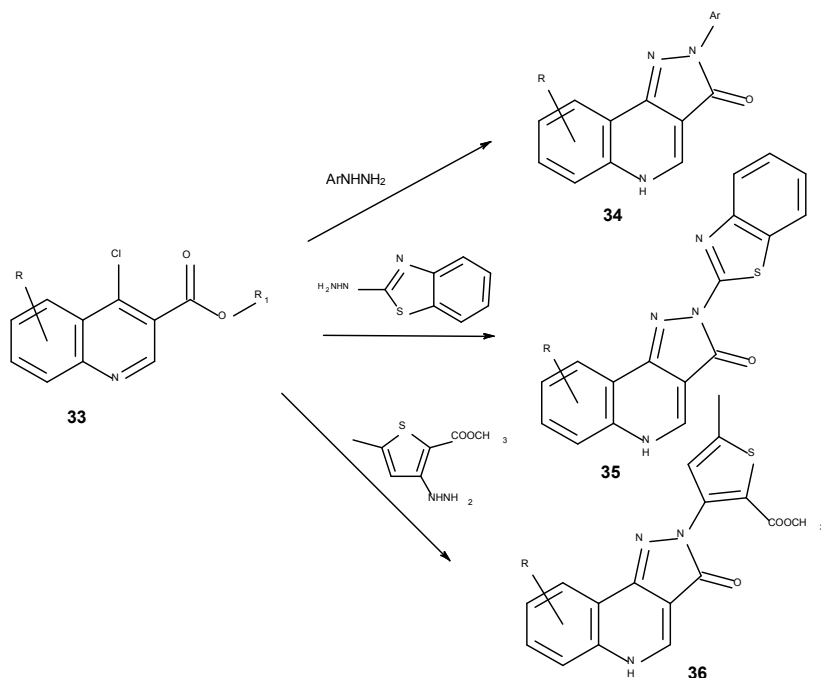


Rysunek 3. Izomer pirazolo[4,3-*c*]chinoliny
Figure 3. The pyrazolo[4,3-*c*]quinoline isomer

Najwięcej publikacji naukowych opisujących syntezy izomeru pirazolo[4,3-*c*]chinoliny **32** (Rys. 3) dotyczy dobudowania pierścienia pirazolu do pochodnej chinoliny. Pochodne tego układu można również otrzymać z pochodnych pirazolu lub w wyniku wewnątrzcząsteczkowej cyklokondensacji innych substratów.

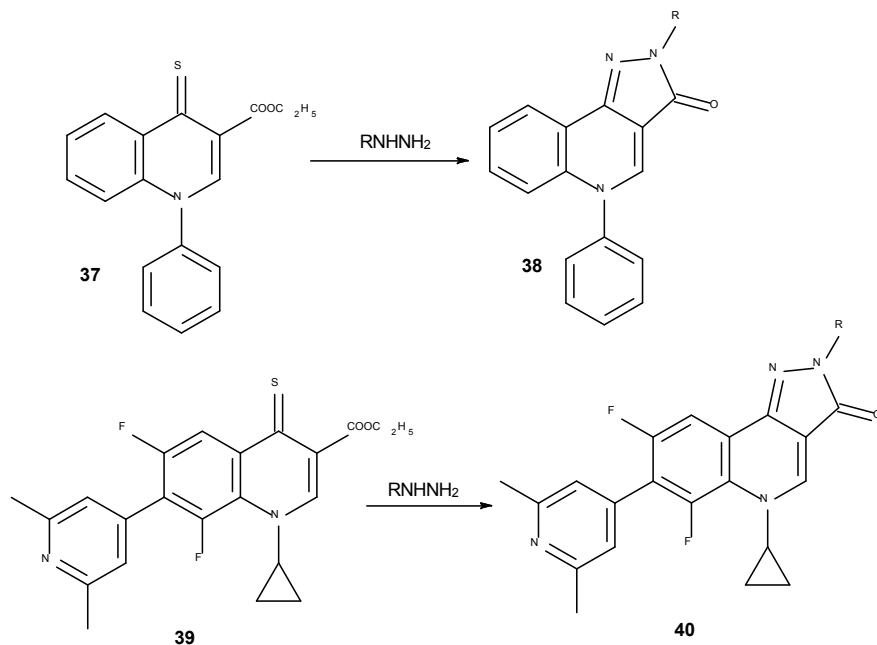
2.1. Z POCHODNYCH CHINOLINY

Najczęściej wykorzystywaną metodą syntezy układu pirazolo[4,3-*c*]chinolin-3-onu **34–36** jest cyklokondensacja pochodnych estru kwasu chinolino-3-karboksylowego zawierającego w pozycji 4 chlorowiec **33** z pochodnymi fenylhydrazyny w etanolu, Dowtherm A, ksylenie [16–24], DMF [25] lub z hydrazynobenzotiazolem w toluenie [26] czy z karboksylanem hydrazynotiofenu (Schemat 12) [27, 28].



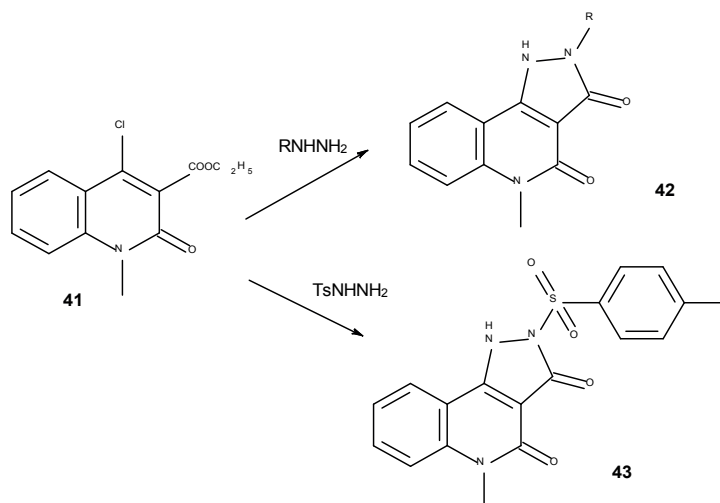
Schemat 12
Scheme 12

Analogicznej reakcji (Schemat 13) ulegają tiopochodne estru kwasu chinolino-3-karboksylowego **37** i **39** dając odpowiednie *N*-podstawione pochodne pirazolo[4,3-*c*]chinoliny **38** [29] i **40** [30].



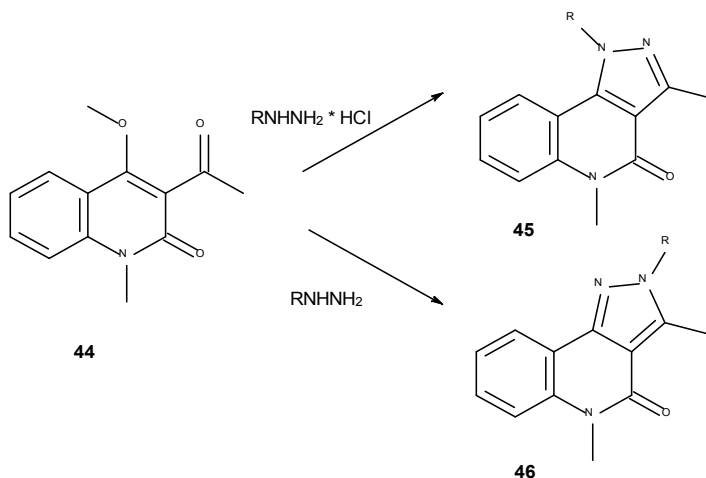
Schemat 12
Scheme 12

Ester etylowy kwasu 4-chloro-1-metylo-2-okso-1,2-dihydrochinolino-3-karboksylowego (**41**) poddany reakcji cyklokondensacji z pochodnymi hydrazyny w etoksyetanolu daje odpowiednie pochodne pirazolo[4,3-*c*]chinolino-3,4-dionu **42**, natomiast z *p*-tolueno-sulfonylohydrazidem w DMSO daje 5-metylo-2-(tolueno-4-sulfonylo)-1,2-dihydro-5H-pirazolo[4,3-*c*]chinolino-3,4-dion (**43**) (Schemat 14) [31].



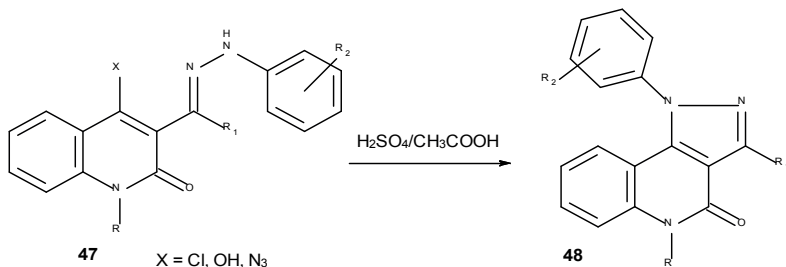
Schemat 14
Scheme 14

Udowodniono, że w wyniku cyklokondensacji 3-acylo-4-metoksy-1-metylochinolin-2-onu (**44**) z pochodnymi hydrazyny mogą powstać dwa regioizomery 1,3-dipodstawiona pochodna i 2,3-dipodstawiona pochodna pirazolo[4,3-c]chinoliny w zależności od zastosowanych reagentów (Schemat 15). W reakcji z chlorowodorkami hydrazyny powstaje głównie 1,3-dipodstawiona pochodna **45** a z wolnymi hydrazynami pochodna 2,3-dipodstawiona **46** [32].



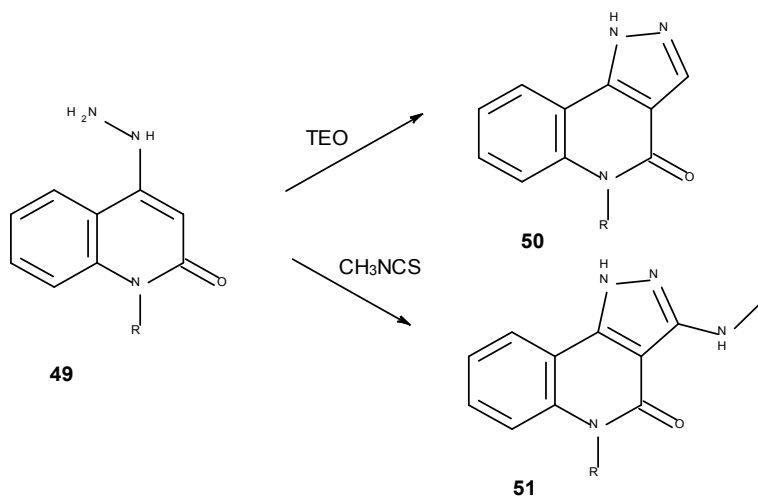
Schemat 15
Scheme 15

Pochodne 4-chloro, 4-azydo lub 4-hydroksy-3-hydrazonochinolin-2-onu **47** ulegają wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji wobec mieszaniny kwasu octowego i siarkowego do odpowiednich pochodnych pirazolo[4,3-*c*]chinolin-4-onu **48** (Schemat 16) [33, 34].



Schemat 16
Scheme 16

Układ pirazolo[4,3-*c*]chinolin-4-onu **50-51** można otrzymać w wyniku cyklo-kondensacji pochodnych 4-hydrazynochinolin-2-onu **49** (Schemat 17) z trietylo-ortomrówczanem w glikolu etylenowym [35] lub z metyloizotiocyjanianem [36].

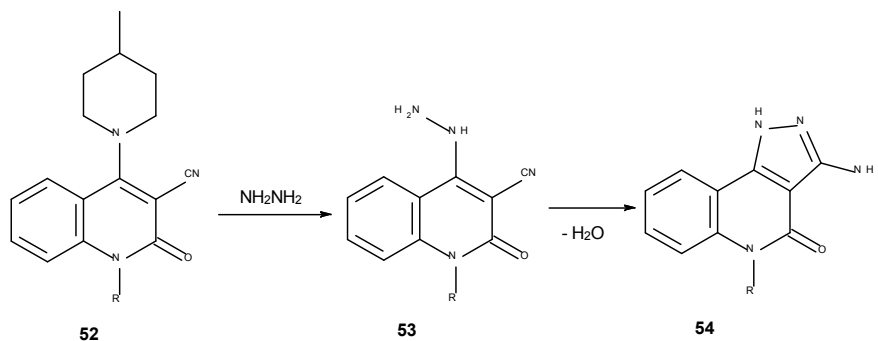


Schemat 17
Scheme 17

Pochodne 3-aminopirazolo[4,3-*c*]chinoliny otrzymać można w reakcjach pochodnych chinolino-3-karbonitryli zawierających w pozycji 4 rodnik chlorkowy lub aminowy.

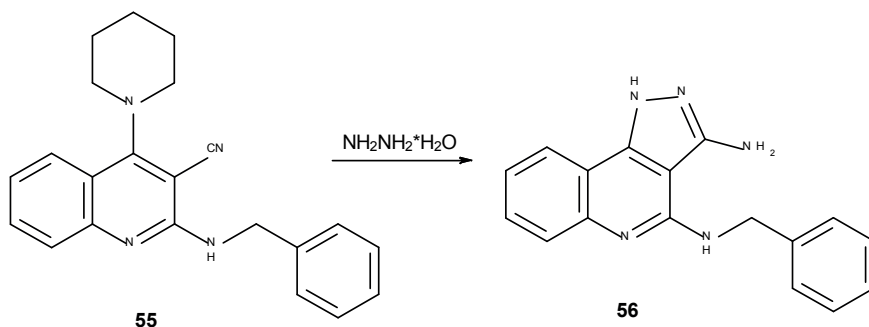
W wyniku reakcji pochodnych 2-okso-4-piperidynochinolino-3-karbonitrylu **52** z hydrazyną otrzymuje się 4-hydrazynopochodną **53**, która ulega wewnątrzcząst-

teczkowej cyklizacji dając odpowiednie 3-aminopochodne pirazolo[4,3-c]chinolino-4-onu **54** (Schemat 18) [37, 38].



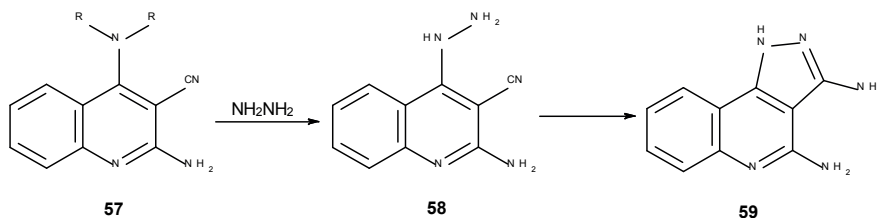
Schemat 18
Scheme 18

2-Benzyloamino-4-(piperydyn-1-ylo)chinolino-3-karbonitryl (**55**) w analogicznej reakcji daje N-benzylo-1H-pirazolo[4,3-c]chinolino-3,4-diaminę (**56**) (Schemat 19) [37].



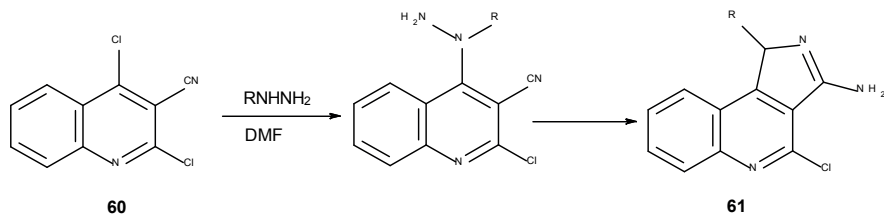
Schemat 19
Scheme 19

Pochodne 2,4-diaminochinolino-3-karbonitrylu **57** w reakcji z hydrazyną tworzą pochodną hydrazyny **58**, która następnie cyklizuje do 3,4-diamino-1H-pirazolo[4,3-c]chinoliny (**59**) (Schemat 20) [39].



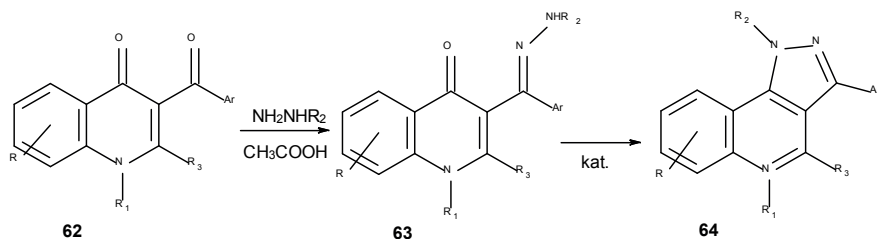
Schemat 20
Scheme 20

2,4-Dichlorochinolino-3-karbonitryl (**60**) w reakcji z pochodnymi hydrazyny, według opisanego poprzednio mechanizmu ulega cyklizacji do pochodnych 3-amino-4-chloropirazolo[4,3-*c*]chinoliny **61** (Schemat 21) [40, 41].



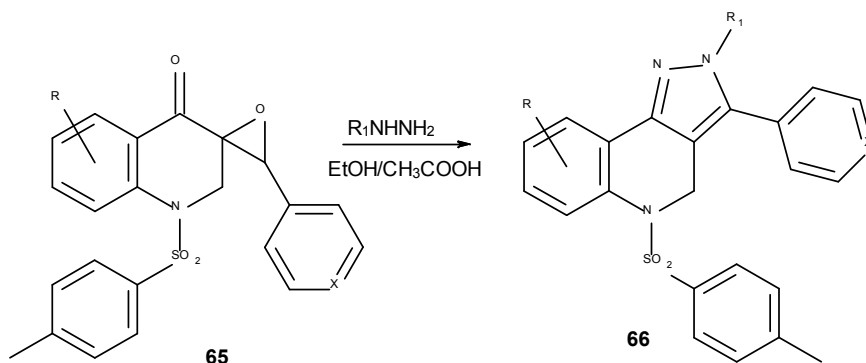
Schemat 21
Scheme 21

Pochodne chinolin-4-onu **62**, **65** są również wykorzystywane w reakcjach kondensacji z hydrazynami w celu uzyskania pochodnych pirazolo[4,3-*c*]chinoliny. Najczęściej 3-karbonyloprochodne chinolin-4-onu **62** w reakcji z hydrazynami w środowisku kwaśnym tworzą odpowiednie hydrazony **63**, które cyklizują z grupą karbonylową wobec pirydyny lub katalizatora jonowymiennego (Amberlyst) do pochodnych pirazolo[4,3-*c*]chinoliny **64** (Schemat 22) [42–45].



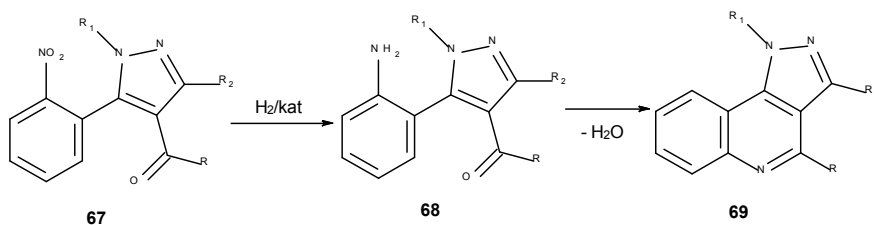
Schemat 22
Scheme 22

Pochodne 3-oksychinolin-4-onu **65** ulegają cyklocondensacji z pochodnymi hydrazyny w absolutnym etanolu wobec katalitycznej ilości lodowatego kwasu octowego do odpowiednich pochodnych pirazolo[4,3-*c*]chinoliny **66** (Schemat 23) [46].

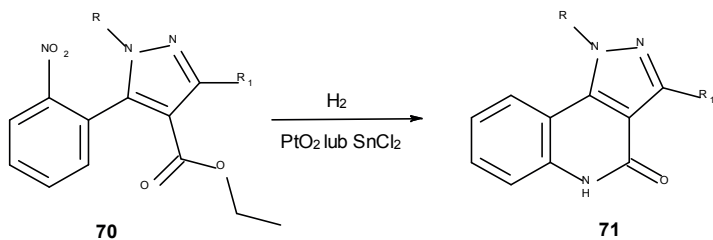


2.2. Z POCHODNYCH PIRAZOLU

Najczęściej opisywaną metodą syntezy układu pirazolo[4,3-*c*]chinoliny z pochodnych pirazolu jest wewnątrzcząsteczkowa reakcja cyklizacji między grupą aminową w pierścieniu fenylowym i karbonylową w pierścieniu pirazolu. Substratem są pochodne 4-karbonylo-5-(2-nitrofenylo)-pirazolu **67**, które poddane katalitycznej redukcji do pochodnych 4-karbonylo-5-(2-aminofenylo)-pirazolu **68** cyklizują z utworzeniem sześciocząłowego pierścienia pirydyny skondensowanego z pirazolem i pierścieniem fenylowym (Schemat 24), dając układ pirazolo[4,3-*c*]chinoliny **69** [46–48].

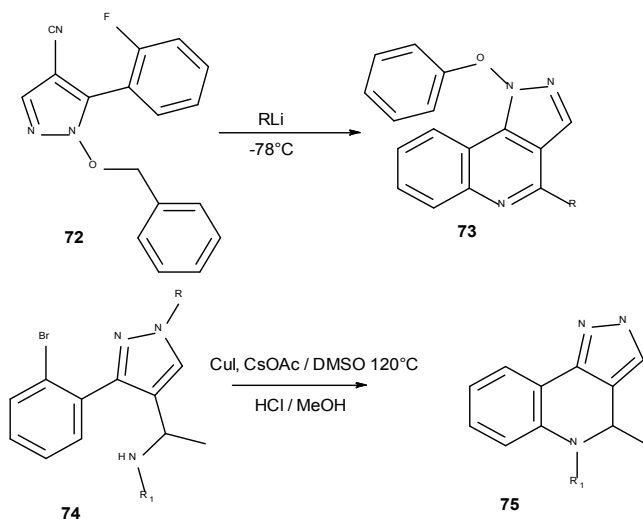


Gdy substratem jest pochodna 5-(2-nitrofenylo)-pirazolo-4-karboksylanu **70** powstają odpowiednie pochodne pirazolo[4,3-*c*]chinolin-4-onu **71** (Schemat 25) [49–53].



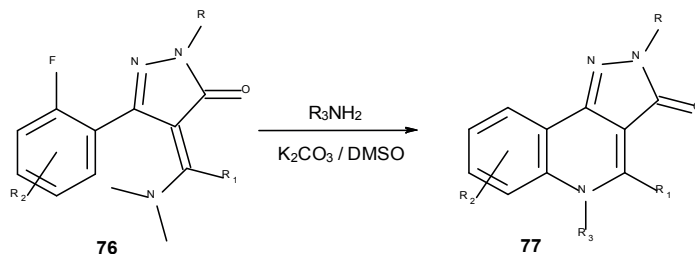
Schemat 25
Scheme 25

Pochodne 5-(2-halogenofenylo)-pirazolu podstawione w pozycji 4 grupą aminową **72** lub nitrylową **74** cyklizują odpowiednio do pochodnych pirazolo[4,3-*c*]chinoliny **73** i **75** (Schemat 26) [54, 55].



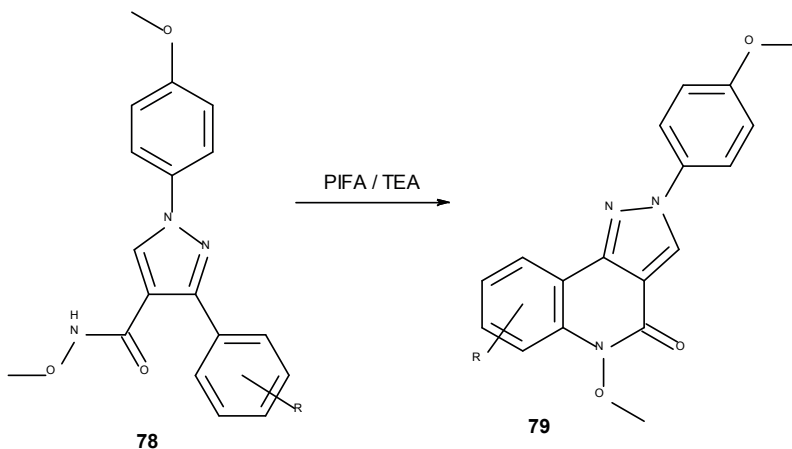
Schemat 26
Scheme 26

W wyniku cyklizacji pochodnych 5-(2-fluorofenylo)-pirazol-3-onu **76** powstają pochodne pirazolo[4,3-*c*]chinolin-3-onu **77** (Schemat 27) [56].



Schemat 27
Scheme 27

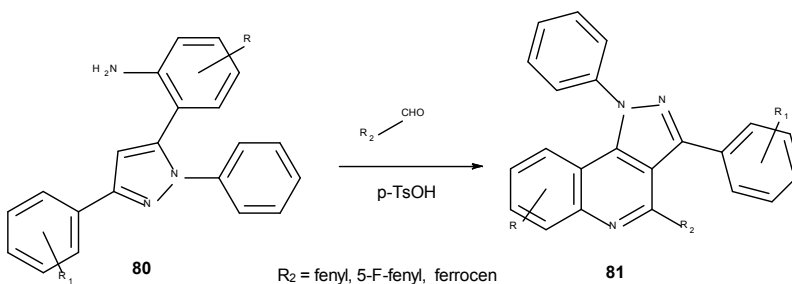
Pochodne pirazolo[4,3-*c*]chinolin-4-onu **79** powstają w wyniku wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji pochodnych 3-fenylopirazolo-4-karboksyamidu **78** pod wpływem bis(trifluoroocetanu)fenylojodyny III i kwasu trifluoroocetowego w chlorku metylenu (schemat 28) [57].



Schemat 28
Scheme 28

Układ pirazolochinoliny otrzymywany jest również w reakcjach Picteta-Spenglera, gdzie substratem wyjściowym jest pochodna pirazolu podstawionego pochodną aniliny.

Pochodne 2-(2,5-difenylopirazol-3-yl)aniliny **80** w reakcji cyklokondensacji z aldehydami aromatycznymi lub ferrocenokarboksyaldehydem wobec kwasu *p*-toluenosulfonowego dają pochodne 1,3,4-trifenylopirazolo[4,3-*c*]chinoliny **81** (Schemat 29) [58, 59].

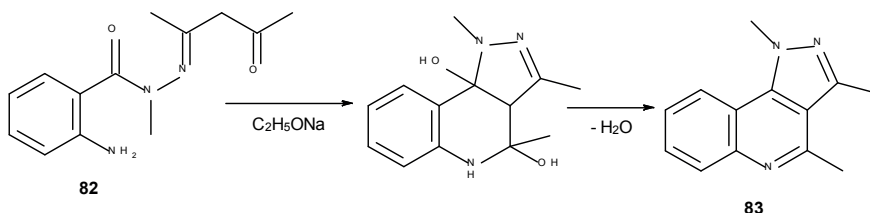


R₂ = fenył, 5-F-fenył, ferrocen

Schemat 29
Scheme 29

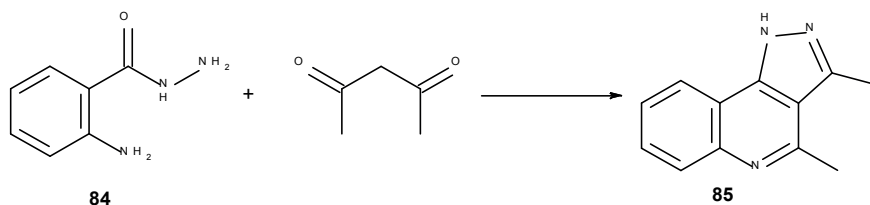
2.3. Z INNYCH SUBSTRATÓW

Substratem wyjściowym w syntezie układu pirazolo[4,3-*c*]chinoliny są również pochodne aniliny. W reakcji wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji pochodnej 2-aminobenzenoamidu **82** wobec etoksydanu powstaje 1,3,4-trimetylopirazolo[4,3-*c*]chinolina (**83**) (Schemat 30) [60, 61].



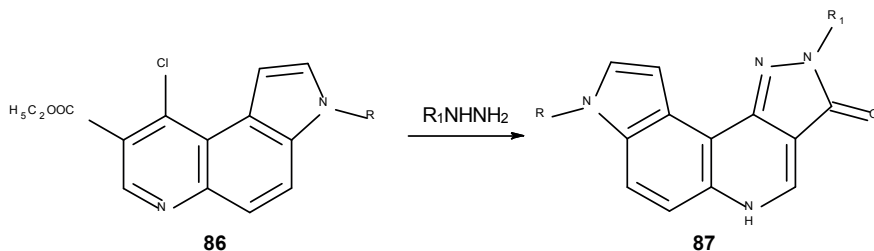
Schemat 30
Scheme 30

Cyklocondensacja 2-aminobenzohydrazynu (**84**) z pentano-2,4-dionem w ksylenie prowadzi do 3,4-dimetylo-1H-pirazolo[4,3-*c*]chinoliny (**85**) (Schemat 31) [62].



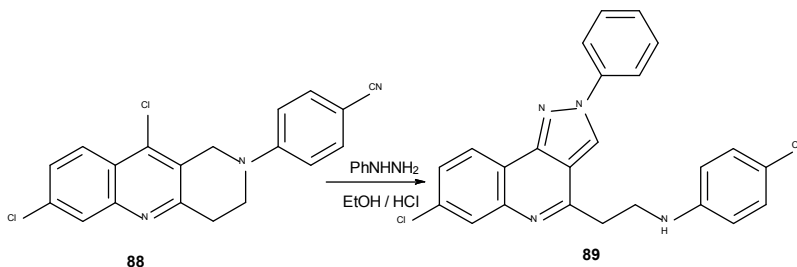
Schemat 31
Scheme 31

Pochodne estru etylowego kwasu 9-chloro-3H-pirol[3,2-*f*]chinolino-8-karboksylowego **86** ulegają cyklocondensacji z pochodnymi hydrazyny wobec trietyloaminy w ksylenie do pochodnych pirazolo[4,3-*c*]pirol[3,2-*f*]chinolin-3-onu **87** (Schemat 32) [63].



Schemat 32
Scheme 32

4-(7,10-Dichloro-3,4-dihydro-1H-benzo[*b*][1,6]naftyrydyn-2-ylo)benzonitryl (**88**) ulega reakcji przegrupowania i cyklokondensacji z fenylhydrazyną wobec HCl do 4-[2-(7-chloro-2-fenylpirazolo[4,3-*c*]chinolin-4-ylo)etyloamino]benzonitrylu (**89**) (Schemat 33) [1].

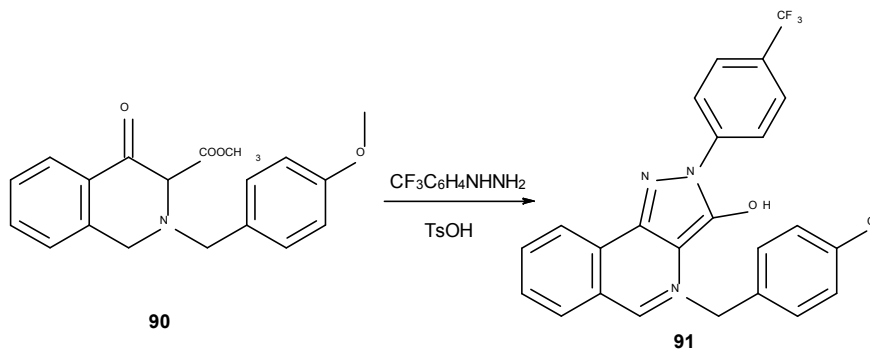


Schemat 33
Scheme 33

3. SYNTEZY INNYCH UKŁADÓW PIRAZOLO[4,3-*c*]HETEROCYKLIKZNYCH

3.1. SYNTEZY UKŁADU PIRAZOLO[4,3-*c*]IZOCHINOLINY

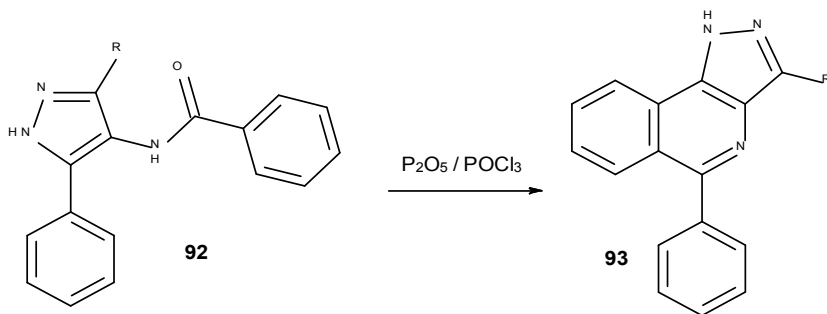
Ester metylowy kwasu 1,2,3,4-tetrahydro-2-(4-metoksyfenyl)metylo-4-oksoizochinolino-3-karboxylowego (**90**) w reakcji cyklokondensacji z trifluorometylofenylhydrazyną daje 3-hydroksy-4-[(4-metoksyfenyl)metylo]-2-(4-trifluorometylofenyl)-2H-pirazolo[4,3-*c*]izochinolinę (**91**) (Schemat 34) [64].



Schemat 34
Scheme 34

Pochodne 4-benzamido-3-fenylpirazolu **92** ulegają wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji pod wpływem mieszaniny pięcio- i trójtlenku fosforu wobec dietyloani-

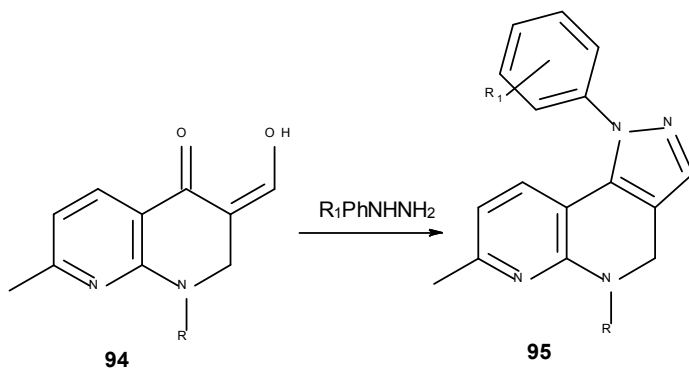
liny do odpowiednich pochodnych 5-fenylopirazolo[4,3-*c*]izochinoliny **93** (Schemat 35) [65].



Schemat 35
Scheme 35

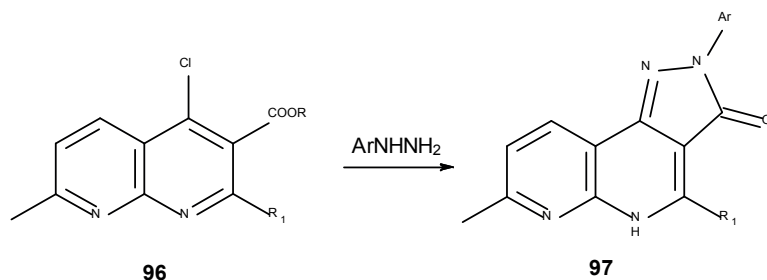
3.2. SYNTEZY UKŁADU PIRAZOLO[4,3-*C*]NAFTYRYDYN

Pochodna 3-hydroksymetyleno-1,8-naftyrydyn-4-onu **94** w reakcji z pochodnymi fenylohydrazyny daje odpowiednie pochodne pirazolo[4,3-*c*][1,8]naftyrydyny **95** (Schemat 36) [66].



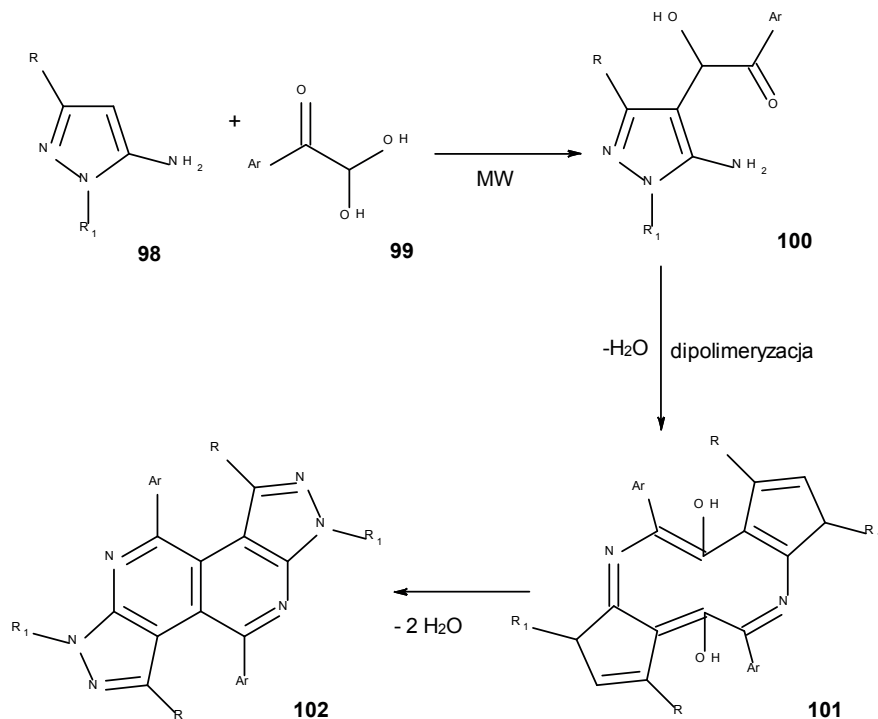
Schemat 36
Scheme 36

Reakcji cyklokondensacji z pochodnymi fenylohydrazyny ulegają również pochodne estru kwasu 4-chloro-1,8-naftyrydino-3-karboksyowego **96** dając pochodne pirazolo[4,3-*c*][1,8]naftyrydyn-3-onu **97** (Schemat 37) [67].



Schemat 37
Scheme 37

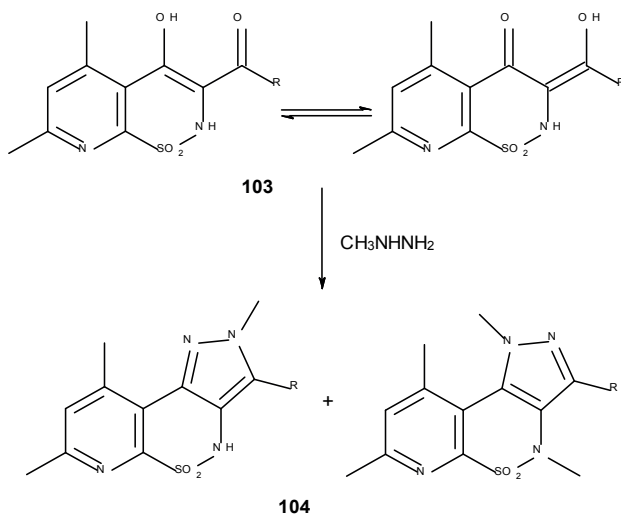
Powstała w reakcji kondensacji pochodnych 5-aminopirazolu **98** i 2,2-dihydroksy-1-aryloetanonu **99** pochodna pirazolu **100** dipolimeryzuje do cyklicznego związku pośredniego **101**, który następnie ulega wewnątrzcząsteczkowej elektrocyklizacji do pochodnej dipirazolo[4,3-c][2,6]naftyrydyny **102**. Jest to synteza typu „one pot” prowadzona w reaktorze mikrofalowym wobec kwasu masłowego (Schemat 38) [68].



Schemat 38
Scheme 38

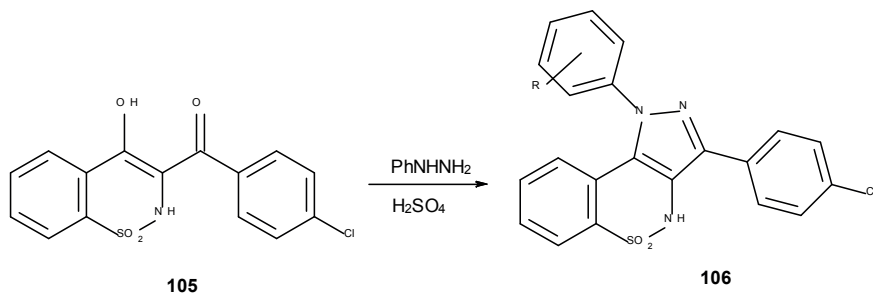
3.3. SYNTEZY POCHODNYCH PIRAZOLO[4,3-*c*]TIAZYNY

Pochodne 1,1-ditlenku pirydo[3,2-*e*]-1,2-tiazyny **103**, występujące w tautomerii keto-enolowej, ulegają cyklokondensacji z metylohydrazyną do odpowiednich pochodnych 5,5-ditlenku pirazolo[4,3-*c*]pirydo[3,2-*e*]-1,2-tiazyny **104** (Schemat 39) [69].



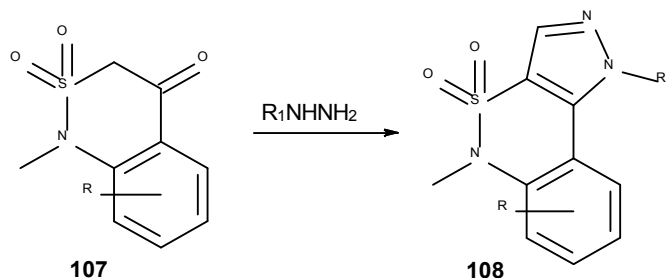
Schemat 39
Scheme 39

1,1-Ditlenek 4-chlorofenilo-(4-hydroksy-2H-1,2-benzotiazyn-3-ylo)metanonu (**105**) w reakcji cyklokondensacji z pochodnymi fenylohydrazyny w kwasie siarkowym daje odpowiednie pochodne 5,5-ditlenku 3-(4-chlorofenilo)pirazolo[4,3-*c*] [1,2]benzotiazyny **106** (Schemat 40) [70].



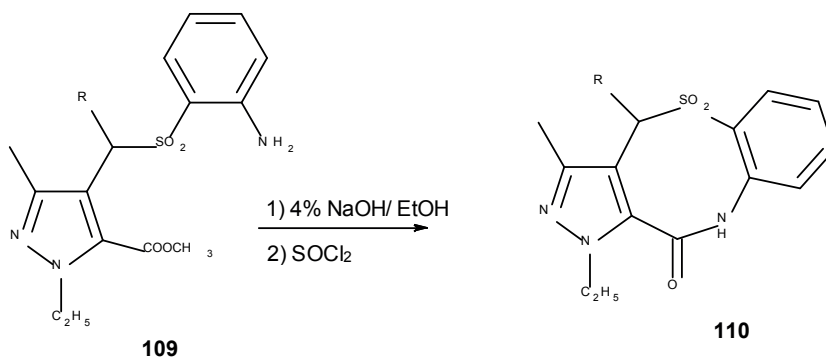
Schemat 40
Scheme 40

Pochodne 4,4-ditlenku pirazolo[4,3-*c*][2,1]benzotiazyny **108** otrzymuje się w wyniku cyklocondensacji pochodnych benzotiazyn-4-onu **107** z pochodnymi hydrazyny (Schemat 41) [71].



Schemat 41
Scheme 41

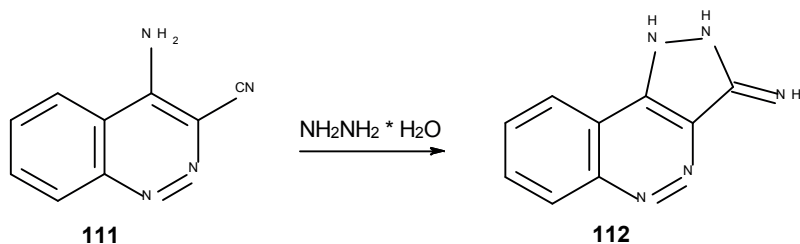
Pirazolopochodne sulfonyloaniliny **109** wobec $SOCl_2$ cyklizują do odpowiednich pochodnych dwutlenku pirazolo[4,3-*c*][1,2,6]benzotiadiazocyn-11-onu **110** (Schemat 42) [72].



Schemat 42
Scheme 42

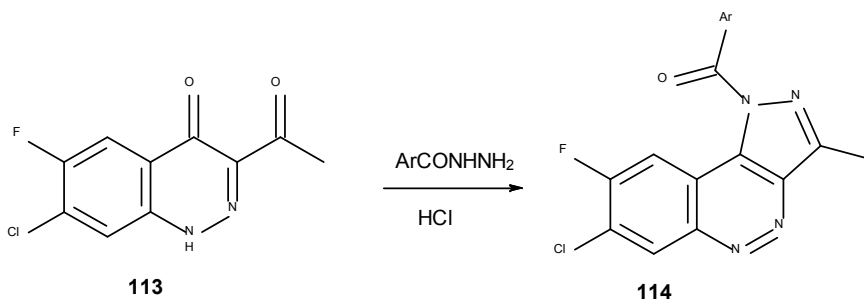
3.4. SYNTEZY UKŁADU PIRAZOLO[4,3-*c*]CYNNOLINY

W wyniku reakcji 4-amino-3-cyjanocynnoliny (**111**) z wodzianem hydrazyny, poprzez przejściowy amidrazon, następuje cyklizacja z odłączeniem cząsteczki amoniaku do 3-imino-1H-pirazolo[4,3-*c*]cynnoliny (**112**) (Schemat 43) [73].



Schemat 43
Scheme 43

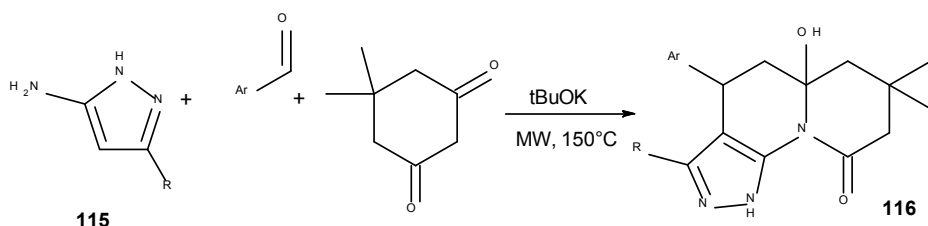
W reakcji cyklokondensacji 3-acetylo-7-chloro-6-fluoro-1H-cynnolin-4-onu (**113**) z hydrazdami kwasów aromatycznych wobec HCl w bezwodnym dioksanie powstają pochodne 7-chloro-8-fluoro-3-metylopirazolo[4,3-c]cynnoliny **114** (Schemat 44) [74].



Schemat 44
Scheme 44

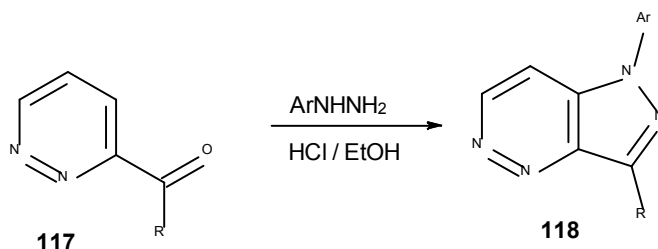
3.5. SYNTEZY INNYCH POCHODNYCH

W reakcji pochodnych 5-aminopirazolu **115** z cyklicznym diketonem i aldehydami aromatycznymi wobec tert-butanolanu potasu, prowadzonej w reaktorze mikrofalowym w wysokiej temperaturze, powstają pochodne pirazolo[4,3-c]chinnolizyn-9-onu **116** (Schemat 45) [75].



Schemat 45
Scheme 45

Pochodne ketonu pirydazyny **117** cyklokondensują z arylohydrazynami w środowisku kwaśnym dając odpowiednie pirazolo[4,3-*c*]pirydazyny **118** (Schemat 46) [76].



Schemat 46

Scheme 46

UWAGI KOŃCOWE

Związki zawierające pierścień pirazolu skondensowany z innym układem heterocyklicznym mogą występować w postaci kilku izomerów. W niniejszej pracy omówiono metody syntezy pochodnych izomeru pirazolo[4,3-*c*], z których najczęściej opisywanymi w piśmiennictwie chemicznym są pirazolo[4,3-*c*]pirydyny i pirazolo[4,3-*c*]chinoliny. Z przeglądu literatury naukowej wynika, iż układ pirazolo[4,3-*c*]heterocykliczny można otrzymać najczęściej w wyniku dobudowania pierścienia pirazolu do pochodnej heterocyklicznej lub gdy substratem jest pochodna pirazolu, poprzez cyklizację sprzężonego z nią układu heterocyklicznego.

PIŚMIENICTWO CYTOWANE

- [1] R.A. Mekheimer, E.A. Ahmed, K.U. Sadek, *Tetrahedron*, 2012, **68**, 1637.
- [2] L.A. Zhmurenko, G.M. Molodavkin, T.A. Voronina, V.P. Lezina, *J. Pharm. Chem.*, 2012, **46**, 18.
- [3] C.D. Benham, T.P. Blackburn, A. Johns, N.R. Kotecha, R.T. Martin, D.R. Thomas, M. Thompson, R.W. Ward, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1995, **5**, 2455.
- [4] D. Zerovnik, U. Groselj, D. Kralj, C. Malavasic, J. Bezensek, G. Dahmann, K. Stare, A. Meden, B. Stanovnik, J. Svete, *Synthesis*, 2010, **19**, 3363.
- [5] M.A. Al-Omar, K.M. Youssef, M.A. El-Sherbeny, A.A. Awadalla, H.I. El-Subbagh, *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.*, 2005, **338**, 175.
- [6] S.A.F. Rostom, G.S. Hassan, H.I. El-Subbagh, *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.*, 2009, **342**, 584.
- [7] S. Rostamizdeh, N. Shadjou, M. Azad, N. Jalali, *Catal. Comm.*, 2012, **26**, 218.
- [8] P. Yogeewari, M. Sharma, G. Samala, M. Gangadhar, S. Karthick, S. Mallipeddi, A. Semwal, D. Srinam, *Eur. J. Med. Chem.*, 2013, **66**, 211.
- [9] W.P. Blackaby, J.R. Atack, F. Bromidge, R. Lewis, M.G.N. Russell, A. Smith, K. Wafford, R.M. McKernan, L.J. Street, J.L. Castro, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2005, **15**, 4998.
- [10] A.W. Garofalo, J.J. Jagodzinski, A.W. Konradi, R.A. Ng, C.M. Semko, H.L. Sham, M. Sun, X.M. Ye, *Chem. Pharm. Bull.*, 2012, **60**, 1063.

- [11] W.J. Lominac, M.L. D'Angelo, M.D. Smith, D.A. Ollison, J.M. Hanna Jr., *Tetrahedron Lett.*, 2012, **53**, 906.
- [12] N. Laugiakis, P. Marakos, N. Poul, J. Balzarini, *Chem. Pharm. Bull.*, 2008, **56**, 775.
- [13] H.M. Faidallah, S.A.F. Rostom, M.S. Al-Saadi, *JKAU: Sci.*, 2010, **22**, 177.
- [14] S. Kushwah, K. Prajapati, N. Darji, P. Soni, P. Shah, *IJPRBS*, 2012, **1**, 287.
- [15] J. Baskovc, D. Bevk, B. Stanovnik, J. Steve, *J. Comb. Chem.*, 2009, **11**, 500.
- [16] R.I. Fryer, P. Zhang, R. Rios, Z. Gu, A.S. Basile, P. Skolnick, *J. Med. Chem.*, 1993, **36**, 1669.
- [17] L. Savini, L. Chiasserini, C. Pellerano, G. Biggio, E. Maciocco, M. Serra, N. Cinone, A. Carrieri, C. Altomare, A. Carotti, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2001, **9**, 431.
- [18] L. Savini, P. Massarelli, C. Nencini, C. Pellerano, G. Biggio, A. Maciocco, G. Tuligi, A. Carrieri, N. Cinone, A. Carotti, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1998, **6**, 389.
- [19] A. Carotti, C. Altomare, L. Savini, L. Chiasserini, C. Pellerano, M.P. Mascia, E. Maciocco, F. Busonero, M. Mameli, G. Biggio, E. Sanna, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2003, **11**, 5259.
- [20] N. Yokoyama, B. Ritter, A.D. Neubert, *J. Med. Chem.*, 1982, **25**, 337.
- [21] L. Ismaili, B. Refouvet, F.J. Robert, *J. Heterocycl. Chem.*, 1999, **36**, 719.
- [22] B.K. Ghotekar, M.G. Ghagare, R.B. Toche, M.N. Jachak, *Monatsh. Chem.*, 2010, **141**, 169.
- [23] J. Karolak-Wojciechowska, J. Lange, W. Ksiazek, M. Gniewosz, S. Rump, *Farmaco*, 1993, **48**, 65.
- [24] C. Manera, M.G. Cascio, V. Benetti, M. Allara, T. Tuccinardi, A. Martinelli, G. Saccomanni, E. Vivoli, C. Ghelardini, V.D. Marzo, P.L. Ferrarini, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2007, **17**, 6505.
- [25] R.M.J. Lopez, E. L. Moyano, G.I. Yranzo, *Tetrahedron Lett.*, 2010, **51**, 478.
- [26] R.R. Reis, E.C. Azevedo, M.C.B.V. de Souza, V.F. Ferreira, R.C. Montenegro, A.J. Araujo, C. Pessoa, L.V. Costa-Lotufó, M.O. de Moraes, J.D.B.M. Filho, A.M.T. de Souza, N.C. de Carvalho, H.C. Castro, C.R. Rodrigues, T.R.A. Vasconcelos, *Eur. J. Med. Chem.*, 2011, **46**, 1448.
- [27] H. Budgaard, N.M. Nielsen, *J. Med. Chem.*, 1987, **30**, 454.
- [28] S. Takada, H. Shindo, T. Sasatani, N. Chomei, A. Matsushita, *J. Med. Chem.*, 1989, **32**, 1213.
- [29] I.M. Crespo, J. Gracia, C. Puig, A. Vega, J. Bou, J. Beleta, T. Domenech, H. Ryder, V. Segarra, J.M. Palacios, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2000, **10**, 2661.
- [30] B. Baruah, K. Dasu, B. Vaitilingam, A. Vanguri, S.R. Casturi, K.R. Yeleswarapu, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2004, **14**, 445.
- [31] I.V. Ukrainets, A.A. Tkach, V.V. Kravtsova, A.V. Turov, *Chem. Heterocycl. Comp.*, 2009, **45**, 48.
- [32] S. Chimichi, M. Boccalini, A. Matteucci, *Tetrahedron*, 2008, **64**, 9275.
- [33] Th. Kappe, W. Stadlbauer, *Molecules*, 1996, **1**, 255.
- [34] W. Stadlbauer, G. Hojas, *J. Heterocyclic Chem.*, 2004, **41**, 681.
- [35] M. Abass, *Synth. Commun.*, 2000, **30**, 2735.
- [36] F. Suzuki, Y. Nakasato, K. Ohmori, T. Tamura, H. Hosoe, K. Kubo, I. Yoshitake, *Eur. Patent 476544*, 1992.
- [37] R. Mekheimer, E.Kh. Ahmed, A.F. Khattab, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1993, **66**, 2936.
- [38] A.R. Mekheimer, S.M. Refaey, K.U. Sadek, A.M. Abdel Hameed, M.A. Ibrahim, A. Shah, *J. Chem. Res.*, 2008, 735.
- [39] A.R. Mekheimer, E.Kh. Ahmed, H.A. El-Faham, L.H. Kamel, D. Doepp, *J. Chem. Res.*, 2003, 288.
- [40] R. Mekheimer, *Pharmazie*, 1994, **49**, 486.
- [41] R. Mekheimer, T. Kappe, *Heterocycl. Commun.*, 1998, **4**, 131.
- [42] M.X. Wang, Y. Liu, Z.T. Huang, *Tetrahedron Lett.*, 2001, **42**, 2553.
- [43] O.V. Silin, T.I. Savchenko, S.M. Kovalenko, V.M. Nikitchenko, A.V. Ivachtchenko, *Heterocycles*, 2004, **63**, 1883.
- [44] T.I. Savchenko, O.V. Silin, S.M. Kovalenko, V.I. Musatov, V.M. Nikitchenko, A.V. Ivachtchenko, *Synth. Commun.*, 2007, **37**, 1321.

- [45] G.D. Kalayanov, S.K. Kang, H.G. Cheon, S.G. Lee, E.K. Yum, S.S. Kim, J.K. Choi, *Bull. Korean Chem. Soc.*, 1998, **19**, 667.
- [46] K.N. Sangwan, M.P. Kelkar, N.S. Rastogi, N. Anand, *Indian J. Chem. Sect B: Org. Chem. Incl. Med. Chem.*, 1985, **24B**, 639.
- [47] G.D. Kalayanov, J.K. Choi, *Heterocycles*, 1998, **48**, 1221.
- [48] J. Pawlas, P. Vedso, P. Jacobsen, P.O. Huusfeldt, M. Begtrup, *J. Org. Chem.*, 2000, **65**, 9001.
- [49] D. Sicker, D. Reifegerste, S. Hauptmann, H. Wilde, G. Mann, *Synthesis*, 1985, **3**, 331.
- [50] F. Melani, L. Cecchi, G. Palazzino, G. Filacchioni, C. Martini, E. Pennacchi, A. Lucacchini, *J. Pharm. Sci.*, 1986, **75**, 1175.
- [51] K. Makino, H.S. Kim, Y. Kurosawa, *J. Heterocycl. Chem.*, 1998, **35**, 489.
- [52] P.G. Baraldi, M.A. Tabrizi, D. Preti, A. Bovero, F. Fruttarolo, R. Romagnoli, N.A. Zaid, A.R. Moorman, K. Varani, P.A. Borea, *J. Med. Chem.*, 2005, **48**, 5001.
- [53] B. Daou, M. Soufiaoui, *Tetrahedron*, 1989, **45**, 3351.
- [54] J. Pawlas, P. Vedso, P. Jacobsen, P.O. Huusfeldt, M. Begtrup, *J. Org. Chem.*, 2001, **66**, 4214.
- [55] A.P. Truong, D.L. Aubele, G.D. Probst, M.I. Neitzel, C.M. Semko, S. Bowers, D. Dressen, R.K. Hom, A.W. Konradi, H.L. Sham, A.W. Garofalo, P.S. Keim, J. Wu, M.S. Dappen, K. Wong, E. Goldbach, K.P. Quinn, J.M. Sauer, E.F. Brigham, W. Wallace, L. Nguyen, S.S. Hemphill, M.P. Bova, G. Basi, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2009, **19**, 4920.
- [56] D.C. Beshore, R. M. Dipardo, S.D. Kuduk, *Tetrahedron Lett.*, 2010, **51**, 970.
- [57] M.S. Christodoulou, S. Liekens, K.M. Kasiotis, S.A. Haroutounian, *Bioorg. Med. Chem.*, 2010, **18**, 4338.
- [58] S. Duggineni, D. Sawant, B. Saha, B. Kundu, *Tetrahedron*, 2006, **62**, 3228.
- [59] G.T. Cin, S. Demirel, A. Cakici, *J. Organomet. Chem.*, 2011, **696**, 613.
- [60] M. Gal, O. Feher, E. Tihanyi, G. Horvath, G. Jerkovich, G. Argay, A. Kalman, *Tetrahedron Lett.*, 1980, **21**, 1567.
- [61] M. Gal, O. Feher, E. Tihanyi, G. Horvath, G. Jerkovich, *Tetrahedron* 1982, **38**, 2933.
- [62] K.S. Phadtare, K.S. Kamat, T.G. Panse, *Indian J. Chem.*, 1983, **22B**, 499.
- [63] M.G. Ferlin, G. Chiarelto, S. Dall'Acqua, E. Maciocco, M.P. Mascia, M.G. Pisu, G. Biggio, *Bioorg. Med. Chem.*, 2005, **13**, 3531.
- [64] E.D. Philips, S.C. Hirst, M.W.D. Perry, J. Withnall, *J. Org. Chem.*, 2003, **68**, 8700.
- [65] J. Mortier, R. Frederick, C. Ganef, C. Remouchamps, P. Talaga, L. Pochet, J. Wouters, J. Piette, E. Dejardin, B. Masereel, *Biochem. Pharm.*, 2010, **79**, 1462.
- [66] A. Da Settimo, G. Primafiore, F. Da Settimo, F. Simorini, *Drug Des. Disc.*, 1994, **11**, 307.
- [67] I.T. Forbes, C.N. Johnson, G.E. Jones, J. Loudon, J.M. Nicholass, M. Thompson, N. Upton, *J. Med. Chem.*, 1990, **33**, 2640.
- [68] W. Fan, Q. Ye, H-W. Xu, B. Jiang, S-L. Wang, S-J. Tu, *Org. Lett.*, 2013, **15**, 2258.
- [69] W. Malinka, *Il Farmaco*, 1995, **50**, 29.
- [70] S. Sabatini, F. Gosetto, S. Serritella, G. Manfroni, O. Tabarrini, N. Iraci, J.P. Brincat, E. Carosati, M. Villarini, G.W. Kaatz, V. Cecchetti, *J. Med. Chem.*, 2012, **55**, 3568.
- [71] N. Tomita, Y. Hayashi, S. Suzuki, Y. Oomori, Y. Aramaki, Y. Matsushita, M. Iwatani, H. Iwata, A. Okabe, Y. Awazu, O. Isono, R.J. Skene, D.J. Hosfield, H. Miki, T. Kawamoto, A. Hori, A. Baba, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2013, **23**, 1779.
- [72] O. Migliara, V. Spano, B. Parrino, C. Ciancimino, P. Diana, *Arkivoc*, 2012, **ii**, 41.
- [73] A.M. Amer, I.A.G. Attia, M. El-Mobayad, S. Asker, *Polish J. Chem.*, 2000, **74**, 681.
- [74] R.K. Tonk, S. Bawa, G. Chawla, G.S. Deora, S. Kumar, V. Rathore, N. Mulakayala, A. Rajaram, A.M. Kalle, O. Afzal, *Eur. J. Med. Chem.*, 2012, **57**, 176.
- [75] V.A. Chebanov, V.E. Saraev, S.M. Desenko, V.N. Chernenko, I.V. Knyazeva, U. Groth, T.N. Glasnov, C.O. Kappe, *J. Org. Chem.*, 2008, **73**, 5110.

- [76] L. Filak, T.A. Rokob, G. A. Vasko, O. Egyed, A. Gomory, Z. Riedl, G. Hajos, *J. Org. Chem.*, 2008, 73, 3900.

Praca wpłynęła do Redakcji 26 września 2013

MECHANIZM OPORNOŚCI NA LEKI PLATYNOWE ORAZ STRATEGIE POKONYWANIA TEGO ZJAWISKA

THE MECHANISM OF RESISTANCE TO PLATINUM DRUGS AND STRATEGIES TO OVERCOME THIS PHENOMENON

**Wanda Weiss-Gradzińska, Wojciech Krzempek,
Lilianna Trynda-Lemiesz***

*Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu,
Katedra i Zakład Chemii Analitycznej
ul. Borowska 211 A, 50-566 Wrocław
e-mail: lilianna.trynda-lemiesz@am.wroc.pl

Abstract

Wykaz stosowanych skrótów

Wprowadzenie

1. Istota procesu nowotworowego
2. Mechanizmy powstawania lekooporności
3. Kompleksy platyny jako leki cytostatyczne
4. Mechanizmy oporności na leki platynowe
5. Strategie pokonywania zjawiska oporności na leki platynowe
 - 5.1. Kombinacje cisplatyny z modulatorami odgrywającymi główną rolę w rozwoju oporności
 - 5.2. Łączenie cisplatyny z lekami, których działanie skierowane jest wprost na komórki nowotworowe
 - 5.3. Nowe leki platynowe
 - 5.3.1. Związki platyny(IV)
 - 5.3.2. Wielojądrowe kompleksy platyny
 - 5.4. Nowe postacie leku
 - 5.4.1. Enkapsulacja
 - 5.4.2. Nanorurki
6. Infekcja wirusami onkolitycznymi

Uwagi końcowe

Piśmiennictwo cytowane

Dr hab. Lilianna Trynda-Lemiesz jest absolwentką chemii i wieloletnim pracownikiem Wydziału Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego. Przez ostatnie lata była kierownikiem Katedry Chemii Analitycznej na Wydziale Farmacji Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. Badania naukowe, które prowadzi dotyczą przede wszystkim przenoszenia leków przez biologiczne układy transportujące ze szczególnym uwzględnieniem kompleksów metali o właściwościach przeciwnowotworowych.

Mgr farmacji Wanda Weiss-Gradzińska ukończyła Wydział Farmacji Akademii Medycznej we Wrocławiu. Jest wykładowcą w Katedrze Chemii Analitycznej. Jej zainteresowania naukowe to nowej generacji leki przeciwnowotworowe.

Mgr farmacji Wojciech Krzempek jest absolwentem Wydziału Farmacji Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. Był dyplomantem w Katedrze Chemii Analitycznej. Obecnie pracuje w firmie farmaceutycznej.

ABSTRACT

Platinum drugs belong to one of the oldest [2] and best investigated groups of cytotoxic drugs. On account of their high efficacy and alkylating-like action [14] they are used in a treatment of various types of neoplasms [3–5]. Despite investigators' best efforts survival time of patients diagnosed with cancer is still short. Responsible for the fact is high toxicity of used therapeutic methods and development of resistance to them [3–5, 19]. In this paper authors review reasons behind decreased sensitivity of neoplastic cells to platinum treatment and discuss the newest promising trends in its overcoming.

Due to different properties of neoplastic cells, availability of a chemotherapeutic agent inside a tumour is limited [9–12]. Moreover continuous development of resistance to platinum drugs further decreases their cellular concentration and inactivates their functions. Also owing to increased activity of DNA repair systems, higher tolerance to genome deformations and numerous mechanisms that lead to impaired apoptosis, drug efficacy is reduced [3–5, 19].

In order to increase a potency of platinum agents new therapeutic strategies are investigated. Coadministration with resistance modulators [20, 22, 23] and combination therapy with other antineoplastic drugs [8, 24–30] have already proved their effectiveness. Additionally, newer generations of platinum drugs are developed [15–18]. Mostly platinum(IV) prodrug complexes often releasing axial ligands with their own pharmacological action [5, 6, 31], but also multi-nuclear platinum compounds that form more complex DNA-adducts [32–35]. Other strategies include the development of innovative dosage forms such as single walled carbon nanotubes (SWCNTs), multiwalled carbon nanotubes (MWCNTs) [38, 39] or encapsulation [36, 37]. Finally utilisation of oncolytic viruses could be a way to selectively destroy neoplastically transformed cells [40].

Keywords: platinum drugs, drug resistance, cancer therapy, influx, efflux, carbon nanotubes, cisplatin

Słowa kluczowe: leki platynowe, oporność lekowa, leczenie nowotworów, influx, efflux, nanorurki węglowe, cisplatyna

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

ABC	– kasetę wiążącą ATP (ang. <i>ATP-binding Cassette</i>)
ABCC1/2	– białka związane z opornością wielolekową (ang. <i>multi-drug resistance-associated protein 1</i>)
AFt	– apoferrytyna (ang. <i>apoferritin</i>)
APO-1	– antygen apoptozy 1, CD95, receptor śmierci Fas (FasR) (ang. <i>apoptosis antigen 1</i>)
ATP	– adenozyno-5'-trifosforan (ang. <i>adenosine-5'-triphosphate</i>)
ATP7A	– transportująca miedź ATP-aza 1 (ang. <i>copper-transporting ATPase 1</i>)
BAD	– promotor śmierci związany z Bcl-2 (ang. <i>Bcl-2-associated death promoter</i>)
BAX	– białko x związane z Bcl-2 (ang. <i>Bcl-2-associated X protein</i>)
Bcl-2	– podstawowe białko rodziny Bcl-2, chłoniaka z komórek typu B (ang. <i>B-cell lymphoma</i>)
Bcl-xS	– białko rodziny Bcl-2, krótsza forma białka Bcl-x (ang. <i>B-cell lymphoma-extra small</i>)
CH	– cholesterol (ang. <i>cholesterol</i>)
COX-2	– cyklooksygenaza 2 (ang. <i>cyclooxygenase-2</i>)
Ctr1	– transporter miedziowy 1 (ang. <i>copper transporter 1</i>)
DNA	– kwas deoksyrybonukleinowy (ang. <i>deoxyribonucleic Acid</i>)
ECMP	– białka macierzy pozakomórkowej (ang. <i>extracellular matrix proteins</i>)
EGFR	– receptor nabłonkowego czynnika wzrostu (ang. <i>epidermal growth factor receptor</i>)
FasL	– ligand receptora śmierci Fas (ang. <i>fas ligand</i>)
FDA	– Agencja ds. Żywności i Leków (ang. <i>food and drug Administration</i>)
FUMP	– fluorourydyno monofosforan (ang. <i>Fluorouridine monophosphate</i>)
G ₀	– faza spoczynku (ang. <i>G zero phase</i>)
G ₁	– faza wzrostu 1, przerwa 1 (ang. <i>gap 1</i>)
G ₂	– faza wzrostu 2, przerwa 2 (ang. <i>gap 2</i>)
GGR	– całościowa naprawa genomu (ang. <i>global genome repair</i>)
GGT	– γ -glutamyl transferaza (ang. <i>gamma glutamyl transferase</i>)
GPX1	– peroksydaza glutationowa 1 (ang. <i>glutathione peroxidase 1</i>)

GSH	– glutation (ang. <i>glutathione</i>)
GST	– glutationo- <i>S</i> -transferaza (ang. <i>glutathione S-transferase</i>)
H-1PV	– parwowirus H-1 (ang. <i>parvovirus H-1</i>)
HER2	– drugi ludzki naskórkowy receptor dla czynnika wzrostu (ang. <i>human epidermal growth factor receptor 2</i>)
HMGB1	– białko dużej mobilności B1 (ang. <i>high-mobility group protein B1</i>)
ICL repair	– naprawa międzycieniowych połączeń krzyżowych (ang. <i>intrastrand crosslink lesion repair</i>)
M	– faza mitozy (ang. <i>mitosis</i>)
MMR	– naprawa niesparowanych zasad (ang. <i>mismatch repair</i>)
MRP-1	– białko związane z opornością wielolekową (ang. <i>multi-drug resistance protein 1</i>)
MT	– metalotioneina (ang. <i>metallothionein</i>)
MWCNTs	– wielowarstwowe nanorurki węglowe (ang. <i>multi-walled carbon nanotubes</i>)
NER	– naprawa przez wycięcie nukleotydu (ang. <i>nucleotide excision repair</i>)
NSCLC	– niedrobnokomórkowy rak płuc (ang. <i>non-small-cell lung carcinoma</i>)
LMP	– permeabilizacja błony lizosomu (ang. <i>lysosomal membrane permeabilization</i>)
PC	– fosfatydylocholina (ang. <i>phosphatidylcholine</i>)
PE	– fosfatydyloetanolamina (ang. <i>phosphatidylethanolamine</i>)
RR	– naprawa rekombinacyjna (ang. <i>recombinational repair</i>)
S	– w cyklu komórkowym, faza syntezy (ang. <i>synthesis</i>)
SWCNTs	– jednowarstwowe nanorurki węglowe (ang. <i>single walled carbon nanotubes</i>)
TLS	– naprawa ponad miejscem uszkodzenia (ang. <i>translesion synthesis</i>)
TNF	– czynnik martwicy nowotworu (ang. <i>tumor necrosis factor</i>)
VEGF	– czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (ang. <i>vascular endothelial growth factor</i>)

WPROWADZENIE

Choroby nowotworowe są drugą najczęstszą, po chorobach układu krążenia, przyczyną śmierci Polaków. Z danych statystycznych wynika, że 24% wszystkich zgonów w Polsce jest następstwem chorób nowotworowych [1]. Mimo iż arsenał leków cytostatycznych jest dość szeroki, to jednak czas przeżycia pacjentów zdiagnozowanych onkologicznie nie jest długi, wynosi od kilku miesięcy do kilku lat. Tak niekorzystne rezultaty leczenia są wynikiem dużej toksyczności cytostatyków, a także pojawiającej się w czasie terapii oporności komórek nowotworowych na stosowane leki. Terapia onkologiczna, to poszukiwanie kompromisu pomiędzy wysoką skutecznością leczenia i niską toksycznością wobec zdrowych komórek.

Do jednych z najdłużej i najczęściej stosowanych grup leków przeciwnowotworowych należą leki platynowe. Podstawowym lekiem tej grupy jest cisplatyna, której właściwości hamujące cykl komórkowy zostały odkryte już w 1965 roku [2]. Lek ten z powodzeniem stosowany jest od lat siedemdziesiątych, jednak ze względu na dużą toksyczność oraz liczne mechanizmy oporności rozwijające się w komórkach nowotworowych, stosowanie cisplatyny bywa ograniczone. Częściowym sukcesem w pokonywaniu tych problemów było wprowadzenie do leczenia karboplatyny i oksaliplatyny, czyli mniej toksycznych leków platyny(II) [3, 4].

Ze względu na potencjał do przełamывania oporności komórek nowotworowych bardziej obiecujące wydają się być związki platyny(IV), a zwłaszcza będące w fazie badań klinicznych satraplatyna i LA-12. Związki te są mniej reaktywne niż analogi cisplatyny, są prolekami, które w środowisku kwasowym wnętrza stransformowanych komórek łatwo ulegają redukcji do związków platyny(II) odłączając w tym procesie dwa ligandy osiowe [5]. Satraplatyna została zaprojektowana jako doustny prolek o właściwościach lipofilnych. Charakteryzuje się szybkim wychwytem komórkowym, co prowadzi do zwiększenia jej kumulacji w komórkach [5]. Satraplatyna powoduje zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G_2/M . W porównaniu do oksaliplatyny charakteryzuje się większą aktywnością oraz czterokrotnie wyższym stężeniem komórkowym [6]. **Wszystko to czyni leki platynowe interesującym obiektem rozważań w odniesieniu do problemu oporności nowotworów na leczenie oraz strategii pokonywania zjawiska oporności.**

W pracy podjęto próbę wyjaśnienia najważniejszych mechanizmów powstawania oporności komórek nowotworowych na leki będące pochodnymi platyny oraz pokazania najnowszych strategii przełamывania oporności.

1. ISTOTA PROCESU NOWOTWOROWEGO

Nowotwór to nieprawidłowy i nadmierny rozrost liczby komórek, spowodowany utratą wpływu na kontrolę wzrostu, trwający pomimo usunięcia przyczyny stymulującej powstanie tej zmiany. Na skutek kumulacji pojawiających się stopniowo nieletalnych uszkodzeń genetycznych, komórki tracą zdolność

do różnicowania i kontynuują replikację niezależnie od czynników regulujących oraz kontrolujących normalny wzrost komórki. Wady w strukturze kwasu deoksyrybonukleinowego (DNA) pojawiają się w komórkach osób genetycznie predysponowanych do rozwoju nowotworu a wywoływane są przez karcynogeny. Nowotwory zachowują się jak pasożyty, konkurują ze zdrowymi komórkami w walce o tlen i składniki odżywcze, co powoduje wyniszczanie organizmu [7]. Podstawowa różnica pomiędzy komórkami nowotworowymi a zdrowymi to ich niekontrolowany wzrost, inwazyjny charakter oraz zdolność do tworzenia ognisk przerzutowych [8].

Uszkodzenia DNA powodujące powstanie nowotworów mogą dotyczyć czterech klas genów:

- Genów regulatorowych, zwanych też protoonkogenami, obecnych w każdej prawidłowej komórce. Pełnią one ważną rolę w regulacji takich procesów jak wzrost, dojrzewanie i różnicowanie się komórek. Zawierają sekwencje białek (tzw. onkoprotein) uczestniczących w proliferacji komórek [9]. Geny regulatorowe na skutek przebiegającej transformacji nowotworowej (mutacji punktowej, amplifikacji lub translokacji) przekształcają się w onkogeny, które powodują niekontrolowaną proliferację komórek kończącą się rozwojem nowotworu. Onkogeny działają w sposób dominujący, gdyż prowadzą do transformacji komórek pomimo obecności ich prawidłowego odpowiednika [10].
- Genów supresorowych (antyonkogenów), które hamują proliferację komórek lub kontrolują procesy utrzymujące stabilność genetyczną komórki [10]. Są one czasem nazywane recesywnymi onkogenami, gdyż oba allele muszą być uszkodzone, aby zaszła transformacja komórki. Geny supresorowe obejmują dwie podgrupy. Wyróżnia się geny bramkowe, kodujące białka odpowiedzialne za hamowanie cyklu komórkowego oraz geny opiekuńcze, które kontrolują stabilność genetyczną komórki.
- Genów regulujących apoptozę. Apoptoza to zaprogramowana śmierć komórki w organizmie wielokomórkowym, mająca na celu usunięcie zużytych lub zniszczonych komórek. Jest aktywowana przez swoisty sygnał działający w określonym punkcie czasowym. Skierowanie komórki na szlak apoptotyczny jest wynikiem przewagi czynników proapoptotycznych m.in. białek Bcl-xS, BAD (związanego z Bcl-2 promotora śmierci), BAX (związanego z Bcl-2 białka X) nad czynnikami antyapoptotycznymi np. Bcl-2 [10]. Indukcja apoptozy może zachodzić dwukierunkowo. Istotą pierwszej drogi apoptozy jest pośredniczenie w przewodzeniu zewnątrzkomórkowego sygnału do komórki za pomocą receptorów śmierci np. oddziaływanie czynnika martwicy nowotworu (TNF) z receptorem TNF1 czy ligandu Fas (FasL) z receptorem APO-1 (receptorem dla antygeny apoptozy 1). Druga droga apoptozy może zostać zapoczątkowana przez cytostatyki lub radioterapię. Przebiega wtedy niezależnie od pobudzenia receptorów śmierci, z uwolnie-

niem cytochromu C aktywującego kaspazy, które rozpoczynają zaprogramowaną śmierć komórki [11].

- Genów naprawiających DNA

Leczenie chorób nowotworowych polega na zniszczeniu wszystkich stransformowanych komórek lub na zahamowaniu ich wzrostu. W terapii przeciwnowotworowej prowadzi się leczenie skojarzone: operacje chirurgiczne, chemioterapię, immunoterapię, hormono-terapię lub radioterapię. Takie wielokierunkowe leczenie zwiększa szansę na zniszczenie wszystkich komórek nowotworowych i osiągnięcie celu zasady „total cell kill” [8]. Dopiero po osiągnięciu owego efektu terapeutycznego można mówić o pomyślnym wyleczeniu z choroby nowotworowej.

Leczenie onkologiczne jest niezwykle uciążliwe dla chorego a towarzyszące mu bardzo poważne działania uboczne i toksyczne obciążają organizm pacjenta. Często zaawansowanie choroby nowotworowej lub ogólny stan chorego są przeciwwskazaniami do rozpoczęcia terapii onkologicznej. Problemy pojawiające się w czasie onkoterapii wynikają z natury samego guza nowotworowego lub **powstania oporności komórek nowotworowych na stosowane leki**. Ogólny stan chorego, budowa guza i lekooporność limitują skuteczność prowadzonego leczenia.

Ważnym celem chemioterapii jest dostarczenie czynnika przeciwnowotworowego do całej objętości guza. Jednak ze względu na nieprawidłową budowę sieci naczyń krwionośnych zadanie to jest znacznie utrudnione. Naczynia krwionośne w obrębie guza są nieszczelne, charakteryzują się powolnym przepływem krwi zakłócanym dodatkowo przez obecne przewężenia. Sieć naczyń krwionośnych jest niejednorodna, występują w niej obszary gorzej ukrwione, w których otrzymywane stężenie leku jest niższe, zatem mniej skuteczne. Sposobem radzenia sobie z tą właściwością guza jest systematyczne podawanie małych dawek leku. Postępowanie takie polega na niszczeniu komórek leżących w sąsiedztwie naczyń krwionośnych, prowadząc do stopniowej regresji guza i w konsekwencji do całkowitego jego zniszczenia [12]. Nieprawidłowe unaczynienie guza powoduje niedotlenienie komórek, a to z kolei prowadzi do selekcji komórek nowotworowych oraz dodatkowo zmniejsza skuteczność stosowanej chemio- i radioterapii. Podanie pacjentom erytropoetyny zwiększa natlenienie tkanki nowotworowej, redukując te negatywne zjawiska.

Kolejną właściwością guza nowotworowego jest jednorodność ciśnienia śródmiąższowego w całej jego objętości oraz jego niewielki spadek w warstwach najbardziej zewnętrznych. W połączeniu z brakiem prawidłowo działających naczyń limfatycznych przekłada się to na ograniczenie konwekcji w guzie. W efekcie zdolność leku do dyfuzji w masie nowotworowej jest ograniczona. Natomiast różnica ciśnień na granicy guza i środowiska zewnętrznego powoduje wypływ płynu tkankowego na zewnątrz nowotworu, zmniejszając w ten sposób ilość leku obecnego w masie nowotworowej [12]. Obecnie prowadzi się badania nad skutecznością hialuronidazy i kolagenazy w redukcji gęstości macierzy pozakomórkowej celem ułatwienia dyfuzji leków w obrębie mas nowotworowych.

Na skuteczność stosowanych cytostatyków wpływać może również tworzenie się pułapki jonowej. U podłoża tego zjawiska leży zdolność komórek nowotworowych do wypompo-wywania jonów H^+ sprawniej niż czynią to komórki zdrowe. W efekcie wzrasta stężenie protonów w macierzy pozakomórkowej, co może prowadzić do uprotonowania leków i utrudnienia ich dyfuzji do wnętrza komórek. Zapobiega się temu niekorzystnemu zjawisku podając roztwór węgłanu sodu.

2. MECHANIZMY POWSTAWANIA LEKOOPORNOŚCI

Pod pojęciem oporności rozumie się ogół mechanizmów wpływających na obniżenie skuteczności prowadzonej terapii. Często terminu tego używa się w odniesieniu do drobnoustrojów i komórek nowotworowych, które mogą charakteryzować się pewną niewrażliwością na czynniki wcześniej uznane za skuteczne w ich leczeniu. Skuteczność odpowiedzi nowotworu na leczenie zależy w znacznej mierze od wrażliwości transformowanych komórek na stosowaną terapię. Coraz częściej podczas leczenia pojawia się problem lekooporności, który skutecznie ogranicza wybór terapii.

Oporność komórek na leki jest wypadkową kilku mechanizmów. Pierwszy mechanizm związany jest z upośledzeniem kumulacji leku w komórce, a jego ważną składową jest tzw. **efflux**. Jest to mechanizm odpowiedzialny za aktywne wypompowywanie ksenobiotyku poza komórkę przez zlokalizowane w błonie komórkowej białka zależne od adenozy-5'-trifosforanu (ATP-zależne). Ważną rolę w tym procesie odgrywają transportowe białka rodziny ABC posiadające kasetę wiążącą ATP (ATP-binding cassette). Białka te w warunkach fizjologicznych pełnią rolę ochronną, jednak ich nadekspresja prowadzi do obniżenia stężenia cytostatyku w komórce i w efekcie do powstania oporności [12]. Istotną rolę w kumulacji leku w komórce nowotworowej pełni również **influx**. Jest to proces odpowiedzialny za aktywny transport związków do wnętrza komórki przez błonę komórkową za pośrednictwem wyspecjalizowanych białek transportowych. Przykładem takiego białka jest Ctr1 (ang. *copper transporter 1*), które ułatwia transport cisplatyny do komórek [3].

Oporność komórek nowotworowych jest także efektem nasilenia procesów naprawczych uszkodzonego DNA. Transformowane komórki, oprócz naturalnie zwiększonej tolerancji na uszkodzenia w obrębie DNA, posiadają często zwiększoną ilość białek naprawczych, a tym samym charakteryzują się większą niewrażliwością na stosowaną terapię. Ważnymi systemami służącymi do usuwania uszkodzeń w obrębie struktury DNA są NER (ang. *nucleotide excision repair*) i MMR (ang. *mismatch repair*). Oporność komórek wynika ponadto z wadliwego przebiegu szlaku apoptotycznego np. z powodu mutacji białka p53, które jest czynnikiem transkrypcyjnym o zdolnościach aktywujących naprawę DNA oraz inicjujących apoptozę [12].

Zmieniony metabolizm cytostatyków może również prowadzić do rozwoju oporności wśród komórek nowotworowych. Niekiedy stosowany lek jest prolekiem, który dopiero we wnętrzu komórki, pod wpływem obecnych czynników, staje się właściwą substancją czynną. Takim prolekiem jest 5-fluorouracyl, który pod wpływem kilku enzymów przekształcany jest do hamującego syntezę DNA fluorourydyno monofosforanu (FUMP) [13].

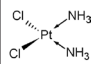
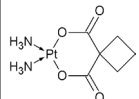
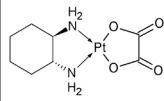
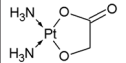
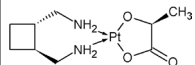
3. KOMPLEKSY PLATYNY JAKO LEKI CYTOSTATYCZNE

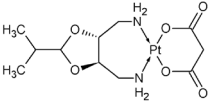

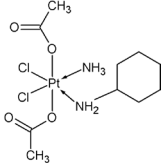
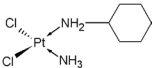
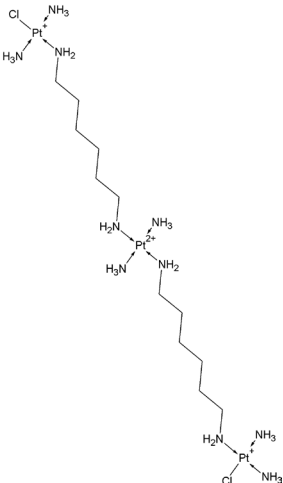
Kompleksy platyny zaliczane są często do cytostatyków alkilujących DNA, mimo że nie tworzą one jonów karbonyowych. Co więcej, cisplatyna podstawowy lek tej grupy, nie posiada żadnej grupy alkilowej, zatem trudno mówić o działaniu alkilującym pochodnych platyny. Jednakże ze względu na tworzenie przez nie wiązań kowalencyjnych z miejscami nukleofilowymi w DNA oraz podobieństwo farmakologiczne do środków alkilujących, określa się pochodne platyny jako leki alkilująco-podobne (ang. *alkylating-like drugs*) [14].

Leki platynowe to związki kompleksowe, w których atomem centralnym jest dwuwartościowy lub czterowartościowy jon platyny. Ligandami mogą być atomy chloru lub reszty kwasów (często dikarboksylowych), występujące przeważnie w położeniu *cis*. Wyjątek stanowią oksaliplatyna i pochodna BBR-3464, które posiadają konfigurację *trans*. Przegląd leków pochodnych platyny ilustruje Tabela 1.

Tabela 1. Związki platyny stosowane w terapii, oraz będące w fazie badań klinicznych [15, 16]

Table 1. Platinum compounds used in the treatment and those undergoing clinical trials [15, 16]

Cisplatyna		Lek zatwierdzony przez FDA w 1978 roku [15, 16]
Karboplatyna		Lek zatwierdzony przez FDA w 1989 roku [15, 16]
Oksaliplatyna		Lek zatwierdzony przez FDA w 2003 roku [15, 16]
Nedaplatyna		Lek zatwierdzony w Japonii w 1995 roku [15, 17]
Lobaplatyna		Lek zatwierdzony w Chinach w 2005 roku [15]

Heptaplatyna		Lek zatwierdzony w Korei Południowej w 1999 roku [15]
Pikoplatyna		Związek w fazie badań klinicznych
Satraplatyna, JM216		Związek w fazie badań klinicznych [18]
JM118		Metabolit satraplatyny [18]
BBR-3464		Związek w fazie badań klinicznych

4. MECHANIZMY OPORNOŚCI NA LEKI PLATYNOWE

Obok toksyczności, najważniejszym czynnikiem utrudniającym skuteczne leczenie nowotworów lekami platynowymi jest problem oporności. Oporność może mieć charakter wrodzony jak ma to miejsce np. w nowotworze okrężnicy czy nerek lub może być nabyta, powstająca dopiero po kontakcie z cytotatykiem, co często spotyka się w nowotworze jajnika [4, 19]. Mechanizmy oporności na leki platynowe zróżnicowane są pod względem farmakokinetycznym. Może występować zjawisko oporności aktywnej, u podłoża której leży nadmiar czynnika wywołującego oporność, czego przykładem są systemy naprawy DNA, pompy effluksu oraz czynniki

antyapoptotyczne [4]. Inny rodzaj to oporność pasywna nasycalna wynikająca z niedoboru czynnika wymaganego do skutecznego działania leku oraz nienasycalna powstająca na skutek zmiany czynnika oporności. [4].

Oporność na leki platynowe jest wypadkową różnych często skomplikowanych mechanizmów. Najlepiej poznane i udokumentowane są mechanizmy klasyczne:

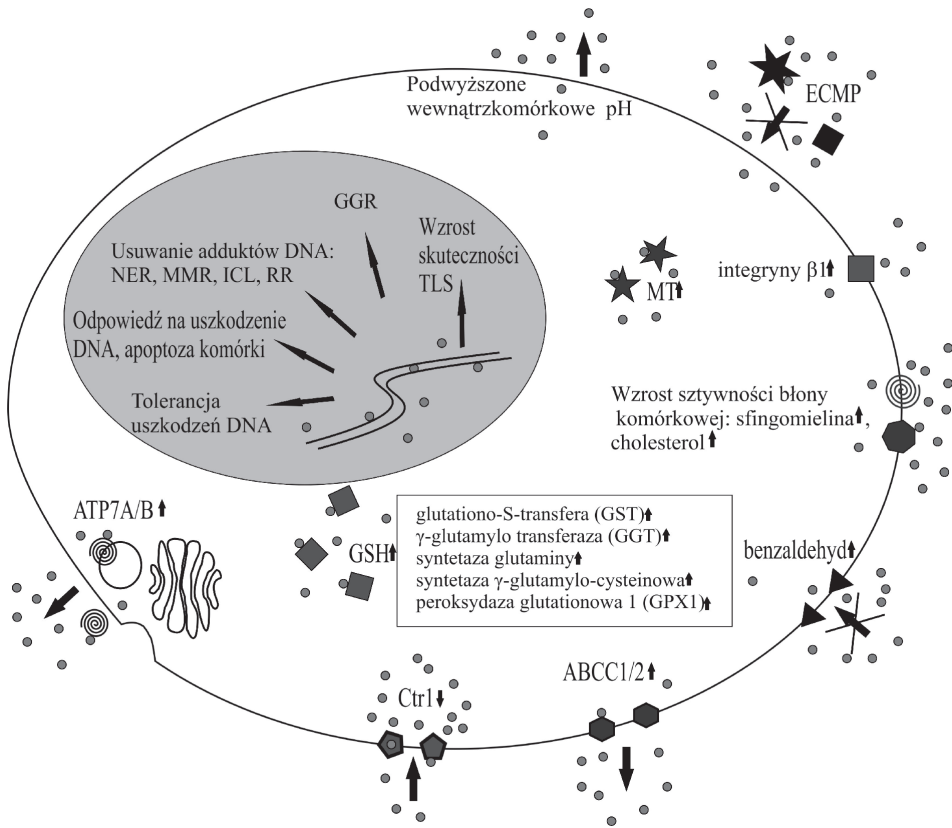
- Ograniczony dostęp cytostatyku do guza nowotworowego.
- Zmniejszona wewnątrzkomórkowa kumulacja leku na skutek utrudnionego transportu do komórki i aktywnego usuwania cytostatyku z komórki.
- Detoksykacja leku.
- Nasilenie procesów naprawczych uszkodzonego DNA.
- Zwiększona tolerancja na uszkodzenia DNA.
- Zakłócenie przebiegu procesu apoptozy.

Bardziej złożone i nie do końca poznane są molekularne mechanizmy oporności, których podstawą są złożone procesy biochemiczne.

Podstawowym mechanizmem obniżającym wrażliwość komórek nowotworowych na leki platynowe jest zmniejszenie wewnątrzkomórkowej kumulacji tych chemioterapeutyków, przedstawione na Rysunku 1. Proces ten polega na obniżeniu influksu, czyli transportu leku do wnętrza komórki np. na skutek degradacji błonowych transporterów miedziowych Ctr1 [3, 19]. Na obniżenie kumulacji leku wpływa także nasilenie procesu aktywnego usuwania tych cytostatyków z wnętrza komórek w procesie zwanym jako effluks. Wzrost aktywności effluksu może wynikać z nadekspresji białek rodziny ABC [12] i transportujących miedź ATP-az typu P [4].

Leki platynowe ulegają też inaktywacji na skutek tworzenia wiązań z obecnymi w cytoplazmie związkami posiadającymi grupy tiolowe np. z glutationem i metalotioneinami [3, 4]. Innym mechanizmem oporności jest nasilenie aktywności systemów naprawczych DNA, a zwłaszcza systemu naprawy przez wycięcie nukleotydu (NER). Istotne są również wzrost tolerancji komórek nowotworowych na uszkodzenia w obrębie genomu czy zmniejszenie wrażliwości nowotworów na apoptozę [19].

Na uwagę zasługują badania wskazujące na to, że istotny wpływ na powstawanie oporności na cisplatynę ma enzym cyklooksigenaza-2. Cyklooksigenaza-2 jest enzymem biorącym udział w procesie otrzymywania z kwasu arachidonowego prostaglandyny H₂, która jest następnie przekształcana w inne prostaglandyny i tromboksan [20]. Ekspresja enzymu COX-2 indukowana jest mitogenezą, cytogenezą, a także towarzyszy stanom zapalnym. W wielu nowotworach np. w nowotworze pęcherza moczowego zaobserwowano podwyższony poziom ekspresji COX-2 [4]. Wysoki poziom tego enzymu prawdopodobnie powoduje wzrost ekspresji innych czynników oporności jak: MRP-1 (białka związanego z opornością wielolekową) czy Bcl-2. Dlatego często łączy się wysoki poziom COX-2 z opornością na związki platynowe.



Rysunek 1. Mechanizmy oporności na cisplatinę [19]

Figure 1. Mechanisms of resistance to cisplatin [19]

● – cisplatina; Ctrl – transporter miedziowy 1; ABCC1/2 – białka związane z opornością wielolekową; GSH – glutation; GGR – całościowa naprawa genomu; MT – metalotioneiny; ECMP – białka macierzy pozakomórkowej; NER – naprawa przez wycięcie nukleotydu; MMR – naprawa niesparowanych zasad; ICL – naprawa między-niciowych połączeń krzyżowych; RR – naprawa rekombinacyjna; TLS – naprawa ponad miejscem uszkodzenia

Poza omówionymi mechanizmami istnieje jeszcze szereg innych procesów mogących utrudniać terapię cisplatiną jak i pozostałymi lekami platynowymi. Należą do nich zmiany ekspresji między innymi następujących genów: *c-Myc*, *c-Fos*, *c-Jun*, *PKC α* , *PP2A*, *PP4*, *SKP2*, *NF- κ B* [4]. W chwili obecnej ilość poznanych genów, których ekspresja zwiększa oporność na związki platynowe sięga dziesiątek [21].

Stwierdzono ponadto, że komórki nowotworowe platynooporne charakteryzują się zniekształceniami chromosomalnymi. Komórki takie mają zmniejszoną długość telomerów, obniżoną aktywność telomeraz i obniżoną ekspresję telomerazy mRNA [4].

5. STRATEGIE POKONYWANIA ZJAWISKA OPORNOŚCI NA LEKI PLATYNOWE

Słaba odpowiedź organizmu oraz rozwój oporności komórek nowotworowych na dostępne procedury terapeutyczne, to czynniki skutecznie ograniczające czas przeżycia chorych. Dlatego od wielu lat prowadzi się szeroko zakrojone badania nad mechanizmami oporności nowotworów na cytostatyki, w tym na leki pochodne platyny. Naukowcy poszukują nowych strategii umożliwiających przełamywanie oporności, zwiększania cytotoksyczności leków i podnoszenia skuteczności leczenia.

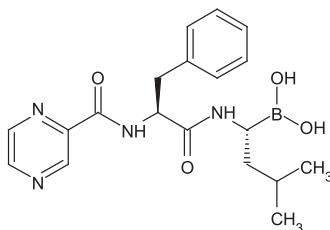
5.1. KOMBINACJE CISPLATYNY Z MODULATORAMI ODGRYWAJĄCYMI GŁÓWNĄ ROLĘ W ROZWOJU OPORNOŚCI

Skuteczną strategią pokonywania wspomnianych mechanizmów oporności na leki platynowe może być wykorzystywanie modulatorów oporności, czyli związków zwiększających wrażliwość komórek nowotworowych na leki platynowe.

Jednym z takich modulatorów oporności jest tilmakoksyb, który jest selektywnym inhibitorem cyklooksygenazy 2. Nadekspresja tego enzymu obserwowana jest w przebiegu stanu zapalnego i rozwoju nowotworu, zwiększa ona m.in. ekspresję białka oporności wielolekowej MDR-1. Białko MDR-1 jest P-glikoproteiną odpowiedzialną za effluks leków platynowych [20]. Stosowanie leczenia skojarzonego, cisplatinę z tilmakoksybem, nasila działanie cytotoksyczne cisplatinę oraz apoptozę opornych na cytostatyki komórek nowotworowych pęcherza moczowego linii komórkowej T24 [22] oraz opornych komórek nowotworu okrężnicy [20]. Zainteresowanie badaczy przyciągają także inne selektywne inhibitory COX-2, m.in. celekoksyb. Jak dotąd nie wykazano jednak, by lek ten poprawiał działanie jednocześnie stosowanych chemioterapeutyków [23].

5.2. ŁĄCZENIE CISPLATYNY Z LEKAMI, KTÓRYCH DZIAŁANIE SKIEROWANE JEST WPROST NA KOMÓRKI NOWOTWOROWE

Inną strategią jest podawanie leków platynowych w terapii skojarzonej wraz z innymi chemioterapeutykami. Takie postępowanie pozwala zwiększyć skuteczność równolegle stosowanych leków, a także pokonać lekooporność. Jednym z leków stosowanych w terapii skojarzonej jest inhibitor proteasomu 26S – **Bortezomib**.



Rysunek 2. Wzór strukturalny bortezomibu [11]
Figure 2. Structural formula of bortezomib [11]

Bortezomib jest lekiem zatwierdzonym do stosowania w szpiczaku mnogim i chłoniaku, ale może okazać się również skuteczny m.in. w nowotworze jajnika [24]. Związek ten działa synergistycznie z cisplatyną. Zapobiega indukowanej cisplatyną degradacji transportera miedziowego Ctr1, co w konsekwencji zwiększa wewnątrzkomórkową kumulację cisplatyny. Ponadto blokuje proteasomy, które biorą udział w degradacji licznych białek komórek nowotworowych jajnika ludzkiego [24]. Bortezomib podawany w leczeniu skojarzonym z gemcytabiną i karboplatyną w niedrobnokomórkowym raku płuc (NSCLC) znacznie zwiększa cytotoksyczność karboplatyny [25].

Standardowym postępowaniem w terapii onkologicznej jest łączenie działania różnych chemioterapeutyków. Jednoczesne podawanie kilku leków w zestawach pozwala zwiększyć skuteczność terapeutyczną oraz przełamać oporność komórek nowotworowych. Nazwy zestawów tworzone są najczęściej od pierwszych liter leków wchodzących w ich skład np. **PAC** (cisplatyna, doksorubicyna, cyklofosfamid), **PVB** (cisplatyna, winblastyna, bleomycyna), **MVP** (mitomycyna, wineorelibina, cisplatyna) [8].

Do czynników przełamujących oporność na leki platynowe należą też przeciwciała monoklonalne oddziaływujące z czynnikami wzrostu, ich receptorami i ligandami. Do grupy przeciwciał skutecznych w chorobach nowotworowych należą: cetuximab, bevacizumab oraz trastuzumab. Cetuximab to przeciwciało monoklonalne, inhibitor naskórkowego czynnika wzrostu (ang. *epidermal growth factor receptor*, EGFR). Stosowanie tego przeciwciała jest jedyną celowaną terapią w nawracającym lub tworzącym przerzuty nowotworze głowy i szyi. Stosowany jest zarówno w połączeniu z chemioterapią jak i w monoterapii. Lek ten podawany jest pacjentom, u których pojawiła się oporność na leki pochodne platyny. Cetuximab podawany chorym łącznie z lekami platynowymi wyraźnie wydłuża czas przeżycia pacjentów [26, 27]. Z kolei bevacizumab to humanizowane, monoklonalne przeciwciało skierowane przeciwko czynnikowi wzrostu śródbłonna naczyniowego (ang. *vascular endothelial growth factor*, VEGF). VEGF jest ważnym regulatorem procesu angiogenezy. Bevacizumab zwiększa skuteczność terapii w połączeniu z gemcytabiną i cisplatyną w niedrobnokomórkowym raku płuc [28].

Trastuzumab to kolejne przeciwciało monoklonalne, które skierowane jest przeciwko zewnątrzkomórkowej domenie drugiego ludzkiego naskórkowego receptora dla czynnika wzrostu (ang. *human epidermal growth factor receptor 2*, HER2). Jest to związek skuteczny w HER2-dodatnim rozsianym raku piersi. Trastuzumab wykazuje synergizm działania z lekami platynowymi. Przeciwciało to utrudnia sygnalizację z udziałem HER2 i tym samym osłabia proces naprawy uszkodzeń DNA wywołanych przez addukty platynowe [29]. Wysoka skuteczność stosowania terapii łączonej cisplatyna-trastuzumab-docetaksel w HER2-dodatnim nowotworze piersi została potwierdzona w badaniach klinicznych [30].

5.3. NOWE LEKI PLATYNOWE

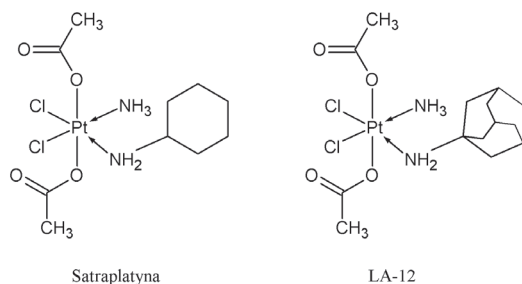
Kompleksy platyny(II) są powszechnie stosowanymi chemioterapeutykami w wielu typach nowotworów. Jednak ze względu na liczne działania toksyczne oraz rozwijające się mechanizmy oporności na tę grupę leków konieczne stało się poszukiwanie nowych rozwiązań terapeutycznych. Jedną z takich strategii jest opracowanie leków pochodnych platyny(IV) – proleków, które w ustroju ulegają redukcji do bardziej aktywnych pochodnych platyny(II) [5]. Innym skutecznym rozwiązaniem mogą okazać się wielojądrowe kompleksy platyny tworzące z DNA addukty o odmiennej strukturze od tych tworzonych przez analogi cisplatyny.

5.3.1. Związki platyny(IV)

Kompleksy platyny(IV) posiadają oktaedryczną symetrię oraz dwa dodatkowe ligandy w stosunku do płasko-kwadratowych kompleksów platyny(II). W konsekwencji, kompleksy o takiej strukturze charakteryzują się większą inercją wewnętrzną i mniejszą reaktywnością. Tym samym, rzadziej podlegają pobocznym reakcjom i interakcjom z czynnikami oporności. Związki platyny(IV) są prolekami, które w organizmie ulegają redukcji uwalniając związki platyny(II) i ligandy osiowe (ang. *axial ligands*) [5]. Projektowanie kompleksów platyny(IV) stwarza możliwości otrzymywania związków o lepszych parametrach farmako-kinetycznych takich jak lipofilność. Pozwala to redukować działania niepożądane, zwiększać selektywność, ponadto ligandy osiowe po odłączeniu mogą wywierać dodatkowe działanie np. cytotoksyczne. Niestety, pomimo licznych zalet, kompleksy platyny(IV) posiadają też wady, a mianowicie znacznie wolniej ulegają wychwytowi do komórki niż związki platyny(II) [5]. Ciekawą właściwością związków platyny(IV) jest ich aktywność nawet w warunkach hipoksji. Tę specyficzną właściwość można wykorzystać w onkologii do leczenia nowotworów beznaczyniowych. Obecnie najlepiej poznanym związkiem platyny(IV) jest satraplatyna (JM216). Satraplatyna została zaprojektowana jako doustny lek o właściwościach lipofilnych. Charakteryzuje się szybkim wychwytem komórkowym, co prowadzi do zwiększenia kumulacji che-

mioterapeutyku w komórkach opornych [5]. Satraplatyna powoduje zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G_2/M . W porównaniu do oksaliplatyny charakteryzuje się większą aktywnością oraz osiągnięciem czterokrotnie wyższego stężenia komórkowego. [6].

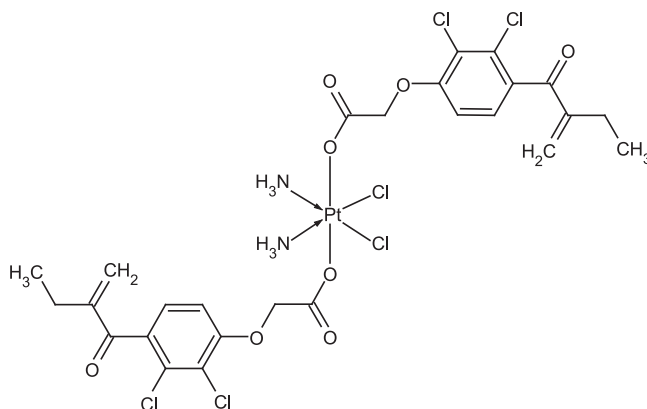
Lekiem nowej generacji jest również pochodna platyny(IV) o nazwie LA-12 i budowie zbliżonej do satraplatyny [31]. Lek ten jest silnie lipofilowy i w badaniach *in vitro* nie daje oporności krzyżowej z cisplatyną [5].



Rysunek 3. Wzory strukturalne kompleksów platyny(IV): satraplatyny i LA-12 [31]

Figure 3. Structural formula of platinum(IV) complexes: satraplatin and LA-12 [31]

Projektując związki kompleksowe platyny(IV) jako ligandy osiowe wprowadza się związki o właściwościach modulujących oporność. Jednym z takich leków pochodnych platyny(IV) jest etakraplatyna (ang. *ethacraplatin*). Ligandami osiowymi tego związku są zdeprotonowane cząsteczki kwasu etakrynowego. Kwas etakrynowy jest inhibitorem glutationo-S-transferazy (GST). Zahamowanie aktywności GST ogranicza inaktywację cytostatyku, ponieważ nie dochodzi do łączenia z glutationem. Ze względu na tę właściwość oraz zwiększoną lipofilność, etakraplatyna wywiera działanie cytotoksyczne w niższym stężeniu niż cis platyna [5].



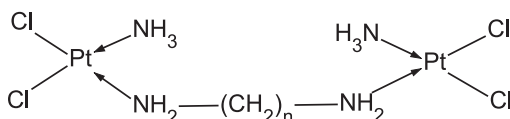
Rysunek 4. Wzór strukturalny etakraplatyny [5]

Figure 4. Structural formula of ethacraplatin [5]

Innymi ligandami osiowymi, które umożliwiają przełamywanie oporności na związki platyny są ligandy estradiolo-3-benzoesowe. Ligandy te mogą być skuteczne wobec komórek nowotworowych piersi o nadekspresji receptorów estrogenowych. Powstałe podczas redukcji wewnątrzkomórkowej ligandy estradiolo-3-benzoesowe zwiększają ekspresję białka HMGB1 (białka dużej mobilności, B1). Białka HMGB1 osłaniają addukty DNA przed systemem naprawy NER. Konsekwencją takiej nieskutecznej naprawy jest indukcja apoptozy [5].

5.3.2. Wielojądrowe kompleksy platyny

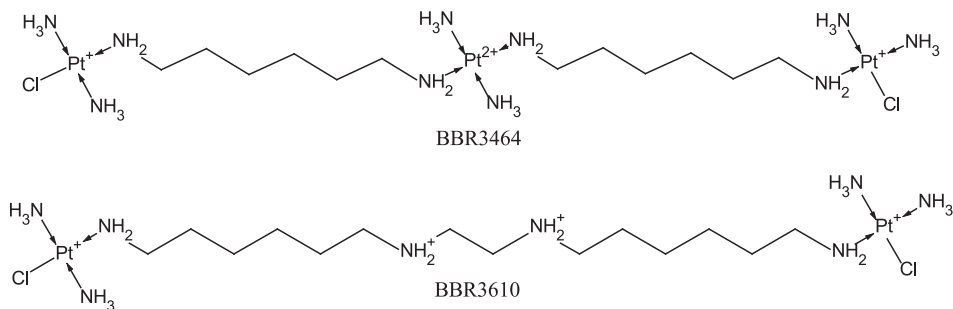
Kompleksy tej grupy to związki o konfiguracji *trans*, posiadające dwa lub więcej atomów platyny. Atomy te łącząc się kowalencyjnie z DNA tworzą addukty o odmiennej strukturze od tych tworzonych przez analogi cisplatyny [32]. Badania nad tą grupą związków rozpoczęły się od połączenia dwóch pochodnych cisplatyny łańcuchem diaminowym. Następnie wprowadzano stopniowe zamiany ligandów na takie, które zapewniały lepszą rozpuszczalność związków w wodzie oraz większą cytotoksyczność. Niektóre z nich częściej niż cisplatyna tworzą addukty międzyciowe [33].



Rysunek 5. Wzór strukturalny dwujądrowych kompleksów platyny [32]

Figure 5. Structural formula of bis(platinum) complexes [32]

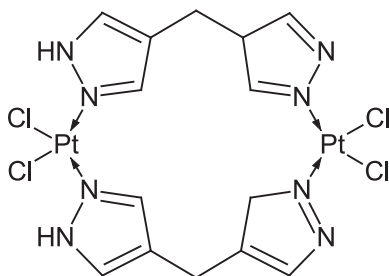
Nowością podczas projektowania trójjądrowych kompleksów (np. BBR3464), a także dwujądrowych kompleksów połączonych ligandami poliaminowymi (np. BBR3610), jest możliwość wprowadzenia do nich ładunku i zdolność tworzenia przez te związki wiązań wodorowych.



Rysunek 6. Wzór strukturalny BBR3464 i BBR3610 [34]

Figure 6. Structural formula of BBR3464 and BBR3610 [34]

W wielojądrowych związkach centralne atomy platyny oraz grupy aminowe ligandów poliaminowych odpowiadają za tworzenie wiązań wodorowych z atomami tlenu guaniny lub tyminy, zasad azotowych kwasu DNA [32]. Związki te charakteryzują się też dobrą rozpuszczalnością w wodzie. Na aktywność wielordzeniowych kompleksów platyny mają wpływ parametry takie jak: zdolność do tworzenia wiązań wodorowych, długość, elastyczność, ładunek łańcucha łączącego atomy platyny, a także położenie tego łańcucha względem ligandu chlorkowego. Jak wynika z badań najodpowiedniejszą długością łańcucha łączącego jest sześć grup metylenowych i dwie aminowe. Taka struktura tłumaczy dłaczezo związek BBR3464 jest aktywniejszy od związków o krótszych oraz dłuższych łańcuchach węglowych. Natomiast związki o poliaminowych ligandach zyskują na aktywności wraz z wydłużaniem łańcucha węglowego [32]. Dowiedziono, że łączenie atomów platyny elastycznymi ligandami alifatycznymi daje lepsze efekty niż stosowanie aromatycznych ligandów jak np. bis(pirazolilo)metanowych. Dzieje się tak dlatego, że usztywnienie cząsteczek zmniejsza ich aktywność [32]. Ponadto wykazano, że związki o konfiguracji *trans* ligandów chlorkowych względem łańcucha węglowego charakteryzują się silniejszym działaniem cytotoksycznym w porównaniu do izomerów *cis* [35].



Rysunek 7. Przykład kompleksu wielordzeniowego platyny o ligandach bis(pirazolilo)metanowych [32]
Figure 7. Example of a multi-nuclear platinum complex containing dipirazolylmethane ligands [32]

5.4. NOWE POSTACIE LEKU

Ze względu na krótką retencję cisplatyny w nowotworze, dużą toksyczność oraz rozwój oporności, zaczęto poszukiwania nowych sposobów zwiększenia skuteczności leczenia związkami platyny. Jednym z takich rozwiązań było opracowanie odpowiedniej postaci leku, która będzie skutecznie dostarczać chemioterapeutyk do komórek nowotworowych.

5.4.1. Enkapsulacja

Enkapsulacja to metoda polegająca na zamknięciu środka leczniczego wewnątrz osłonki lub warstwy lipidowej, co powinno zwiększyć transport cytostatyków do

wnętrza stransformowanych komórek. Najczęściej przeprowadza się enkapsulację cisplatyny wewnątrz sfer zbudowanych z fosfatydylocholino (PC), fosfatydyloetanolaminy (PE) i cholesterolu (CH) [36]. Istotnym problemem napotykanym podczas projektowania takich postaci leku jest zamykanie małych ilości leku we wnętrzu sfer. Badania dowodzą, że możliwe jest upakowanie cisplatyny w liposomach z PE z wielokrotnie większą wydajnością niż w liposomach z PC. Za taki stan odpowiada chelatacja akwakompleksów cisplatyny z wolnymi parami elektronowymi dwuwarstwowej fosfolipidowej w PE. Zjawisko to nie zachodzi w liposomach zbudowanych z PC. Karboplatyna nie tworzy akwakompleksów, stąd jej stopień wiązania wewnątrz liposomów z PE jest niższy [36]. Enkapsulowana cisplatyna dostaje się do wnętrza komórki głównie na zasadzie endocytozy, ale częściowo też przez bezpośrednią fuzję liposomów PE.

Przewagą liposomów, nad tradycyjnie podanym lekiem, jest ich dłuższe pozostawanie w masie nowotworowej. Ważnym parametrem odpowiedzialnym za tę właściwość jest wielkość liposomów, których średnica powinna wynosić około 100 nm. Tak zbudowana postać leku, po wstrzyknięciu do nowotworu, dostaje się w sieć włókien w śródmięzszu nowotworowym i nie potrafi wydostać się do przestrzeni naczyniowej. Enkapsulowana cisplatyna jest wyraźnie skuteczniejsza niż podana tradycyjnie, ponieważ pozostaje dłużej w masie nowotworowej. Rozwój nowych, skuteczniejszych postaci leku może zwiększyć wewnątrzkomórkową kumulację cytostatyku oraz umożliwić przewyżczenie oporności wobec cisplatyny. Inkorporowanie pochodnych polietylenoglikolu do liposomów PE z cisplatyną dodatkowo zwiększa działanie cytotoksyczne cisplatyny [36]. Liposomy PE zawierające cisplatynę są aktywne wobec wielu nowotworów m.in. komórek czerniaka. Komórki te są niezwykle odporne na chemio- i radioterapię, ponadto charakteryzują się słabą odpowiedzią na tradycyjne leczenie.

Leki, pochodne platyny, mogą być też enkapsulowane w demineralizowanej ferrytynie np. apoferrytynie (AFt). Metoda ta jest interesująca, gdyż w komórkach nowotworowych zaobserwowano obecność miejsc wiążących ferrytynę oraz endocytozę ferrytyny. Stwarza to szanse na terapię celowaną wobec komórek stransformowanych o nadekspresji receptorów dla ferrytyny. Ponadto enkapsulowana w AFt cisplatyna charakteryzuje się wyraźnie wyższym wychwytem do komórki niż sama cisplatyna. Natomiast enkapsulowane formy karboplatyny i oksaliplatyny w AFt, podawane w tych samych stężeniach, wykazują znacznie mniejszą cytotoksyczność w porównaniu do enkapsulowanej w AFt cisplatyny [37].

5.4.2. Nanorurki

Ciekawym systemem dostarczającym leki platynowe do wnętrza komórek nowotworowych są nanorurki. Ta nowa postać leku daje wielkie nadzieje na pokonanie oporności na grupę leków platynowych. Jednym z rodzajów tej postaci leku są rozpuszczalne, jednowarstwowe nanorurki węglowe pokryte z zewnątrz związkami

platyny. Jednowarstwowe nanorurki węglowe (ang. *single walled carbon nanotubes*, SWCNTs) dostarczają małe cząsteczki związków platyny(IV) do komórek na zasadzie zależnej od klateryn endocytozy. Rozpuszczalne SWCNTs pokryte są z zewnątrz kompleksami platyny(IV) związanymi z ich ścianą za pomocą ligandów osiowych. Podczas endocytozy, SWCNTs zostają zamknięte we wnętrzu endosomów. Niska wartość pH endosomu ułatwia redukcję związków platyny(IV) i utratę ligandów osiowych, następuje wówczas uwolnienie kompleksów platyny(II). Zastosowanie SWCNTs w transporcie leków platynowych, pozwala osiągnąć nawet sześć razy wyższe stężenie tych chemioterapeutyków wewnątrz komórek nowotworowych, niż obserwowane po tradycyjnym podaniu leku [38].

Inną strategią terapeutyczną, jest zamykanie leków platynowych we wnętrzu wielowarstwowych nanorurek węglowych (ang. *multiwalled carbon nanotubes*, MWCNTs). Zastosowanie wielowarstwowych nanorurek węglowych MWCNTs pozwala umieścić w ich wnętrzu mniejszą ilość substancji niż w nanorurkach jednowarstwowych, ale jednocześnie więcej związku ulega uwolnieniu. Odpowiedzialne za to są interakcje cisplatyny z SWCNTs, które z jednej strony zwiększają upakowanie cytostatyku na powierzchni nanorurki, ale zmniejszają też ilość niezwiązanego, uwolnionego chemioterapeutyku. Wpływ leku z MWCNTs jest zależny od czasu i ma miejsce pomiędzy 12–48 godziną po wprowadzeniu do ustroju, a wydajność takiego procesu to około 95% [39].

6. INFЕКЦJA WIRUSAMI ONKOLITYCZNYMI

Jedną z najnowszych strategii pokonywania mechanizmów lekooporności jest metoda polegająca na infekcji komórek nowotworowych za pomocą wirusów onkolitycznych.

Wirus onkolityczny to taki typ wirusa, który selektywnie infekuje i lizuje tylko komórki nowotworowe nie naruszając tym samym komórek prawidłowych.

Jednym z nich jest szczurzy parwowirus H-1 (H-1PV). Dowiedziono, że H-1PV jest skuteczny wobec niewrażliwych na cisplatynę komórek glejaka opornych na zewnątrzkomórkowy i wewnątrzkomórkowy szlak apoptozy [40]. H-1PV jest również skuteczny wobec komórek białaczki monoblastycznej linii U937 występującej u ludzi, kilku linii komórek nowotworowych wątroby, stransformowanych keratynocytów i komórek nowotworowych piersi [40]. Szczurzy parwowirus H-1 zabija komórki glejaka przez nieapoptotyczny, nie do końca jeszcze poznany, mechanizm z użyciem katepsyn. Infekcja wirusowa permeabilizuje (zwiększa przepuszczalność) błony lizosomu (ang. *lysosomal membrane permeabilization*, LMP). Następuje uwolnienie lizosomalnych enzymów, a zwłaszcza katepsyn, do cytozolu. Jak dowiedziono, aby nastąpiła śmierć komórki tym szlakiem musi dojść nie tylko do kumulacji katepsyn w cytozolu na skutek LMP, ale również do zmniejszenia stężenia ich inhibitorów np. cystatyn. Oporność glejaków na liczne czynniki wywołujące LMP wynika właśnie z nadekspresji cystatyn. Są one jednak wrażliwe na infekcję H-1PV,

gdyż wirus ten nie tylko podwyższa stężenia katepsyn w cytozolu, ale także obniża stężenia cystatyny B i C [40]. Ponadto infekcja parwowirusem charakteryzuje się selektywnością wobec komórek stransformowanych i jest znacznie mniej szkodliwa wobec zdrowych komórek gleju, astrocytów. Uważa się, że ta onkospecyficzność wynika z niższego stężenia katepsyny B, braku obniżonej ekspresji cystatyny B oraz obniżenia zdolności do namnażania się H-1PV w ich wnętrzu. Infekcja wysokoopornych komórek nowotworowych z wykorzystanym H-1PV może być skuteczną metodą aktywacji szlaku lizosomalno-katepsynowego i indukcji śmierci komórek niezależnie od wrażliwości na inne terapie lecznicze.

UWAGI KOŃCOWE

Leki platynowe należą do jednych z najczęściej stosowanych chemioterapeutyków w terapii nowotworów. Najdłużej i najczęściej stosowanym lekiem tej grupy jest cisplatyna. Jednakże ze względu na dużą toksyczność wobec zdrowych komórek oraz rozwój licznych mechanizmów oporności w komórkach nowotworowych, możliwości stosowania tego leku w onkoterapii są ograniczone. Pewnym sukcesem w pokonywaniu tych problemów, było wprowadzenie do leczenia drugiej generacji leków platynowych: karboplatyny i oksaliplatyny. Skutecznym lekiem jest zwłaszcza oksaliplatyna, która nie podlega wielu mechanizmom oporności. Aktualnie prowadzone są intensywne badania kompleksów platyny(IV), które posiadają lepsze parametry farmakokinetyczne takie jak lipofilność, co pozwoliło zredukować niektóre działania niepożądane oraz zwiększyć selektywność. Niestety minusem stosowania kompleksów platyny(IV) jest znacznie wolniejszy wychwyty do komórki w porównaniu do związków platyny(II).

Pomimo swoich wad cisplatyna, dzięki dużej cytotoxyczności, jest skuteczna w leczeniu dużej grupy nowotworów złośliwych. Dlatego szereg badań koncentruje się na opracowaniu metod dostarczania jej do wnętrza komórek nowotworowych. Obejmują one wykorzystanie nanorurek węglowych oraz enkapsulację w liposomach lub w transferrynie. Takie rozwiązania pozwalają na wielokrotne podwyższenie stężenia leku wewnątrz komórki w porównaniu do podania tradycyjnego. Natomiast wykorzystanie wirusów onkolitycznych np. H-1PV może dawać szansę na selektywne niszczenie komórek nowotworowych.

Dotychczas opracowano szereg różnych strategii przełamывania mechanizmów oporności na leki platynowe, ale tylko nieliczne z nich są wykorzystywane w leczeniu nowotworów, a te stosowane nie zawsze przynoszą zadowalające efekty terapeutyczne. Dlatego potrzebne są dalsze badania i opracowania nowych, skutecznych strategii terapeutycznych przeciw opornym komórkom nowotworowym.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] Główny Urząd Statystyczny Departament Badań Demograficznych. Podstawowe informacje o rozwoju demograficznym Polski w latach 2000–2010, Materiał na konferencję prasową w dniu 28 stycznia 2011 r.
- [2] B. Rosenberg, L. Van Camp, T. Krigas, *Nature*, 1965, **205**, 698.
- [3] C.A. Rabik, M.E. Dolan, *Cancer Treat. Rev.*, 2007, **33**, 9.
- [4] D.J. Stewart, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 2007, **63**(1), 12.
- [5] M.D. Hall, H.R. Mellor, R. Callaghan, T.W. Hambley, *J. Med. Chem.*, 2007, **50**(15), 3403.
- [6] M. Kalimutho, A. Minutolo, S. Grelli, A. Formosa, G. Sancesario, A. Valentini, G. Federici, S. Bernardini, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 2011, **67**, 1299.
- [7] V. Kumar, R.S. Cotran, S.L. Robbins, *Robins Patologia*, Wyd. I polskie (red.: W.T. Olszewski), Urban i Partner, Wrocław, 2005, s. 186.
- [8] W. Janiec, *Farmakodynamika. Podręcznik dla Studentów Farmacji*, Wyd. I, PZWL, Warszawa, 2008, Tom 2, s. 989.
- [9] A. Kułakowski, A. Skowrońska-Gardas, *Onkologia podręcznik dla studentów medycyny*, Wyd. I, PZWL, Warszawa, 2003, s. 28.
- [10] R. Kordka, *Onkologia podręcznik dla studentów i lekarzy*, Wyd. I, Via Medica, Gdańsk, 2007, s. 8.
- [11] E. Mutschler, *Farmakologia i toksykologia*, Wyd. II polskie, red. W. Buczek, MedPharm Polska, 2010, s. 945.
- [12] I. Mitrus, S. Szala, *Nowotwory*, 2009, **59**, 5, 368.
- [13] D.B. Longley, D.P. Harkin, P.G. Johnston, *Nat. Rev. Cancer*, 2003, **3**, 330.
- [14] L.L. Brunton, J.S. Lazo, K.L. Parker, *Farmakologia*, Tom II, Goodman & Gilman, Wyd. I polskie, red. T.F. Krzemiński, Czelej, Lublin, 2007, s. 1428.
- [15] T. Boulikas, A. Pantos, E. Bellis, P. Christofis, *Cancer Ther*, 2007, **5**, 537.
- [16] N.J. Wheate, S. Walker, G.E. Craig, R. Oun, *Dalton Trans.*, 2010, **21**, **39**(35), 8113.
- [17] K. Ito, S. Adachi, Y. Itani, M. Koyama, K. Hori, R. Chin, M. Shintani, K. Beppu, S. Kawai, K. Sait, *Jpn. J. Clin. Oncol.*, 1999, **29**(6), 299.
- [18] P. Heffeter, U. Jungwirth, M. Jakupc, C. Hartinger, M. Galanski, L. Elbling, M. Micksche, B. Keppler, W. Berge, *Drug Resist. Updat.*, 2008, **11**, 1.
- [19] B. Koberle, M.T. Tomicic, S. Usanova, B. Kaina, *Biochim. Biophys. Acta*, 2010, **1806**, 172.
- [20] Y. Saikawa, T. Sugiura, F. Toriumi, T. Kubota, K. Suganuma, S. Isshiki, Y. Otani, K. Kumai, M. Kitajima, *Anticancer Res.*, 2004, **24**, 2723.
- [21] D. Roberts, J. Schick, S. Conway, S. Biade, P.B. Laub, J.P. Stevenson, T.C. Hamilton, P.J. O'Dwyer, S.W. Johnson, *Br. J. Cancer*, 2005, **92**, 1149.
- [22] Y. Mizutani, H. Nakanishi, Y.N. Li, N. Sato, A. Kawauchi, T. Miki, *J. Urol.*, 2004, **172**, 1474.
- [23] B.F. El-Rayes, M.M. Zalupski, A.F. Shields, A.M. Ferris, U. Vaishampayan, L.K. Heilbrun, R. Venkatramanamoorthy, V. Adsay, P.A. Philip, *Invest New Drugs*, 2005, **23**, 583.
- [24] D.D. Jandial, S. Farshchi-Heydari, C.A. Larson, G.I. Elliott, W.J. Wrasidlo, S.B. Howell, *Clin. Cancer Res.*, 2009, **15**, 553.
- [25] A.M. Davies, K. Chansky, P.N. Lara, P.H. Gumerlock, J. Crowley, K.S. Albain, S.J. Vogel, D.R. Gandara, *J Thorac Oncol*, 2009, **4**(1), 87.
- [26] K.A.R. Price, E.E. Cohen, *Curr Treat Options Oncol*, 2012, **13**, 35.
- [27] J.B. Vermorken, R. Mesia, F. Rivera, E. Remenar, A. Kawecki, S. Rottey, J. Erfan, D. Zabolotnyy, H.-R. Kienzer, D. Cupissol, F. Peyrade, M. Benasso, I. Vynnychenko, D. De Raucourt, C. Boke-meyer, A. Schueler, N. Amellal, R. Hitt, *N. Engl. J. Med.*, 2008, **359**, 1116.
- [28] M. Reck, J. Von Pawel, P. Zatloukal, R. Ramlau, V. Gorbounova, V. Hirsh, N. Leighl, J. Mezger, V. Archer, N. Moore, C. Manegold, *J. Clin. Oncol.*, 2009, **27**(8), 1227.

- [29] M.D. Pegram, T. Pienkowski, D.W. Northfelt, W. Eiermann, R. Patel, P. Fumoleau, E. Quan, J. Crown, D. Toppmeyer, M. Smylie, A. Riva, S. Blitz, M.F. Press, D. Reese, M.-A. Lindsay, D.J. Slamon, *J. Natl. Cancer Inst.*, 2004, **96**(10), 759.
- [30] J. Hurley, P. Doliny, I. Reis, O. Silva, C. Gomez-Fernandez, P. Velez, G. Pauletti, J.E. Powell, M.D. Pegram, D.J. Slamon, *J. Clin. Oncol.*, 2006, **24**(12), 1831.
- [31] V. Kvardova, R. Hrstka, D. Walerych, P. Muller, E. Matoulkova, V. Hruskova, D. Stelcova, P. Sova, B. Vojtesek, *Mol. Cancer*, 2010, **9**, 147.
- [32] N.J. Wheate, J.G. Collins, *Coord Chem Rev*, 2003, **241**(1-2), 133.
- [33] N. Farrell, Y. Qu, L. Feng, B. Van Houten, *Biochemistry*, 1990, **29**(41), 9522.
- [34] C. Mitchell, P. Kabolizadeh, J. Ryan, J.D. Roberts, A. Yacoub, D.T. Curiel, P.B. Fisher, M.P. Hagan, N.P. Farrell, S. Grant, P. Dent, *Mol. Pharmacol.*, 2007, **72**(3), 704.
- [35] C. Manzotti, G. Pratesi, E. Menta, R. Di Domenico, E. Cavalletti, H.H. Fiebig, L.R. Kelland, N. Farrell, D. Polizzi, R. Supino, G. Pezzoni, F. Zunino, *Clin. Cancer Res.*, 2000, **6**, 2626.
- [36] T.L. Hwang, W.R. Lee, S.C. Hua, J.-Y. Fang, *J. Dermatol. Sci.*, 2007, **46**, 11.
- [37] R. Xing, X. Wang, C. Zhang, Y. Zhang, Q. Wang, Z. Yang, Z. Guo, *J. Inorg. Biochem.*, 2009, **103**, 1039.
- [38] R.P. Feazell, N. Nakayama-Ratchford, H. Dai, S.J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 8438.
- [39] C. Tripisciano, S. Costa, R.J. Kalenczuk, E. Borowiak-Palen, *Eur Phys J B*, 2010, **75**, 141.
- [40] M. Di Piazza, C. Mader, K. Geletneky, M. Herrero Y Calle, E. Weber, J. Schlehofer, L. Deleu, J. Rommelaere, *J. Virol.*, 2007, **81**(8), 4186.

Praca wpłynęła do Redakcji 27 sierpnia 2013

**WPŁYW WARUNKÓW PARZENIA NA ZAWARTOŚĆ
ANTYOKSYDANTÓW W NAPARACH RÓŻNYCH
RODZAJÓW HERBAT**

INFLUENCE OF BREWING CONDITIONS ON
ANTIOXIDANT CONTENT IN DIFFERENT KINDS OF
TEA INFUSIONS

**Kamil Kurleto*, Grzegorz Kurowski,
Barbara Laskowska, Magdalena Malinowska,
Elżbieta Sikora, Otmar Vogt**

*Wydział Inżynierii i Technologii Chemicznej, Politechnika Krakowska
ul. Warszawska 24, 31-155 Kraków
e-mail: kurleto@chemia.pk.edu.pl

Abstract

Wykaz stosowanych skrótów

Wstęp

1. Herbaty niefermentowane

2. Herbaty półfermentowane

3. Herbaty fermentowane

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane

mgr inż. Kamil Kurleto w roku 2012 ukończył studia na Wydziale Inżynierii i Technologii Chemicznej Politechniki Krakowskiej, na kierunku Technologia Chemiczna o specjalności Lekka Technologia Organiczna. Obecnie jest słuchaczem Studiów Doktoranckich na Wydziale WliTCh PK.

mgr inż. Grzegorz Kurowski absolwent Wydziału Inżynierii i Technologii Chemicznej Politechniki Krakowskiej, obecnie rozpoczął studia doktoranckie na Wydziale Inżynierii i Technologii Chemicznej Politechniki Krakowskiej. Prowadzi badania w zakresie syntezy nowoczesnych, przyjaznych środowisku preparatów do usuwania powłok lakierniczych.

dr Barbara Laskowska jest absolwentką Wydziału Chemii na Uniwersytecie Jagiellońskim. Stopień doktora uzyskała na Politechnice Krakowskiej w Zakładzie Chemii Fizycznej Wydziału Inżynierii i Technologii Chemicznej (2007), gdzie aktualnie pracuje. Zainteresowania naukowe dr B. Laskowskiej dotyczą badań związanych z zagadnieniami elektrochemicznymi.

mgr inż. Magdalena Malinowska – jest absolwentką Wydziału Inżynierii i Technologii Chemicznej Politechniki Krakowskiej (2008). Obecnie jest doktorantką w Instytucie Chemii i Technologii Organicznej. Jej praca badawcza dotyczy zastosowania związków pochodzenia naturalnego w produktach kosmetycznych.

dr inż. Elżbieta Sikora ukończyła studia i doktoryzowała się na Wydziale Inżynierii i Technologii Chemicznej Politechniki Krakowskiej. Jest adiunktem w Katedrze Technologii Organicznej i Procesów Rafineryjnych. Zainteresowania naukowe dr inż. E. Sikory dotyczą technologii organicznej małowartościowej, obejmują zagadnienia związane z pozyskiwaniem, badaniem właściwości oraz zastosowaniem surowców pochodzenia naturalnego w produktach kosmetycznych i produktach chemii gospodarczej.

dr inż. Otmar Vogt absolwent Wydziału Inżynierii i Technologii Chemicznej Politechniki Krakowskiej, doktoryzował się na Wydziale Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego. Jest adiunktem w Zakładzie Technologii Organicznej i Procesów Rafineryjnych PK. Prowadzi prace badawcze z zakresu katalizy, proekologicznych technologii oraz zastosowania substancji pochodzenia naturalnego w kosmetykach i środkach ochrony roślin.

ABSTRACT

Tea has been consumed all over the World for over two thousand years and now it is the most popular caffeine-containing beverage. Its worldwide consumption is second only to water [1–3]. The tea is not only important because of its popularity but also due to its beneficial influence on human health [4]. The biological benefits of tea are due to their flavanol content [5–13]. Tea flavanols are a group of natural polyphenols (Fig. 2). Therapeutic effects of tea have been extensively examined in many in vitro and in vivo tests. It was confirmed that tea leaves ingredients have antibacterial, antifungal, antiviral properties, they also prevent cell mutations and they inhibit progress of heart diseases. Moreover, tea can stimulate neural system and regulate its functions [14–20]. All this activities are mostly due to antioxidant ability of tea polyphenols (Fig. 4).

Tea production process can be run in different ways and this affects of the tea taste, aroma, colour and antioxidants content. According to fermentation degree, different tea kinds can be obtained (Fig. 1). During the manufacturing process of black and oolong teas, tea leaves are crushed to allow polyphenol oxidase to catalyze the oxidation and polymerization of catechins to polymers called theaflavins and thearubigins (Fig. 3) [21–23]. Green or white teas are obtained through shorter fermentation, so the catechin concentration remains higher. Tea is prepared by infusing tea leaves in hot water. Brewing process conditions like temperature, brewing time, pH, besides other factors has a significant influence on polyphenols content [24–32]. Many studies have determined total flavonoids content and antioxidant activity according to different tea type and brewing conditions, tea plantation type or fermentation process. The amount of total polyphenol was determined using the F-C method, catechins, caffeine and polyphenolic acids were analysed using High Performance Liquid Chromatography with reversed phase. Obtained results let compare how different production and brewing processes affect the tea quality [33–56].

Keywords: tea, antioxidants, total antioxidant capacity

Słowa kluczowe: herbaty, antyoksydanty, całkowita aktywność antyoksydacyjna

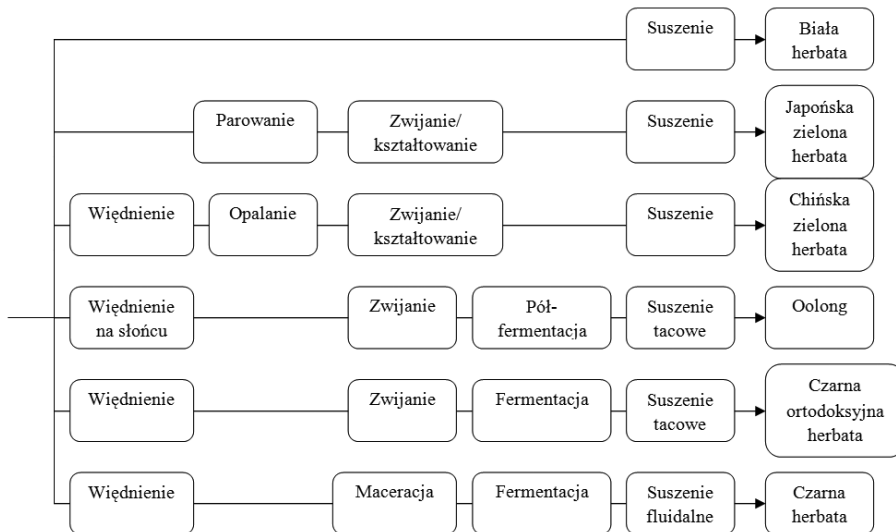
WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

ABTS	- 2,2'-azynobis(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonian)
C	- katechina
CG	- galokatechina
DMPD	- dichlorowodorek dimetylo- <i>p</i> -fenylenodiaminy
DPPH	- 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl
EC	- epikatechin
ECG	- galusan epikatechiny
EGC	- epigalokatechina
EGCG	- galusan epigalokatechiny
F-C	- Folin-Ciocalteu
FRAP	- ang. <i>ferric ion reducing antioxidant parameter</i>
GA	- kwas galusowy
GC	- galusan katechiny
ORAC	- ang. <i>Oxygen Radical Absorbance Capacity</i>
TB	- teabrominy
TF	- teaflawiny
TR	- tearubigniny

WSTĘP

Herbata to aromatyczny napar, powszechnie przygotowywany poprzez zalewanie gorącą lub wrzącą wodą liści i pąków krzewu herbacianego (*Camellia sinensis*). Nie wiadomo, kiedy tak naprawdę zaczęto spożywać napar herbaciany. Według chińskich legend herbata była już spożywana od III wieku p.n.e., jednak pierwsze pisemne wzmianki o herbacie można znaleźć w tzw. „Księdze Chou Huna”, datowanej na 770 rok p.n.e. Początkowo napar herbaciany przygotowywany z liści dziko rosnących drzew i krzewów, był stosowany jako lek oraz środek wzmacniający i poprawiający samopoczucie. Wraz z opracowaniem metod pozyskiwania i obróbki liści *C. sinensis*, herbata zyskała na popularności jako napój i coraz częściej traktowano ją jako uzupełnienie codziennego jadłospisu. Obecnie napar herbaciany jest drugim, zaraz po wodzie, najczęściej spożywanym napojem na świecie [1, 2].

Klasyfikację herbat można prowadzić na wiele sposobów i według różnych kryteriów, np. ze względu na kształt liści lub terminu ich zbiorów. Dogodnym kryterium mogą być również różnice w przebiegu poszczególnych etapów produkcji liści *C. sinensis*, które pozwoliły na otrzymanie różnych rodzajów herbat (Rys. 1). W naszym obszarze geograficznym, najczęściej stosowanym kryterium podziału herbat, jest ich stopień fermentacji. Uwzględniając ten podział, wyróżnia się herbaty: niefermentowane (*Sencha, Pai Mu Tan*), półfermentowane (*Oolong*) oraz całkowicie fermentowane (*Yunnan Gold, Pu-erh*) [1, 3].

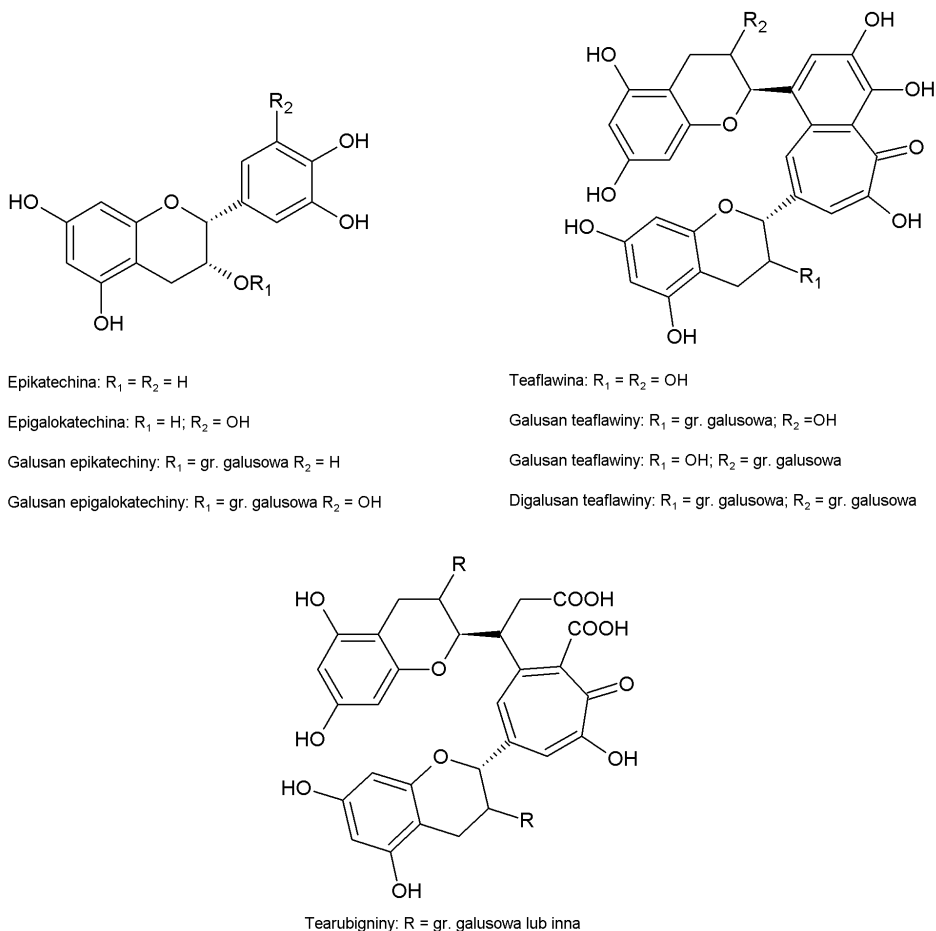


Rysunek 1. Główne etapy produkcji różnych gatunków herbaty

Figure 1. The main stages of the different kinds of tea production

Powszechnie wiadomo, że spożywanie herbaty przynosi wiele korzyści zdrowotnych. Aby określić przyczyny tego zjawiska, bardzo dużo uwagi poświęcono

badaniom aktywności antyoksydacyjnej substancji aktywnych *C. sinensis* oraz roli, jaką odgrywają napary herbaciane w prewencji różnych chorób [4]. Dotychczasowe badania potwierdzają antyoksydacyjne działanie składników herbat, za które w głównej mierze odpowiedzialne są katechiny. Są to związki naturalnie występujące w liściach *C. sinensis*, należące do grupy polifenoli (Rys. 2) [5].



Rysunek 2. Struktury katechin i ich pochodnych występujących w liściach herbaty
Figure 2. Structures of catechines and their derivatives present in tea leaves

Katechiny nadają herbacie gorzkawy i cierpki smak. Jest on szczególnie wyraźnie wyczuwalny w herbacie zielonej. Dłuższy proces fermentacji, z którym mamy do czynienia podczas produkcji czarnej herbaty wpływa znacząco na obniżenie zawartości katechin (Tab. 1). Zanika również gorzkawy smak zielonej herbaty, na korzyść intensywnego aromatu herbaty czarnej. W procesie fermentacji herbat, kluczowa jest obecność oksydazy polifenolowej, enzymu odpowiedzialnego za proces oksydacji prowadzącej do epimeryzacji katechin. W wyniku tego

procesu powstają bardziej złożone cząsteczki polifenolowe: teaflawiny i tearubigniny odpowiedzialne za barwę, smak i aromat czarnej herbaty. Innymi związkami z grupy polifenoli, znajdującymi się w liściach herbaty – choć w znacznie mniejszej ilości – są kwasy fenolowe (kwas galusowy i cynamonowy) oraz estry kwasu chinowego [6–9].

Tabela 1. Zawartość katechin (%) w herbatach o różnym stopniu fermentacji [10]

Table 1. Catechins contents (%) in tea with different fermentation degree [10]

Herbata	EGC	C	EC	EGCG	ECG	Całkowita zawartość katechin
niefermentowana (zielona)	13.5	0.5	4.0	20.1	7.9	46.0
półfermentowana (oolong)	17.8	1.2	3.2	19.1	5.8	47.1
całkowicie fermentowana (czarna)	1.7	0.3	2.2	1.3	0.7	6.2

Badania aktywności antyoksydacyjnej herbat jednoznacznie wskazują, że aktywność teaflawin i katechin jest porównywalna. Zawarty w czarnej herbacie 3-3-*O*-digalusan teaflawiny wykazuje podobną aktywność antyoksydacyjną jak galusan epigalokatechiny wchodzący w skład ekstraktu z zielonej herbaty [11, 12]. Porównanie licznych wyników badań wskazuje, że najwyższą aktywność antyoksydacyjną wykazuje herbata zielona [13]. Z drugiej strony, nie brakuje prac wykazujących, że to czarna herbata jest najbardziej wartościowym naparem ze względu na zawartość flawonoidów [14]. Oczywiście więc wnioskiem, który nasuwa się podczas interpretacji uzyskanych wyników badań jest fakt, że ich obiektywna ocena wymaga wzięcia pod uwagę wielu dodatkowych czynników, mających istotny wpływ na właściwości poszczególnych rodzajów herbat.

Działanie terapeutyczne związków aktywnych zawartych w liściach herbaty nie ogranicza się jedynie do neutralizacji wolnych rodników, powodujących niekorzystne procesy utleniania. Związki te wykazują też działanie przeciwbakteryjne, przeciwwgrzybiczne i przeciwwirusowe [15], spowalniają rozwój wielu chorób układu sercowo-naczyniowego [16], hamują rozwój komórek nowotworowych [17–19], pobudzają organizm wpływając dodatnio na wydzielanie neuroprzekaźników [20], mogą też działać uspokajająco na układ nerwowy, przy czym działanie to silnie zależy od czasu i warunków parzenia liści herbaty [21].

1. HERBATY NIEFERMENTOWANE

Przedstawicielami tej grupy są herbaty zielone i białe. Herbatę zieloną, uzyskuje się ze świeżo zebranych liści, które następnie są poddawane natychmiastowemu suszeniu, by zapobiec procesom fermentacji. Dzięki temu herbata zielona obfituje w katechiny, które nadają jej cierpki, orzeźwiający smak.

Do produkcji herbaty białej używa się tylko zebranych ręcznie, wczesną wiosną, jeszcze nierozwiniętych listków i pączków krzewu *C. sinensis*. Następnie pozwala się

im lekko zwiędnąć na słońcu (aby uzyskać łagodniejszy smak, niż w przypadku herbaty zielonej) i dopiero w takiej formie poddaje się je procesowi suszenia. Uważa się, że herbaty zielone i białe zawierają najwięcej spośród wszystkich gatunków herbat, związków z grupy polifenoli, dzięki czemu ich aktywność antyoksydacyjna jest najwyższa. W obliczu tych danych nie jest niczym zaskakującym, że to właśnie herbaty niefermentowane stały się tematem najintensywniejszych badań, mających na celu określenie czynników wpływających na aktywność antyoksydacyjną tego rodzaju naparów herbacianych [1].

Oprócz porównania bezwzględnej zawartości substancji aktywnych, w badaniach herbat istotne jest również opracowanie metody umożliwiającej określenie rzeczywistego stężenia tych substancji przedostających się do organizmu człowieka.

Jednym z ważniejszych zagadnień, które powinno się rozpatrzyć podczas prac z materiałem roślinnym, jest dobór odpowiedniej metody analitycznej. El-Shahawi i in. [22] w swojej pracy oznaczyli stężenie katechin w naparach 29 odmian zielonej herbaty, pochodzącej z różnych regionów uprawnych (Chiny, Japonia, Indonezja, Sri Lanka i Tajwan). Roztwory przygotowywano poprzez parzenie 0,25–0,26 grama liści herbaty w 100 ml wody przez 5 min w temperaturze 90°C. Analizę zawartości katechin wykonywano metodą HPLC z detektorem UV. Badania wykazały, że technika chromatografii cieczowej, ze względu na dużą czułość i dokładność stanowi precyzyjne narzędzie, które może służyć do określania składu próbek herbaty [22].

Wiele prac dotyczy określenia wpływu warunków parzenia herbaty na stężenie poszczególnych związków biologicznie czynnych. Tematykę tę podjął m.in. Labbé i in. [23]. W swoich badaniach oznaczali oni wpływ temperatury i czasu parzenia na stężenie katechin i kofeiny w naparach herbacianych. Materiał badawczy stanowiła japońska zielona herbata. Próbkę o masie 20 g ekstrahowano 1 dm³ wody destylowanej. Napary przygotowywano dla pięciu różnych temperatur parzenia: 50, 60, 70, 80 oraz 90°C. Wpływ czasu parzenia oznaczano po upływie: 5, 10, 20, 40 i 80 minut. Stężenie katechin i kofeiny oznaczano metodą HPLC stosując technikę odwróconych faz i detektor UV. Uzyskane wyniki pozwoliły podzielić oznaczane związki na dwie grupy: związki, których stężenie w ekstrakcie zależy od czasu parzenia (EGC, EC) oraz związki, których stężenie zależy od czasu i temperatury parzenia (C, EGCG, GCG, ECG). Według autorów [23] najkorzystniejsza temperatura, pozwalająca na ekstrakcję EGC i EC, wynosi 50°C przy czasie parzenia 20–40 minut. Natomiast w przypadku EGCG, GCG i ECG, najefektywniejsza temperatura i czas parzenia wynoszą odpowiednio 90°C i 80 minut. Stwierdzono, że najwięcej kofeiny zawierały ekstrakty parzone w temperaturze 70–80°C przez 20–40 minut. Laurent i in. [24] również oznaczali stężenie katechin w naparach japońskiej zielonej herbaty. Przeprowadzili badania dotyczące wpływu drugiego parzenia na zawartość katechin w naparze. Pierwszy napar przygotowano poprzez 10-minutową ekstrakcję 20 gramów herbaty, 1 dm³ wody destylowanej w temperaturze 50°C. Następnie liście poddawano drugiemu parzeniu. Napar przygotowano

poprzez powtórnią ekstrakcję liści w 1 dm³ wody destylowanej o temperaturze 80°C przez kolejne 10 minut. Stężenie katechin i kofeiny badano metodą HPLC z odwróconym układem faz, stosując detektor UV. Dwuetapowy proces parzenia herbaty wykorzystujący różnicę w optymalnych temperaturach ekstrakcji dwóch głównych katechin (EGC, EGCG) pozwolił otrzymać ekstrakt o niższej zawartości popiołów i zwiększoną zawartość katechiny ECG w ekstrakcie po drugim stopniu parzenia [24]. Draženka i in. [25] prowadzili badania mające na celu określenie wpływu warunków parzenia (temperatury, czasu oraz ilości parzeń) na zawartość związków fenolowych i metyloksantyn w herbatach zielonych. Określili wpływ warunków ekstrakcji i czasu przechowywania gotowych ekstraktów na zdolność antyoksydacyjną zielonej herbaty. Porównali również zawartość substancji bioaktywnych dla różnych postaci herbat dostępnych w handlu (herbata sproszkowana, torebkowa oraz liściasta). Do badań wybrano w sumie jedenaście herbat zielonych w postaci sproszkowanej (*Matcha*), liściastej (*Gyokuro*, *Sencha*, *Bancha*, *Kukicha*, *Longjing*, *Yunnan*, *Sencha* i *Gunpowder*) oraz torebkowej (*Twinings of London* i *Franck*). Napary przygotowywano poprzez zalanie 2 g herbaty 200 ml wody destylowanej o temperaturze: 60, 80 i 100°C, przez 3 minuty. Identyczne próbki były parzone przez: 3, 5, 10, 15, 30 minut w temperaturze 80°C. Do oznaczenia całkowitego stężenia związków polifenolowych zastosowano metodę Folina–Ciocalteu (F–C), natomiast do określenia zawartości flawonoidów metodę wytrącania z formaldehydem. Pomiaru całkowitej zdolności antyoksydacyjnej herbat dokonano metodą redukcji roztworu wolnego rodnika DPPH oraz metodą FRAP. Zawartość substancji aktywnych oznaczono metodą HPLC. Badania wykazały znaczne różnice między składem chemicznym herbat dostępnych w handlu w Europie. Stwierdzono, że zawartość substancji aktywnych silnie zależy od warunków ekstrakcji, przy czym największe stężenie związków aktywnych w badanych naparach występuje, gdy ekstrakcja prowadzona jest w temperaturze 80°C przez 5 minut dla herbat sproszkowanych, 15 minut dla herbat torebkowych oraz 30 minut dla herbat liściastych [25].

Venditti i in. [26] określili w swoich badaniach jak zmienia się zdolność antyoksydacyjna różnych herbat, w zależności od zastosowania zimnej lub ciepłej wody do sporządzenia naparu. Do badań wybrano herbaty: czarną (*Lapsang Souchong*), białą (*Pai Mu Tan*), zieloną (*Special Gunpowder*) i *oolong* (z prowincji Fujian). Ekstrakty z zimną wodą wykonano ekstrahując 0,5 g herbaty 50 ml wody mineralnej o temperaturze otoczenia przez 2 godziny. Ekstrakt z ciepłą wodą wykonano ekstrahując 0,5 g herbaty 50 ml za pomocą wody mineralnej, o temperaturze 90°C przez 7 minut. Całkowite stężenie fenoli oznaczano metodą F–C. Ponadto w badaniach przeprowadzono trzy dodatkowe testy: FRAP, ABTS i DMPD. Badania wykazały, że nie ma istotnej różnicy między całkowitym stężeniem fenoli w ekstraktach otrzymanych zimną i ciepłą wodą. Jednak większe stężenie fenoli dla herbaty białej w zimnej wodzie może sugerować, że związki fenolowe unikalne dla herbaty białej są rozkładane lub ulegają przekształceniu w podwyższonej temperaturze, co wpływa na spadek ich stężenia [26].

Quan i in. w swoich badaniach zajęli się określeniem wpływu pH wody na stężenie katechin w naparach herbacianych. Materiał roślinny stanowiła odmiana *Shan* zielonej herbaty (*C. sinensis* odmiana *pubilimba*). 5 gramów liści herbaty parzono przez 30 minut w 100 ml wody destylowanej o temperaturze 80°C. Do sporządzenia naparów użyto wody o pH z zakresu od 1 do 9. W pierwszym eksperymencie monitorowano zmiany pH podczas parzenia, natomiast w drugim podczas parzenia utrzymywano pH na stałym poziomie, dodając odpowiednio kwasu lub zasady. Stężenie katechin oznaczano metodą HPLC z odwróconym układem faz. Badania wykazały, że pH roztworu istotnie wpływa na zawartość katechin w naparze. Większe stężenie otrzymuje się w środowisku kwaśnym, niż neutralnym lub zasadowym. Dla uzyskania maksymalnej zawartości katechin, napar zielonej herbaty powinien być przygotowany w wodzie, której pH wynosi od 3 do 5,3 [27].

Perva-Uzunalić i in. [28] badali wpływ rodzaju rozpuszczalnika użytego do ekstrakcji (woda, aceton, metanol, etanol, acetonitryl i ich wodne roztwory o stężeniu 25, 50, 80%) na zawartość katechin w ekstraktach liści zielonej herbaty. Ekstrakcję prowadzono w temperaturze wrzenia danego rozpuszczalnika przez 2 godziny. Ekstrakcje wodne prowadzono w temperaturach: 60, 80 i 95°C przy czasie ekstrakcji od 1 do 120 minut. Analizę próbek prowadzono metodą HPLC. Wykazano, że w zależności od zastosowanych warunków ekstrakcji możliwe jest otrzymanie od 270 do 650 g katechin na 1 kg herbaty. Jednocześnie autorzy stwierdzili, że w odniesieniu do czasu i temperatury ekstrakcji, aby uzyskać dużą zawartość katechin należy użyć wysokiej temperatury (95°C) i krótkiego czasu ekstrakcji (5–10 minut) lub stosując niższe temperatury (60 lub 80°C) należy wydłużyć czas ekstrakcji do 20 minut. Najwyższą zawartość katechin otrzymano stosując, jako rozpuszczalnik, 80% roztwór acetonu [28]. Rusak i in. [29] w swojej pracy oznaczali zawartość związków fenolowych w herbacie zielonej (*Long Jing*) i białej (*Pai Mu Tan Superior*). Zastosowali różne warunki parzenia, rozpuszczalniki oraz postacie liści herbacianych (torebkowa i liściasta). Poszczególne próbki o masie 2 g parzono w temperaturze 80°C. Jako rozpuszczalniki zastosowano po 200 ml: wody destylowanej, wody destylowanej z świeżo wyciśniętym sokiem cytrynowym oraz 10, 40 i 70% wodne roztwory etanolu. Czasy parzenia, po których dokonywano pomiarów wynosiły odpowiednio: 5, 15 i 30 minut. Całkowite stężenie fenoli oznaczono metodą F–C, do oznaczenia stężenia flawonoidów zastosowano metodę wytrącania z formaldehydem. Ponadto oznaczono aktywność antyoksydacyjną metodą FRAP. Jakościowe oznaczenie związków fenolowych wykonano metodą HPLC z detektorem UV/Vis. Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono, że zielona herbata jest bogatszym źródłem związków polifenolowych niż herbata biała. Ponadto wykazano, że ekstrakcja związków fenolowych z herbaty liściastej przebiega wolniej w przypadku herbaty białej niż w przypadku herbaty zielonej, jednak można ją przyspieszyć poprzez dodanie soku z cytryny. Badania wykazały również, iż 40% wodny roztwór etanolu jest najbardziej efektywnym rozpuszczalnikiem do ekstrakcji związków fenolowych z herbat, oraz że w przypadku herbaty zielonej bardziej efektywna jest ekstrakcja herbaty liściastej niż herbaty z torebek [29].

Carloni i in. [30] badali jak na zdolność antyoksydacyjną danego gatunku herbaty, uprawianego i zbieranego w tych samych warunkach, wpływa różny stopień fermentacji (herbata czarna, zielona i biała). W badaniach 0,5 g herbaty parzono w 20 ml wody, o temperaturze 90°C, przez 7 minut. Całkowite stężenie fenoli oznaczano metodą F-C, natomiast zawartość flawonoidów oznaczano testem kolorymetrycznym wg metody [30]. Całkowite stężenie teaflawin określano za pomocą metody Flavognost. Analizę związków fenolowych i kofeiny przeprowadzono metodą HPLC. W badaniach użyto również testy ABTS, ORAC oraz FRAP. Wykazano, iż proces produkcji herbaty wpływa w istotny sposób na zdolności antyoksydacyjne herbat oraz że największe stężenie katechin, a co za tym idzie największą zdolność antyoksydacyjną wykazuje herbata zielona, następnie biała, a najniższą herbata czarna [30].

Wang i in. [32] w swojej pracy badali epimeryzację katechin ekstrahowanych z zielonej herbaty w różnych temperaturach w wodzie oczyszczonej i wodociągowej. Badali oni chińską zieloną herbatę (Gunpowder). Próbkę zawierającą 1 g liści parzono w 100 ml wrzącej destylowanej lub wodociągowej wody przez 5 min. Ochłodzone próbki termostatowano następnie w temperaturach 20, 40, 80 oraz 100°C przez 20 minut. Stężenie katechin oznaczano przy użyciu wysokosprawnej chromatografii cieczowej z odwróconym układem faz, z detektorem UV. Badania wykazały, że epimeryzacja poszczególnych katechin zachodzi w wysokiej temperaturze oraz zachodzi łatwiej w wodzie wodociągowej niż w wodzie oczyszczonej. Ponadto stwierdzono, że możliwa jest również epimeryzacja katechin w zimnej wodzie podczas długotrwałego procesu ekstrakcji [32].

Zhang i in. [33] oznaczali zdolność antyoksydacyjną różnych herbat, wskazując związki o największej aktywności antyoksydacyjnej. Do badań wybrano sześć typów herbat zielonych, cztery typy herbat białych oraz sześć typów herbat Oolong. 0,1 g sproszkowanej herbaty parzono w 10 ml wody, w temperaturze 100°C przez 10 min. Napary badano metodą HPLC z detektorem DAD oraz określano aktywność antyoksydacyjną za pomocą odczynnika DPPH. Ponadto, w celu wskazania związków wykazujących najwyższą aktywność antyoksydacyjną użyto połączonego testu HPLC-DAD-DPPH. Metoda ta polega na rozdzieleniu związków wchodzących w skład próbki metodą chromatografii cieczowej, następnie wprowadzeniu ich do drugiego chromatografu, gdzie do kolumny dodawany jest roztwór DPPH. Badania wykazały, że na całkowitą aktywność antyoksydacyjną największy wpływ mają katechiny, w szczególności EGCG, oraz że stężenie tych związków spada podczas fermentacji liści herbaty, co przyczynia się do zmniejszenia ich zdolności antyoksydacyjnych [33].

2. HERBATY PÓLFERMENTOWANE

Najpopularniejszym przedstawicielem herbat półfermentowanych jest oolong. W trakcie obróbki, liście nie są poddawane całkowitej fermentacji, lecz jest ona

zatrzymana na pewnym etapie. Liście krzewu *C. sinensis* używane do produkcji herbat oolong zbierane są w ściśle określonym czasie. Zaraz po zbiorach pozostawia się je na słońcu by zwiędły, a następnie poddaje się je wytrząsaniu. Po kilkukrotnym powtórzeniu na przemian etapów wędnięcia i wytrząsania, liście poddawane są fermentacji. Wartość stopnia fermentacji zmienia się w zależności od regionu uprawy herbat oolong, np. w Tajlandii stopień fermentacji liści sięga nawet 60%. Liście herbat oolong mogą dojrzewać nawet 60 lat. Tak długi czas leżakowania zapewnia otrzymanie najwyższej jakości naparów, a także ich wyjątkowego smaku i aromatu [1]. Herbaty oolong często określane są jako ogniwo znajdujące się pomiędzy herbatami zielonymi i czarnymi. Poprawność tej hipotezy postanowili sprawdzić Benzie i Szeto [34]. W swojej pracy zdecydowali się określić aktywność antyoksydacyjną świeżo sporządzonych naparów 27 różnych rodzajów herbat (9 czarnych, 5 typu oolong, 13 zielonych) metodą FRAP i F-C. Napary były przygotowywane poprzez zalanie 5 g liści danej herbaty, 100 ml wrzącej wody destylowanej. Ponadto zbadano również stabilność substancji biologicznie aktywnych w przygotowanych naparach herbacianych – próbki ekstraktów pozostawiono na 48 godzin, w temperaturze 4°C. Analizę przeprowadzono metodą HPLC z elucją gradientową. Wyniki badań jednoznacznie potwierdziły, że spośród badanych próbek, najwyższą aktywnością antyoksydacyjną charakteryzują się herbaty zielone, a najniższą czarne. Herbaty oolong, które miały pełnić rolę pośrednią między czarnymi, a zielonymi herbatami, wykazywały aktywność antyoksydacyjną zbliżoną do herbat czarnych. Ponadto nie zaobserwowano istotnych różnic w wynikach analiz wraz z upływem czasu przechowywania ekstraktów (48 godzin), co pozwoliło stwierdzić, że antyoksydanty znajdujące się w naparach herbacianych są stabilne w niskiej temperaturze. Kolejną kwestią było ustalenie składu chemicznego ekstraktów, określenie, które ze związków fenolowych występują w największym stężeniu i w jakim stopniu odpowiadają za ich moc antyoksydacyjną. Pracy tej podjęli się Zuo, Chen i Deng [4], którzy za pomocą wysokosprawnej chromatografii cienkowsarstwowej z detektorem fotodiodowym, oznaczali w próbkach stężenie katechin, kwasów polifenolowych i kofeiny. Do badań wybrano 4 herbaty zielone (*Meifoo green*, *Shanghai green*, *Lung Ching* i Jaśminową), dwa typu oolong (*Fujian oolong* i *Jiangxi*), jedną czarną (*Fujian black*) i jedną pu-erh. Odważono 1,9–3,8 g danej próbki, i po rozdrobnieniu przeprowadzono pięciokrotną ekstrakcję. Wykazano, że czterema głównymi katechinami w badanych próbkach są EGCG, ECG, EGC i EC. Kwas galusowy jest kwasem polifenolowym występującym w największym stężeniu w analizowanych herbatkach. Ponadto wszystkie badane herbaty zawierały wysokie stężenia kofeiny. Stężenie katechin było największe w przypadku herbat zielonych, a dla herbaty czarnej i pu-erh bardzo niskie. Było to spodziewanym rezultatem, ze względu na proces fermentacji, zachodzący przy obróbce liści herbacianych w produkcji tych herbat. Największe stężenie kwasu galusowego zawarte było w ekstraktach herbaty czarnej i pu-erh, najmniejsze w herbatkach zielonych. Analiza zawartości katechin i kwasu galusowego w herbatkach oolong pozwala stwierdzić, iż faktycznie są one ogniwem

między herbatami niefermentowanymi, a poddanymi całkowitej fermentacji. Stężenie katechin jest niższe, niż dla herbat zielonych, jednak jest ono znacznie wyższe (w przypadku EGC średnio trzykrotnie, w przypadku EGCG średnio siedmiokrotnie) niż dla herbaty czarnej i pu-erh. Analizując wyniki badań, widoczne jest, że stężenie kwasu galusowego w poszczególnych herbatkach, rośnie wraz ze stopniem fermentacji. Również w tym przypadku widać, że oolong'i zajmują miejsce pomiędzy herbatami całkowicie sfermentowanymi, a niefermentowanymi.

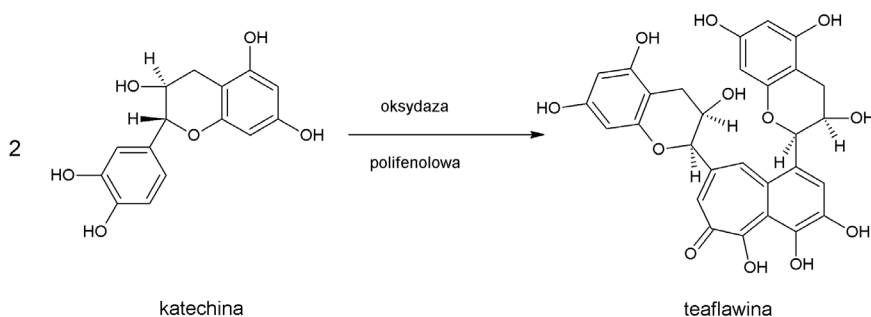
Warunki uprawy *C. sinensis* są istotne dla składu chemicznego herbat. Potwierdziły to badania Chen i in. [35], którzy w swojej pracy badali wpływ wysokości, na której prowadzono uprawę oraz czasu zbiorów na zawartość katechin w liściach herbaty. Materiał badawczy stanowiła bardzo popularna w Chinach odmiana oolong, *Huang Zhi Xiang*, która przygotowana była z liści, zebranych z reprezentatywnej grupy krzewów herbacianych uprawianych na wysokości 350 i 500 m n.p.m. Zbiory na obu wysokościach prowadzono wiosną i jesienią. Napary sporządzono poprzez zalanie 2 g herbaty wodą destylowaną o temperaturze 90°C i przez 10 minut mieszano je na mieszadle magnetycznym. Z tak sporządzonych ekstraktów pobierano próbki, które analizowano za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej. Wyniki badań wykazały, że całkowita zawartość katechin jest znacząco większa w naparze oolong, którego liście pochodziły z partii uprawianej na wysokości 500 m n.p.m. Porównując napary sporządzone z liści zebranych wiosną i jesienią zauważono, że TC jest wyższa dla herbaty, ze zbiorów wiosennych. Jednak zmianę tą zaobserwowano tylko dla herbaty, której krzewy uprawiane były w niższej partii. W przypadku krzewów uprawianych na wyższej wysokości nie zaobserwowano znaczącej zmiany TC w naparach sporządzonych z liści zbieranych w różnych sezonach.

3. HERBATY FERMENTOWANE

Czarna herbata, jest najpopularniejszym i najczęściej spożywanym rodzajem herbat ze względu na intensywny smak i charakterystyczny aromat powstający podczas złożonego procesu fermentacji i przygotowania liści herbacianych. Charakterystyczne dla czarnej herbaty teaflawiny i tearubiginy, odpowiedzialne za jej barwę i smak, powstają podczas dłuższego, niż w przypadku pozostałych rodzajów herbat, procesu fermentacji [36]. Jakość czarnej herbaty, a co za tym idzie zawartość związków biologicznie czynnych w naparze herbacianym, jest ściśle uzależniona nie tylko od konkretnego gatunku drzewa herbacianego, ale również od miejsca i sposobu zbioru, procesu produkcji, a także warunków parzenia liści. Wszystkie te czynniki wpływają decydująco na zawartość związków wykazujących aktywność biologicznie czynną [37–39].

Warunki parzenia stanowią czynnik istotnie wpływający na zawartość poszczególnych związków wykazujących korzystne działanie zdrowotne, szczególnie tych o charakterze antyoksydantów [40]. Khokhar i in. [14] badając wpływ temperatury procesu parzenia na zawartość katechin w naparze z czarnej herbaty wnioskują,

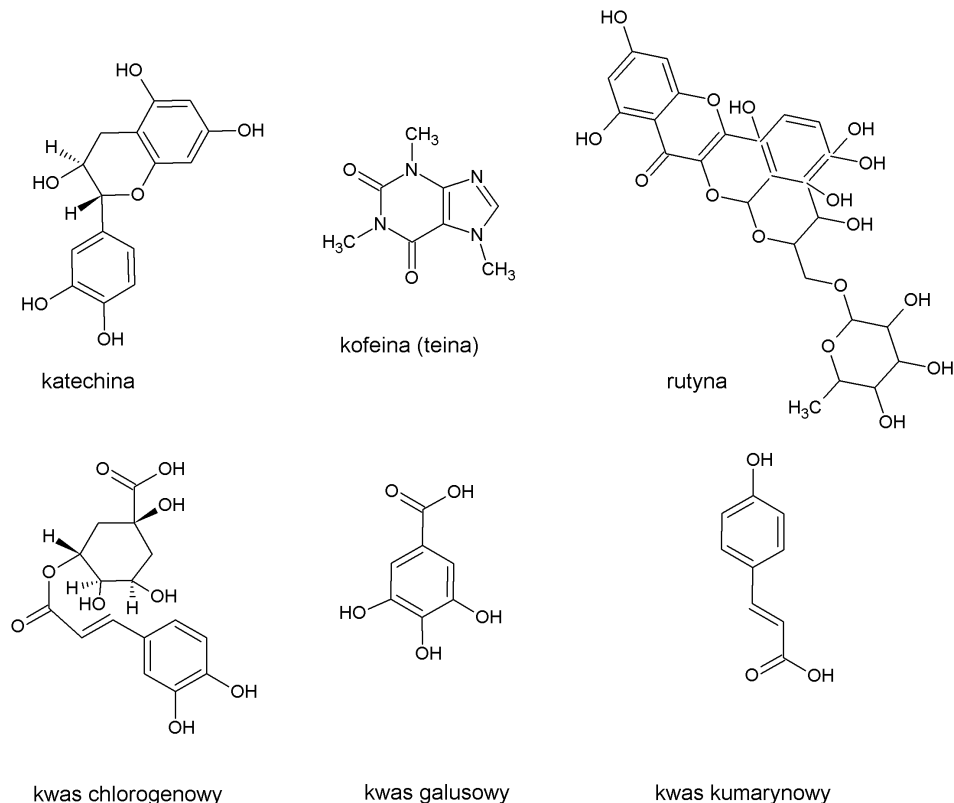
że największa ilość tych związków przechodzi do roztworu w temperaturze 80°C, natomiast im wyższa temperatura, tym częściej katechiny ulegają procesowi epimeryzacji. Badania te potwierdził Chen i wsp. [41] wykazując że wzrost temperatury powoduje degradację nie tylko katechin, ale również teaflawin, przy równoczesnym wzroście zawartości kofeiny, kwasu galusowego i epikatechiny [41]. Prace innych badaczy nad wpływem temperatury na zawartość poszczególnych antyutleniaczy również wykazały, że wysoka temperatura parzenia sprzyja ekstrakcji katechin, kofeiny oraz kwasu galusowego (Rys. 3), jednak zawartość tych związków maleje wraz z czasem parzenia. Potwierdza to teorię zespołów Khokhar'a i Chena że wzrost temperatury powoduje epimeryzację katechin (Rys. 3). Venditti i in. w swoich badaniach dowiedli, że w przypadku ekstrakcji wodą w temperaturze pokojowej, związkami o największym stężeniu są epigalokatechiny [42].



Rysunek 3. Schemat epimeryzacji katechin do teaflawin
 Figure 3. Catechins to theaflavins epimerization scheme

Wyższa temperatura parzenia sprzyja ekstrakcji kofeiny, której znaczne stężenia występują we wszystkich rodzajach herbat, od zielonej do czarnej. Wpływ temperatury parzenia na zawartość kofeiny badali Suteerapataranon i in. [43]. W tym celu 1g herbaty parzono w 100 ml wody o temperaturze: 80, 90 i 100°C. Zawartość kofeiny mierzono metodą spektrofotometrii UV/VIS. Dodatkowo określano, jak zmienia się zawartość kofeiny w naparze w zależności od czasu parzenia. Stwierdzono, że stężenie tego związku wzrasta gwałtownie począwszy od 0,5 minuty do 15 minut ekstrakcji, aby ustalić się na stałym poziomie po czasie 60 minut [43]. Wpływ czasu parzenia na zawartość związków fenolowych badał Ramalho i in. [44]. Badano osiem rodzajów czarnej herbaty, zarówno w postaci liściastej, jak i w formie torebek. 2 g herbaty parzono w 200 ml wody, o temperaturze 100°C. Czasy parzenia wynosiły od 2–5 do 30 minut, z początkowym interwałem czasowym pomiarów 2–5 minuty, a po 10 minutach parzenia pomiary wykonywano co 10 minut. Całkowitą zawartość polifenoli mierzono metodą F–C. Identyfikację i analizę ilościową oznaczanych związków fenolowych oraz kofeiny przeprowadzono metodą HPLC z detektorem DAD. Stwierdzono, że zawartość takich związków jak katechiny, rutyna, kwas galusowy, kwas kumarynowy, kwas chlorogenowy (Rys. 4),

najbardziej intensywnie wzrasta w ciągu pierwszych 10 minut parzenia, w przypadku kofeiny czas potrzebny do ekstrakcji maksymalnego stężenia tego związku wynosił 20 minut. Później zawartość tego związku ustaliła się na stałym poziomie, co jest zgodne z wynikami prac zespołu Suteerapataranon'a [43].



Rysunek 4. Struktury ważniejszych związków wchodzących w skład naparów herbacianych
Figure 4. Structures of main compounds contained in tea extracts

Badania te wskazały również jak różna zawartość związków o charakterze antyutleniaczy występuje w poszczególnych rodzajach herbat. Większą zawartością katechin, kwasu galusowego, kofeiny i rutyny charakteryzowały się herbaty brazylijskie, niż herbaty indyjskie, które z kolei zawierały więcej kwasu chlorogenowego i kumarynowego. Kwas chlorogenowy nie został wykryty w ogóle w herbatach brazylijskich nawet po 30 minutowym czasie ekstrakcji. Ważnym, z punktu widzenia konsumentów wnioskiem, jaki wysunęli Ramalho i in. jest to, że dłuższy czas parzenia herbat wpływa pozytywnie na ich wartość zdrowotną, ze względu na wyższą zawartość związków fenolowych w naparze [44].

Ponieważ współczesne badania konsumenckie wykazują, że coraz częściej standardowe parzenie herbaty zastępowane jest przygotowaniem jej w kuchence mikrofalowej, Spigno i in. [45] badali wpływ promieniowania mikrofalowego na zawartość

polifenoli w naparach herbacianych. Próbkę o masie 1,5 g parzono w 150 ml wrzącej wody, zawartość badanych związków mierzono spektrofotometrycznie UV/VIS metodą F-C, pomiary wykonywano po 30, 60, 90, 120, 180 i 210 sekundach. Równolegle sporządzono identyczne próbki i prowadzono ekstrakcje przy promieniowaniu mikrofalowym, o mocy od 450 do 900 W. Otrzymane wyniki przedstawiono w odniesieniu do krzywej wzorcowej sporządzonej dla roztworów kwasu galusowego. Rezultaty badań okazały się nadzwyczaj zaskakujące, całkowita zawartość polifenoli w herbacie parzonej z udziałem promieniowania mikrofalowego znacznie przekraczała wartości otrzymane w przypadku tradycyjnej metody parzenia. Co więcej, zarówno czas parzenia, jak i moc promieniowania wpływały pozytywnie na ekstrakcję związków fenolowych. Całkowite stężenie polifenoli w herbacie parzonej w konwencjonalny sposób przez 210 sekund było około dwukrotnie mniejsze niż w herbacie parzonej przy zastosowaniu promieniowania mikrofalowego o mocy 450 W oraz ponad 3-krotnie mniejsze w przypadku promieniowania o mocy 900 W. Tak wysokie stężenie polifenoli w badanych naparach, oprócz samego wpływu fal mikrofalowych na efektywność ekstrakcji, niewątpliwie związane jest także z utrzymującą się maksymalną temperaturą parzenia w próbkach będących pod wpływem promieniowania, co nie miało miejsca w przypadku tradycyjnego sposobu parzenia [45].

Innym przedstawicielem herbat całkowicie sfermentowanych jest produkowana w Chińskiej prowincji Yunnan i na Tajwanie herbata pu-erh. W procesie jej produkcji zbierane są świeże pączki kwiatu z dwoma lub trzema liśćmi. Po zbiorach liście układane są na bambusowych matach, gdzie przez około 8 godzin są suszone. Częściowo wysuszone liście pakowane są do bębna, gdzie w trakcie podgrzewania, poddawane są procesowi inaktywacji enzymu oksydazy polifenolowej [46]. Po etapie inaktywacji, liście są rolowane, po czym są ponownie suszone od 3 do 5 godzin. Następnie zbiera się je w stosy, w których przez kilka tygodni zachodzą procesy utleniania, kondensacji i degradacji substancji bioaktywnych herbaty. Procesy te są katalizowane przez wewnątrzkomórkowe enzymy, wytwarzane przez mikroorganizmy. Ten etap jest również odpowiedzialny za nadanie charakterystycznych cech sensorycznych herbacie pu-erh. Po zakończeniu fermentacji, liście są suszone w temperaturze nie wyższej niż 60°C i ponownie poddawane fermentacji. Następnie proces prowadzony jest w autoklawie, a dalej liście są suszone i poddawane długiemu leżakowaniu by mogły dojrzeć [47–49].

Dodatkowy proces fermentacji sprawia, że skład chemiczny herbaty pu-erh znacznie różni się od innych gatunków herbat, ponadto w trakcie przebiegu tego procesu powstają nowe związki chemiczne, odpowiedzialne za unikalne właściwości herbaty pu-erh [50]. Badanie zawartości katechiny w naparze pu-erh, jako związków odpowiedzialnych w głównej mierze za aktywność antyoksydacyjną herbat, było tematem wielu badań. Lin i in. [51] w swojej pracy wykazali, że stężenie katechin dla herbaty pu-erh jest znacznie niższe, niż w przypadku herbat zielonych, białych, czarnych i oolong. Do podobnych wniosków doszli Liang

[46] i Qian [52] wraz ze współpracownikami. W obu pracach analiza HPLC składu katechin dla różnych gatunków herbat wskazywała pu-erh, jako gatunek zawierający najmniejsze ich stężenie. Ponadto autorzy [46, 52] wykazali, że katechinami występującymi w największym stężeniu w pu-erh'ach były GC i EC. Tanaka i wsp. [53] zasugerowali, że wysoka zawartość GC jest najprawdopodobniej spowodowana biotransformacją, zachodzącą podczas procesu fermentacji EGCG do EGC, a następnie do GC. Za prawdziwością tego twierdzenia przemawiają wyniki analizy, które wskazują na śladową obecność EGCG i ECG w ekstraktach herbaty pu-erh.

Niska zawartość katechin w herbatach pu-erh wynika z faktu, że podczas procesu dodatkowej fermentacji, zachodzące reakcje chemiczne prowadzą do powstania TFs, TRs i TB. Związki te, podobnie jak w przypadku herbat czarnych, są odpowiedzialne za specyficzny aromat, kolor naparu oraz smak herbaty pu-erh. Ponadto katechiny, czułe na wysoką temperaturę, ulegają termicznej degradacji podczas suszenia [54]. Dlatego też, herbata pu-erh charakteryzuje się wysokim stężeniem kwasu galusowego. Prace, w których zastanawiano się nad przyczynami tak wysokiej zawartości kwasu galusowego w tym gatunku herbaty pozwoliły stwierdzić, że stężenie GA znacznie wzrasta na etapie dodatkowej fermentacji. Najprawdopodobniej jest to związane z aktywnością mikroorganizmów, która promuje formowanie GA poprzez hydrolizę tanin [55, 56], natomiast, jak wykazano w pracy Tanaki i innych [53], czynnikami, które powodują wzrost stężenia GA są szczególnie wysoka temperatura oraz duża wilgotność, wynikiem czego jest przemiana chemiczna pochodnych katechin.

PODSUMOWANIE

Herbaty, ze względu na długoletnią tradycję, walory smakowe, a także prozdrowotne działanie na organizm człowieka zawsze będą cieszyć się ogromną popularnością. Jak można wnioskować z opisanych w literaturze wyników badań, napary herbaciane stanowią bogate źródło polifenoli, związków o działaniu antyoksydacyjnym, których wysoka zawartość w dużej mierze wpływa na jakość naparu. Czynniki, które wywierają wpływ na stężenie polifenoli w naparach herbacianych są związane zarówno z gatunkiem herbaty, umiejscowieniem plantacji, procesem obróbki liści, jak również ze stopniem fermentacji. Należy jednak podkreślić, że bardzo istotny wpływ na jakość naparu mają warunki parzenia herbat. Również zastosowanie dodatkowych czynników wspomagających proces ekstrakcji takich jak np. promieniowanie mikrofalowe wpływa, na jakość otrzymanego ekstraktu. Reasumując, warto sięgać po herbatę jako źródło cennych substancji biologicznie czynnych, przy czym nie należy zapominać o właściwym ich przygotowaniu [57].

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] M. Caprari, Herbata, Warszawa, 2009.
- [2] A.B. Sharangi, Food Res. Intern., 2009, **42**, 529.
- [3] A. Jain, C. Manghani, S. Kohli, D. Nigam, V. Rani, Toxicol. Lett., 2013, **220**, 82.
- [4] J.M. Hodgson, K.D. Croft, Mol. Aspects Med., 2010, **31**, 495.
- [5] Y. Zuo, H. Chen, Y. Deng, Total Antioxidant Capacity of Teas by Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay. [online], Talanta, [dostęp: 08.07.2013], Dostępny w Internecie: http://www.researchgate.net/publication/12737156_Total_antioxidant_capacity_of_tea_by_the_ferric_reducing_antioxidant_powerassay.
- [6] A. Gramza, J. Korczak, Trends Food Sci. Tech., 2005, **16**, 351.
- [7] S.N. Thanaraj, R. Seshardi, J. Sci. Food Agric., 1990, **51**, 57.
- [8] K. Wei, L. Wang, J. Zhou, W. He, J. Zeng, Y. Jiang, H. Cheng, Food Chem., 2011, **125**, 44.
- [9] M. Obanda, P.O. Owuor, R. Mang'oka, Food Chem., 2004, **85**, 163.
- [10] M.H. Yang, Ch.H. Wang, H.L. Chen, J. Nutr. Biotech., 2001, **12**, 14.
- [11] K.W. Lee, H.J. Lee, J. Nutr., 2002, **132**, 785.
- [12] L.K. Leung, Y. Su, R. Chen, Z. Zhang, Y. Huang, Z.Y. Chen, J. Nutr., 2001, **131**, 2248.
- [13] V. Roginsky, T. Barsukova, C.F. Hsu, P.A. Kilmartin, J. Agric. Food Chem., 2003, **51**, 5798.
- [14] S. Khokhar, S.G. Magnusdottir, J. Agric. Food Chem., 2002, **50**, 565.
- [15] M. Friedman, Mol. Nutr. Food Res., 2007, **51**, 116.
- [16] M.J. Davies, J.T. Judd, D.J. Baer, B.A. Clevidence, D.R. Paul, A.J. Edwards, S.A. Wiseman, R.A. Muesing, S.C. Chen, J. Nutr., 2003, **133**, 3298.
- [17] G.F. Ferrazzano, I. Amato, A. Ingenito, A. de Natale, A. Pollio, Fitoterapia, 2009, **80**, 255.
- [18] J. Robak, R.J. Gryglewski, Pol. J. Pharmacol., 1996, **48**, 555.
- [19] P. Saha, S. Das, Asian Pac. J. Cancer Prev., 2002, **3**, 225.
- [20] Z. Cichoń, M. Miśniakiewicz, Zesz. Nauk. AE Krak., 2005, **678**, 103.
- [21] D.J. Yang, L.S. Hwang, J.T. Lin, J. Chromatogr. A, 2007, **1156**, 312.
- [22] M.S. El-Shahawi, A. Hamza, S.O. Bahaffi, A.A. Al-Sibaai, T.N. Abduljabbar, Food Chemistry **134**, 2012, 2268.
- [23] D. Labbé, A. Tremblay, L. Bazinet, Separation and Purification Technology, **49**, 1.
- [22] L. Bazinet, D. Labbé, A. Tremblay, Separation and Purification Technology, **56**, 2007, 53.
- [25] D. Komes, D. Horžić, A. Belščak, K. Kovačević Ganić, I. Vuli, Food Res. Int., **43**, 2010, 167.
- [26] E. Venditti, T. Bacchetti, L. Tiano, P. Carloni, L. Greci, E. Damiani, Food Chem., **119**, 2010, 1597.
- [27] Q.V. Vuong, J.B. Golding, C.E. Stathopoulos, P.D. Roach, Food Res. Int., 2012.
- [28] A. Perva-Uzunalić, M. Škerge, Ž. Knez, B. Weinreich, F. Otto, S. Grüner, Food Chem., **96**, 2006, 597.
- [29] G. Rusak, D. Komes, S. Likić, D. Horžić, M. Kovac, Food Chem., **110**, 2008, 852.
- [30] P. Carloni, L. Tiano, L. Padella, T. Bacchetti, C. Customo, A. Kay, E. Damiani, Food Res. Int., 2012.
- [31] N. Gursoy, C. Sarikurkcü, M. Cengiz, M. Halil Solak, Food Chem. Toxicol., **47**, 2009, 2381.
- [32] H. Wang, K. Helliwell, Food Chem., **70**, 2000, 337.
- [33] Y. Zhang, Q. Li, H. Xing, X. Lu, L. Zhao, K. Qu, Kaishun, Food Res. Int., 2013.
- [34] I.F.F. Benzie, Y.T. Szeto, J. Agric. Food Chem., 1999.
- [35] Y. Chen, Y. Jiang, J. Duan, J. Shi, S. Xue, Y. Kakuda, Food Chem., 2010, **119**, 648.
- [36] A. Gramza, J. Korczak, R. Amarowicz, Pol. J. Food Nutr. Sci., 2005, **3**, 219.
- [37] K. Wei, L. Wang, J. Zhou, W. He, J. Zeng, Y. Jiang, H. Cheng, Food Chem., 2011, **125**, 44.
- [38] L.K. Leung, Y. Su, R. Chen, Z. Zhang, Y. Huang, Z.Y. Chen, J. Nutr., 2001, **131**, 2248.
- [39] L.P. Wright, *Biochemical analysis for identification of quality in black tea*, University of Pretoria, Pretoria, 2002.

- [40] D.J. Yang, L.S. Hwang, J.T. Lin, *J. Chromatogr. A*, 2007, **1156**, 312.
- [41] Z.Y. Chen, Q.Y. Zhu, F. Tsang, Y. Huang, *J. Agric. Food Chem.*, 2001, **49**, 477.
- [42] E. Venditti, T. Bacchetti, L. Tiano, P. Carloni, L. Greci, E. Damiani, *Food Chem.*, 2010, **119**, 1597.
- [43] S. Suteerapataranon, J. Butsoongnern, P. Punturat, W. Jorpalit, C. Thanomsilp, *Food Chem.*, 2009, **114**, 1335.
- [44] S.A. Ramalho, N. Nigam, G.B. Oliveira, P.A. de Oliveira, T.O. Matos Silva, A.G. Passos dos Santos, N. Narain, *Food Res. Int.* 2013, **51**, 155.
- [45] G. Spigno, D.M. De Faveri, *J. Food Eng.*, 2009, **93**, 210.
- [46] Y.R. Liang, L.Y. Zhang, J.L. Lu, *J. Sci. Food Agr.*, 2005, **85**, 381.
- [47] Y. Hou, W.F. Shao, R. Xiao, K.L. Xu, Z.Z. Ma, B.H. Johnstone, *Exp. Geront.*, **44**, 434.
- [48] Q.P. Wang, J.S. Gong, S.S. Qiu, *Trans. Chin. Soc. Agr. Eng.*, 2010, **26**, 394.
- [49] D. Wang, R. Xiao, X.T. Hu, K.L. Xu, Y. Hou, Y. Zhong, et al., *J. Agr. Food Chem.*, 2010, **58**, 1350.
- [50] J.S. Gong, H.J. Zhuo, X.F. Zhang, S. Song, *WJ. An, J. Tea Sci.*, 2005, **25**, 300.
- [51] J.K. Lin, C.L. Lin, Y.C. Liang, S.Y. Lin-Shiau, I.M. Juan, *J. Agr. Food Chem.*, 1998, **46**, 3635.
- [52] Z.M. Qian, J. Guan, F.Q. Yang, S.P. Li, *J. Agr. Food Chem.*, 2008, **56**, 11187.
- [53] T. Tanaka, H. Umeki, S. Nagai, T. Shii, Y. Matsuo, I. Kouno, *Food Chem.*, 2012, **134**, 276.
- [54] Y.G. Zuo, H. Chen, Y.W. Deng, *Talanta*, 2002, **57**, 307.
- [54] G.M. She, X.L. Zhang, K.K. Chen, Y.J. Zhang, C.R. Yang, *Acta Bot. Yunn.*, 2005, **27**, 572.
- [56] G. Mukherjee, R. Banerjee, *J. Basic Microbiol.*, 2004, **44**, 42.
- [57] B. Frei, J.V. Higdon, *J. Nutr.*, 2003, **133**, 3275.

Praca wpłynęła do Redakcji 16 października 2013

INFORMACJE

Elżbieta Wojaczyńska

WYDZIAŁ CHEMICZNY POLITECHNIKI WROCŁAWSKIEJ – TRADYCJA I NOWOCZESNOŚĆ

Wydział Chemiczny był jednym z czterech utworzonych na Politechnice Wrocławskiej dekretem z 24 sierpnia 1945 roku, powołującym do życia polskie uczelnie wyższe we Wrocławiu. Ma jednak starsze korzenie: jego bazą materialną stały się budynki przedwojennej niemieckiej *Technische Hochschule* (obecne budynki A-3 i B-1) a główną rolę w pierwszym, pionierskim okresie odegrali uczeni związani przed wojną z Politechniką Lwowską lub tamtejszym Uniwersytetem: Edward Sucharda, Henryk Kuczyński, Wiktor Gorzelany, Tadeusz Baranowski, Zofia Skrowaczewska, Włodzimierz Trzebiatowski, Bogusława Jeżowska-Trzebiatowska, Edwin Płazek, Ewa Neyman-Pilatowa i inni. To w głównej mierze dzięki determinacji tych osób, a także byłego asystenta na Politechnice Warszawskiej, a późniejszego rektora Politechniki Wrocławskiej, Dionizego Smoleńskiego, w listopadzie 1945 roku na Wydziale Chemicznym zajęcia mogło rozpocząć pierwszych 87 studentów.

Po okresie dominacji działań organizacyjnych i intensywnej pracy dydaktycznej, kiedy priorytetem było kształcenie nowej kadry inżynierskiej dla rozwijającego się przemysłu, coraz ważniejszą rolę zaczęła odgrywać działalność naukowa. Oprócz kontynuacji badań prowadzonych na Politechnice Lwowskiej rozwijano także nowe kierunki. W ciągu pierwszych kilku lat działalności Wydziału wydatnie wzrosła liczba studentów oraz pracowników naukowych, wybudowano też nowy gmach (budynek A-2, tzw. „Nowa chemia”). Zmianie ulegała struktura wydziału: początkowy system katedr zastąpiło w roku 1968 sześć instytutów: Chemii Nieorganicznej i Metalurgii Pierwiastków Ziemi Rzadkich, Chemii i Technologii Nafty i Węgla, Chemii Organicznej i Fizycznej, Inżynierii Chemicznej i Urządzeń Ciepłych, Technologii Nieorganicznej i Nawozów Mineralnych oraz Technologii Organicznej i Tworzyw Sztucznych. W latach 70. rozpoczęto badania z zakresu biochemii i biotechnologii (prof. M. Kochman, prof. P. Mastalerz, prof. A. Zabża), które póź-

niej zaowocować miały utworzeniem nowego kierunku studiów – biotechnologii. Prowadzono kolejne inwestycje budowlane: powstały budynki F-1, F-2 i F-3 przy ul. Gdańskiej, gmach Inżynierii Chemicznej z halą technologiczną (C-6, ul. Norwida, obecnie również siedziba dziekanatu Wydziału) oraz budynek H-6.

Ustawa z roku 1990 przywróciła rolę wydziału jako jednostki organizacyjnej uczelni, nadając mu jednocześnie znaczne uprawnienia w kształtowaniu sposobu kształcenia. Rada Wydziału Chemicznego wprowadziła wówczas funkcjonujący do dziś elastyczny, modułowy system studiów. W 2005 roku przeprowadzono kolejną restrukturyzację, pozostawiając 2 instytuty, z pozostałych natomiast wyodrębniło się 13 zakładów. Taka jest też obecna struktura Wydziału, na który składają się instytuty: Technologii Nieorganicznej i Nawozów Mineralnych oraz Chemii Fizycznej i Teoretycznej oraz zakłady: Biochemii, Chemii Analitycznej, Chemii Bioorganicznej, Chemii Nieorganicznej i Strukturalnej, Chemii Organicznej, Chemii i Technologii Paliw, Inżynierii Chemicznej, Inżynierii i Technologii Polimerów, Materiałów Polimerowych i Węglowych, Metalurgii Chemicznej, Procesów Chemicznych i Biochemicznych, Technologii Organicznej i Farmaceutycznej oraz Chemii Medycznej i Mikrobiologii.

Nazwy jednostek wydziałowych odzwierciedlają niezwykle zróżnicowaną tematykę badawczą Wydziału. Obecnie Wydział Chemiczny prowadzi zaawansowane badania między innymi w zakresie chemii i technologii paliw, produktów nieorganicznych, polimerów, chemii surfaktantów, metalurgii chemicznej, ochrony środowiska, biochemii i mikrobiologii, syntezy organicznej, chemii fizycznej i teoretycznej oraz informatyki chemicznej. Badania ukierunkowane są na potrzeby gospodarki i rynku pracy. Warta podkreślenia jest aktywna współpraca naukowa z placówkami zagranicznymi, takimi jak: Jackson State University, State University of New York at Buffalo, Genentech Inc. (USA), Research School of Physical Sciences and Engineering, The Australian National University, Canberra (Australia), University of Cambridge, Surrey University (Wielka Brytania), Karel De Grote Hogeschool of Antwerp (Belgia), École normale supérieure Cachan (Francja), CompuLense Universidad de Madrid (Hiszpania) czy European Molecular Biology Laboratory, Hamburg (Niemcy).

Wydział Chemiczny Politechniki Wrocławskiej dysponuje nowoczesną, wysokospecjalistyczną aparaturą badawczo-pomiarową (m.in. spektrometry NMR 600 MHz i 300 MHz, spektrometr masowy z analizatorem TOF, spektrometry FT-IR), z której korzystają w głównej mierze pracownicy naukowcy Wydziału. Akredytowane Laboratorium Chemiczne Analiz Wielopierwiastkowych, Laboratorium analiz produktów naftowych i Laboratorium procesów katalitycznych i adsorpcyjnych wykonują również liczne analizy dla użytkowników spoza Wydziału, między innymi dla potrzeb przemysłu chemicznego.

Niezwykle ważnym aspektem działalności Wydziału Chemicznego jest dydaktyka. Wydział kształci na studiach inżynierskich I stopnia oraz studiach magisterskich II stopnia specjalistów pięciu kierunków: Biotechnologii, Chemii, Inżynierii Chemicznej i Procesowej, Inżynierii Materiałowej oraz Technologii Chemicznej.

Wśród specjalności znajdują się również prowadzone w języku angielskim, takie jak: *Bioinformatics*, *Medicinal Chemistry* czy *Applied Chemical Engineering*. Nowe specjalności wprowadzane są zgodnie z potrzebami rynku polskiego i Unii Europejskiej. Wydział Chemiczny uczestniczy w programach podwójnego dyplomowania (Uniwersytet NYSA, MONABIPHOT). Edukacją blisko 3000 studentów (około 400 absolwentów rocznie) zajmuje się ponad 200 pracowników naukowo-dydaktycznych, w tym blisko 80 profesorów i doktorów habilitowanych. Wykorzystywane są nowoczesne metody kształcenia (e-learning, korzystanie z e-portali). W ostatnich latach wyremontowano szereg laboratoriów, w planach jest budowa nowego gmachu Centrum Zaawansowanych Technologii Chemicznych.

Studenci Wydziału Chemicznego biorą aktywny udział w międzynarodowych programach wymiany studenckiej (LLP/Erasmus, Erasmus-Mundus, Leonardo da Vinci). Swoje zainteresowania naukowe pogłębiają w kilku funkcjonujących na różnych kierunkach kołach naukowych. Kontakty Wydziału z pracodawcami z branży chemicznej owocują możliwościami odbywania praktyk w czasie studiów, a najlepszym absolwentom ułatwiają znalezienie zatrudnienia zgodnego z ich wykształceniem.



7th Central Europe Conference
Chemistry
towards
Biology

The 7th CTB conference will take place in Katowice, Poland, from **9-12 September 2014**.

The web site will appear soon at: <http://www.ctb2014.us.edu.pl/>

For contacts please use an e-mail address of 7th CTB: CTB2014@us.edu.pl

Additionally to the main topics

The organizing committee of the 7th Central European Conference “Chemistry towards Biology” would like to continue the initiative started at the last 6th CTB in Trieste. The starting action is this survey that intends to promote networking and to facilitate access to EU funding opportunities believing that times are mature to enlarge the scope of the conference beyond the pure scientific event and to create the foundations for a permanent “environment” where the R&D potential of Central Europe acquires voice and solidity.

The main goal of these symposia is to bring together scientists whose research interests are at the interface between chemistry and biology, thus transcending the specific topics of these disciplines and pursuing an interdisciplinary route which is the main characteristic of modern science. The interdisciplinary character of the conferences will certainly promote the cross-fertilization process to accelerate the advancement of knowledge.

The research topics identified for the conference sessions are:

Carbohydrate chemistry and biochemistry

Chemistry of cell biology

Nucleic acids chemistry

Structure, function and interactions of proteins

New/engineered enzymes

Drug design and drug delivery

Molecular pharmacology, medicine and biomaterials.

Invited lectures on these topics will be given by internationally renowned scientists.

INFORMACJE REDAKCJI „WIADOMOŚCI CHEMICZNYCH”

CENY PRENUMERATY NA ROK 2014

Redakcja miesięcznika PTCh „Wiadomości Chemiczne” zawiadamia, że wysokość prenumeraty rocznej „Wiadomości Chemicznych” za 2014 r. będzie wynosiła **200 zł + 5% VAT** dla instytucji i niezrzeszonych prenumeratorów indywidualnych. Dla członków PTChem **20 zł**. Należność za prenumeratę prosimy przekazywać na konto:

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

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

- prenumerata „Wiadomości Chemicznych” na rok 2014 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 PTCh, którzy zechcą zaprenumerować „Wiadomości Chemiczne” na podanych tu warunkach, proszeni są o wnoszenie opłat na konto:

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

*Pełnych ciepła, spokoju i radości
Świąt Bożego Narodzenia
oraz szczęścia, pomyślności i sukcesów
w Nowym Roku 2014
wraz z podziękowaniami za dotychczasową
owocną współpracę,
wszystkim
Czytelnikom, Autorom oraz Recenzentom,
życzy
Zespół Redakcyjny
„Wiadomości Chemicznych”*



PODZIĘKOWANIA

Komitet Redakcyjny „Wiadomości Chemicznych” pragnie złożyć słowa podziękowania za okazaną pomoc i wsparcie finansowe w roku 2013:

- Panu prof. dr hab. Henrykowi Koroniakowi, Dziekanowi Wydziału Chemii Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu,
- Panu prof. dr hab. Andrzejowi Trochimczukowi, Dziekanowi Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej,
- Panu prof. dr hab. Andrzejowi Jeżowskiemu, Dyrektorowi Instytutu Niskich Temperatur i Badań Strukturalnych im. Włodzimierza Trzebiatowskiego PAN we Wrocławiu,
- Pani prof. dr hab. Annie M. Trzeciak, Dziekan Wydziału Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego,
- Firmie Farmaceutycznej Merck Sp. z o.o.

Kierujemy również bardzo serdeczne słowa podziękowania dla wszystkich Recenzentów i Autorów, którzy współpracowali z nami w roku 2013. To właśnie dzięki ich pracy możliwe było utrzymanie wysokiego poziomu naukowego czasopisma.

prof. dr hab. Zdzisław Latajka
Redaktor Naczelny

WYRÓŻNIONE PRACE DOKTORSKIE LUB HABILITACYJNE

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

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

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

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

LISTA RECENZENTÓW WSPÓŁPRACUJĄCYCH Z REDAKCJĄ „WIADOMOŚCI CHEMICZNYCH” W LATACH 2012-13

prof. zw. dr hab. inż. Stanisław Błażewicz

Akademia Górniczo-Hutnicza im. Stanisława Staszica w Krakowie; Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki; Katedra Biomateriałów

dr hab. inż. Katarzyna Borowska

Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich w Bydgoszczy

dr Anna Bodzoń-Kułakowska

Akademia Górniczo-Hutnicza im. Stanisława Staszica w Krakowie; Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki

prof. dr hab. Stanisław Boryczka

Śląski Uniwersytet Medyczny, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej w Sosnowcu, Katedra i Zakład Chemii Organicznej

prof. dr hab. Jerzy Boryski

Instytut Chemii Bioorganicznej PAN

prof. zw. dr hab. Wanda Brzyska

Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej; Wydział Chemii; Zakład Chemii Ogólnej i Koordynacyjnej

prof. zw. dr hab. inż. Bogdan Burczyk

Politechnika Wrocławska; Wydział Chemiczny; Instytut Technologii Organicznej i Tworzyw Sztucznych

prof. zw. dr hab. Bogusław Buszewski

Wydział Chemii UMK, Katedra Chemii Środowiska i Bioanalityki

dr hab. Lech Celewicz

Uniwersytet A. Mickiewicza Wydział Chemii Pracownia Chemii Nukleozydów i Nukleotydów

prof. zw. dr hab. inż. Jerzy Feliks Choma

Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach; Wydział Matematyczno-Przyrodniczy; Instytut Chemii

dr Grażyna Chwatko

Uniwersytet Łódzki; Wydział Chemii; Katedra Chemii Środowiska

prof. dr hab. Leszek Adam Czepirski

Akademia Górniczo-Hutnicza im. Stanisława Staszica w Krakowie; Wydział Energetyki i Paliw, Katedra Chemii Węgla i Nauk o Środowisku

prof. dr hab. Jerzy Datka

Uniwersytet Jagielloński; Wydział Chemii; Zakład Chemii Nieorganicznej

dr Krzysztof Drabent

Uniwersytet Wrocławski; Wydział Chemii

dr hab. inż. Krystyna Jolanta Dzierzbicka

Politechnika Gdańska; Wydział Chemiczny; Katedra Chemii Organicznej

dr inż. Mateusz Fijałkowski

Technicka Unverzita w Liberci, Institute for Nanomaterials, Advanced Technology and Innovation

prof. dr hab. Jolanta Floryszak-Wieczorek

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu; Wydział Ogrodnictwa i Architektury Krajozbrazu; Katedra Fizjologii Roślin

prof. dr hab. Andrzej Wincenty Gamian

Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu; Wydział Lekarski; Katedra i Zakład Biochemii Lekarskiej

prof. dr hab. inż. Roman Gancarz

Politechnika Wroclawska; Wydział Chemiczny; Wydziałowy Zakład Technologii Organicznej i Farmaceutycznej

prof. zw. dr hab. Jacek Gliński

Uniwersytet Wroclawski; Wydział Chemii

prof. dr hab. Jolanta Gromadzińska

Instytut Medycyny Pracy im. Prof. J. Nofera,
Zakład Toksykologii i Kancerogenezy

prof. dr hab. Grzegorz Grynkiewicz

Instytut Farmaceutyczny, ul. Rydygiera 8, 01-793 Warszawa

prof. dr hab. Hanna Maria Gulińska

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu; Wydział Chemii; Zakład Dydaktyki Chemii

prof. dr hab. Jerzy Kazimierz Hanuza

Uniwersytet Ekonomiczny we Wrocławiu; Wydział Inżynieryjno-Ekonomiczny; Instytut Chemii i Technologii Żywności

dr hab. inż. Andrzej Huczko

Uniwersytet Warszawski; Wydział Chemii

dr Agnieszka Masajada

Politechnika Wroclawska, Instytut Fizyki

prof. dr hab. inż. Stefan Jankowski

Politechnika Łódzka; Wydział Chemiczny; Instytut Chemii Organicznej

prof. dr hab. Bronisław Jańczuk

Katedra Chemii Fizycznej, Wydział Chemii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

prof. zw. dr hab. inż. Paweł Kazimierz Kafarski

Politechnika Wroclawska; Wydział Chemiczny; Wydziałowy Zakład Chemii Bioorganicznej

dr hab. inż. Aleksandra Kołodziejczyk

Uniwersytet Gdański, Wydział Chemii, Katedra Chemii Medycznej

prof. dr hab. Marek Andrzej Kojdecki

Wojskowa Akademia Techniczna im. Jarosława Dąbrowskiego; Wydział Cybernetyki; Instytut Matematyki i Kryptologii

dr Edyta Kostrzewa-Susłow

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu; Wydział Nauk o Żywności; Katedra Chemii

prof. dr hab. inż. Małgorzata Kotulska

Politechnika Wroclawska, Instytut Inżynierii medycznej i Pomiarowej

prof. dr hab. Teresa Kowalik-Jankowska

Uniwersytet Wroclawski; Wydział Chemii

prof. dr hab. Marek Andrzej Kojdecki

Wojskowa Akademia Techniczna im. Jarosława Dąbrowskiego; Wydział Cybernetyki; Instytut Matematyki i Kryptologii

prof. dr hab. czł. koresp. PAN Henryk Kozłowski

Uniwersytet Wroclawski; Wydział Chemii

prof. dr hab. Stanisław Krompiec

Uniwersytet Śląski w Katowicach, Wydział Matematyki, Fizyki i Chemii

prof. dr hab. Bogusław Kazimierz Kryczka

Uniwersytet Łódzki; Wydział Chemii; Katedra Chemii Organicznej i Stosowanej

prof. dr hab. Andrzej Książczak

Politechnika Warszawska; Wydział Chemiczny; Zakład Materiałów Wysokoenergetycznych

prof. dr hab. Przemysław Kubisa

Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN

prof. dr hab. Stanisław Lamparski

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu; Wydział Chemii; Zakład Chemii Fizycznej

prof. dr hab. Stanisław Leśniak

Uniwersytet Łódzki; Wydział Chemii, Katedra Chemii Organicznej i Stosowanej

prof. dr hab. Jarosław Lewkowski

Uniwersytet Łódzki, Wydział Chemii

prof. dr hab. Beata Liberek

Uniwersytet Gdański; Wydział Chemii; Katedra Chemii Organicznej

prof. dr hab. Teodozja Lipińska

Uniwersytet Przyrodniczo-Humanistyczny w Siedlcach, Instytut Chemii

prof. dr hab. Stefan Lis

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza; Wydział Chemii

prof. dr hab. Jerzy Lisowski

Uniwersytet Wrocławski, Wydział Chemii

prof. dr hab. Eugeniusz Antoni Łągiewka

Uniwersytet Śląski w Katowicach, Wydział Informatyki i Nauki o Materiałach

prof. dr hab. inż. Maria Madej-Lachowska

Polska Akademia Nauk, Instytut Inżynierii Chemicznej

prof. dr hab. inż. czł. koresp. PAN Bogusław Major

Instytut Metalurgii i Inżynierii Materiałowej PAN, Kraków

prof. zw. dr hab. inż. Andrzej Wiktor Maranda

Wojskowa Akademia Techniczna im. Jarosława Dąbrowskiego; Wydział Nowych Technologii i Chemii

dr hab. Katarzyna Małolepsza-Jarmołowska

Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, Katedra i Zakład Technologii Postaci Leku

dr Agata Markowska-Szczupak

Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie; Wydział Technologii i Inżynierii Chemicznej; Instytut Technologii Chemicznej Nieorganicznej i Inżynierii Środowiska

dr hab. inż. Witold Zygmunt Mielcarek

Instytut Elektrotechniki

prof. dr hab. Roman Mieczysław Mierzecki

Polska Akademia Nauk; Wydział I Nauk Humanistycznych i Społecznych; Komitet Historii Nauki i Techniki

prof. dr hab. Konrad Misiura

Wydział Farmaceutyczny, Collegium Medicum w Bydgoszczy
Katedra i Zakład Technologii Chemicznej Środków Leczniczych

prof. dr hab. inż. Jan Mosio-Mosiewski

Instytut Ciężkiej Syntezy Organicznej

prof. dr hab. inż. Jacek Młochowski

Politechnika Wrocławska; Wydział Chemiczny;

prof. dr hab. Krystyna Nowińska

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza; Wydział Chemii, Zakład Katalizy Heterogenicznej

prof. dr hab. inż. Aleksandra Barbara Olma

Politechnika Łódzka; Wydział Chemiczny; Instytut Chemii Organicznej

dr Marcin Olszewski

Politechnika Gdańska, Katedra Mikrobiologii

prof. dr hab. Kazimierz Orzechowski

Uniwersytet Wrocławski, Wydział Chemii

prof. dr hab. czł. koresp. PAN Stanisław Penczek

Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN

prof. dr hab. Marek Pietraszkiewicz

Polska Akademia Nauk w Warszawie, Instytut Chemii Fizycznej

prof. dr hab. inż. Jacek Pięłowski

Politechnika Wrocławska; Wydział Chemiczny; Wydziałowy Zakład Inżynierii i Technologii Polimerów

dr hab. Piotr Piszczek

Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Wydział Chemii

prof. dr hab. Florian Paweł Pruchnik

Uniwersytet Wrocławski; Wydział Chemii

prof. dr hab. inż. Janusz Rachoń

Politechnika Gdańska; Wydział Chemiczny; Katedra Chemii Organicznej

prof. dr hab. inż. Gabriel Rokicki

Politechnika Warszawska; Wydział Chemiczny; Katedra Chemii i Technologii

prof. dr hab. Krzysztof Rolka

Uniwersytet Gdański; Wydział Chemii; Katedra Chemii Bioorganicznej

dr Grzegorz Rusek

Uniwersytet Wrocławski, Wydział Chemii

prof. dr hab. inż. Wojciech Sas

Politechnika Warszawska; Wydział Chemiczny; Zakład Chemii Organicznej

prof. dr hab. Grzegorz Schroeder

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza; Wydział Chemii; Zakład Chemii Supramolekularnej

prof. dr hab. Ignacy Zenon Siemion

Uniwersytet Wrocławski; Wydział Chemii

prof. dr hab. inż. Jacek Mikołaj Skarzewski

Politechnika Wrocławska; Wydział Chemiczny; Wydziałowy Zakład Chemii Organicznej

prof. dr hab. inż. Wincenty Antoni Skupiński

Politechnika Warszawska; Wydział Chemiczny; Zakład Materiałów Wysokoenergetycznych

prof. dr hab. Jadwiga Sołducho

Politechnika Wrocławska; Wydział Chemiczny; Wydziałowy Zakład Chemii Medycznej i Mikrobiologii

prof. dr hab. Stanisław Kazimierz Sobiak

Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu; Wydział Farmaceutyczny; Katedra i Zakład Technologii Chemicznej Środków Leczniczych

prof. dr hab. Mirosław Soszyński

Uniwersytet Łódzki; Wydział Biologii i Ochrony Środowiska; Katedra Biofizyki Molekularnej

dr hab. Piotr Tadeusz Stefanowicz

Uniwersytet Wrocławski; Wydział Chemii

prof. dr hab. Wiesław Stanisław Stręk

Polska Akademia Nauk, Instytut Niskich Temperatur i Badań Strukturalnych

prof. zw. dr hab. Zbigniew Szewczuk

Uniwersytet Wrocławski; Wydział Chemii

prof. dr hab. Anna Szmyrka-Grzebyk

Polska Akademia Nauk, Instytut Niskich Temperatur i Badań Strukturalnych

prof. dr hab. Artur Piotr Terzyk

Uniwersytet Mikołaja Kopernika; Wydział Chemii

prof. zw. dr hab. inż. Janusz Tadeusz Trawczyński

Politechnika Wrocławska; Wydział Chemiczny; Zakład Chemii i Technologii Paliw

prof. zw. dr hab. inż. Andrzej Witold Trochimczuk

Politechnika Wrocławska; Wydział Chemiczny; Wydziałowy Zakład Materiałów Polimerowych i Węglowych

dr hab. Lilianna Trynda-Lemiesz

Akademia Medyczna im. Piastów Śląskich; Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej; Katedra i Zakład Chemii Analitycznej

prof. zw. dr hab. Anna Maria Trzeciak

Uniwersytet Wrocławski; Wydział Chemii

dr Katarzyna Elżbieta Wajda-Hermanowicz

Uniwersytet Wrocławski; Wydział Chemii

prof. dr hab. Monika Ewa Waksmundzka-Hajnos

Uniwersytet Medyczny w Lublinie; Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej; Katedra Chemii

prof. dr hab. Maciej Wiśniewski

Politechnika Poznańska; Wydział Technologii Chemicznej; Instytut Technologii i Inżynierii Chemicznej

prof. dr hab. Zbigniew Krzysztof Wróbel

Polska Akademia Nauk, Instytut Chemii Organicznej

prof. dr hab. inż. Jan Zawadiak

Politechnika Śląska, Katedra Technologii Chemicznej Organicznej i Petrochemii

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

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

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

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

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

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

Skorygowana nomenklatura rodników, jonów, jonorodników i podobnych 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. Stręć, M. Suszyńska, cena 25 zł.

Praca zbiorowa, *Ogniwa paliwowe – nowe kierunki rozwoju*, red. H. Drulis, J. Hanuza, D. Hreniak, M. Miller, G. Paściak, W. Stręć, 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 substancji prostych do życia. Świat RNA – początki życia na Ziemi, Zdzisław Chilmonczyk – NAKŁAD WYCZERPANY.

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

Chemia koordynacyjna w Polsce. Część I, cena 17,50 zł.

Chemia koordynacyjna w Polsce. Część II, cena 17,50 zł.

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

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

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

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

1. Informacje ogólne

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

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

„Wiadomości Chemiczne” znajdują się na liście czasopism punktowanych przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego. Zawartość czasopisma dostępna jest zarówno w formie drukowanej jak i elektronicznej. Elektroniczny dostęp do pełnych tekstów prac jest możliwy poprzez stronę Dolnośląskiej Biblioteki Cyfrowej, <http://www.dbc.wroc.pl/>.

Anglojęzyczne streszczenia wszystkich opublikowanych prac są dostępne na stronie internetowej „Wiadomości Chemicznych”, <http://old.pages.wchuwr.pl/wiadchem.html>.

Czasopismo od wielu lat jest indeksowane/abstraktowane w dwóch bazach danych (Chemical Abstracts oraz AGRO), a od roku 2012 zostały umieszczone w bazie Polskiej Bibliografii Naukowej, <https://pbn.nauka.gov.pl/journals/24384>.

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

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

pisma. W takim przypadku praca traktowana jest jako nowy tekst i ponownie przechodzi pełną procedurę recenzowania.

- Ponadto Komitet Redakcyjny informuje, że tzw. „ghostwiting” (ktoś wniósł znaczący wkład w powstanie publikacji, a nie został przedstawiony jako współautor lub też nie został wymieniony w podziękowaniu zamieszczonym w publikacji) lub „guest authorship” (udział autora jest znikomy lub też w ogóle nie miał miejsca, a mimo to jest współautorem publikacji) są przejawem nierzetelności naukowej. Wszelkie przejawy nierzetelności naukowej, łamanie i naruszanie zasad etyki obowiązującej w nauce będą ujawniane, włącznie z powiadomieniem jednostek zatrudniających autorów.
- Autorzy mają prawo do zaproponowania co najmniej trzech niezależnych recenzentów, jednak ostateczny wybór anonimowych recenzentów dokonuje Redakcja.

3. Koszty

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

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

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

4. Informacje szczegółowe dotyczące przygotowania maszynopisu do druku

4.1. Wymagania merytoryczne

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

4.2. Wymagania techniczne składu tekstu

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

Abstract

Wykaz stosowanych symboli i oznaczeń

Wprowadzenie

1. Tytuł rozdziału

1.1. Tytuł podrozdziału itp.

Uwagi końcowe

Podziękowanie

Piśmiennictwo cytowane

• **Kolejne strony pracy powinny zawierać:**

- **notki o autorach** pracy wraz z tytułami naukowymi (można dołączyć osobno pliki z fotografiami autorów (zob. **Pliki jakie należy przekazać do Redakcji**),
- **obszerne streszczenie pracy w języku angielskim** (od 1800 do 2700 znaków ze spacjami) z uwzględnieniem cytowanego piśmiennictwa oraz odsyłaczami do tabel, rysunków zamieszczonych w tekście (Rys. 1, Tab. 1-2, Schemat 1) oraz **słowa kluczowe** – nie więcej niż 6, uzyskane najlepiej z bazy 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 wychwyty serotoniny (ang. *Selective Serotonin Reuptake Inhibitor*),
- **dalszy tekst pracy zgodny z podawanym wcześniej spisem treści.**

• **Tabele, rysunki, fotografie**

Jeżeli tabele i rysunki zostały wykonane w edytorze Word, zaleca się, aby były zamieszczone w tekście artykułu, w innym przypadku wymagane jest dołączenie oryginalnych plików.

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

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

• **Piśmiennictwo cytowane**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<http://www.....>

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

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

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

- 1 plik tekstu zredagowany zgodnie z wymaganiami Redakcji;
- 1 plik zawierający krótkie notki biograficzne o autorach nadesłanej pracy (każda notka do 150 wyrazów powinna zawierać: tytuł naukowy, miejsce pracy oraz inne ważne informacje o autorze);

- pliki zawierające zdjęcia portretowe autorów, w nazwie powinny wskazywać autora, którego zdjęcie dotyczy (dobrowolne, przesłanie plików jest jednoznaczne ze zgodą na jego opublikowanie);
- 1 plik zawierający: stronę tytułową, streszczenie (abstrakt), słowa kluczowe, podpisy pod rysunki, tabele, schematy (wszystko w obu wersjach językowych); jeśli zachodzi potrzeba to również oddzielne pliki z rysunkami, schematami, tabelami (zob. Tabele, rysunki, fotografie).

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

Na etapie przygotowania szczytki, w przypadku przesyłania prac z kolorowymi stronami prosimy o zaznaczenie, stron które w formie druku mają być czarno-białe. Brak tej czynności może **skutkować wystawieniem faktury za wydruk kolorowych stron**. W przypadku zmian kolorowych rysunków na czarno białe prosimy również o zasygnalizowanie, że w postaci elektronicznej, życzą sobie Państwo wersję w kolorze.

Autor wskazany w liście przewodnim jako osoba kontaktowa otrzymuje drogą elektroniczną plik opublikowanej pracy w formacie pdf.

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

Redakcja „Wiadomości Chemicznych”

SPIS TREŚCI

Anna JAKUBOWSKA: Współczesne surfaktanty i ich struktury micelarne tworzone w roztworach wodnych	981
Ewa RADZIKOWSKA: Modyfikowane oligodeoksyrybonukleotydy zawierające w wiązaniu internukleotydowym w pozycji mostkowej atom azotu	1003
Renata KOŁODZIEJSKA, Marcin WRÓBLEWSKI, Aleksandra KARCZMARSKA-WÓDZKA, Renata STUDZIŃSKA, Marcin DRAMIŃSKI: Prolina – pospolity aminokwas wyjątkowy katalizator. Część II. Międzycząsteczkowa kondensacja aldolowa	1027
Lilianna BECAN: Aktywność biologiczna pochodnych tiazolo[4,5- <i>d</i>]pirymidyny	1051
Anna WÓJCICKA: Syntezy pochodnych układu pirazolo[4,3- <i>c</i>]heterocyklicznego	1075
Wanda WEISS-GRADZIŃSKA, Wojciech KRZEMPEK, Lilianna TRYNDA-LEMIESZ: Mechanizm oporności na leki platynowe oraz strategie pokonywania tego zjawiska	1105
Kamil KURLETO, Grzegorz KUROWSKI, Barbara LASKOWSKA, Magdalena MALINOWSKA, Elżbieta SIKORA, Otmar VOGT: Wpływ warunków parzenia na zawartość antyoksydantów w naparach różnych rodzajów herbat	1129
Informacje	1149

W NASTĘPNYM ZESZYCIE UKAŻĄ SIĘ:

Anna N. WILK, Paweł KAFARSKI: Kultowe bestie – literatura a nauka
Beata SWINAREW, Andrzej Szymon SWINAREW: MALDI – metoda do zastosowań w analizie strukturalnej polimerów
Renata STUDZIŃSKA, Aleksandra KARCZMARSKA-WÓDZKA, Marcin WRÓBLEWSKI, Renata KOŁODZIEJSKA, Marcin DRAMIŃSKI: Prolina – pospolity aminokwas wyjątkowy katalizator. Część III. Reakcja Mannicha
Anna NOWICKA, Hanna LISZKIEWICZ, Wanda Paulina NAWROCKA: Zasady Schiffa – wybrane syntezy, reakcje i aktywność biologiczna
Wanda Paulina NAWROCKA, Anna NOWICKA: Syntezy i aktywność biologiczna pochodnych pirydopirydazyny