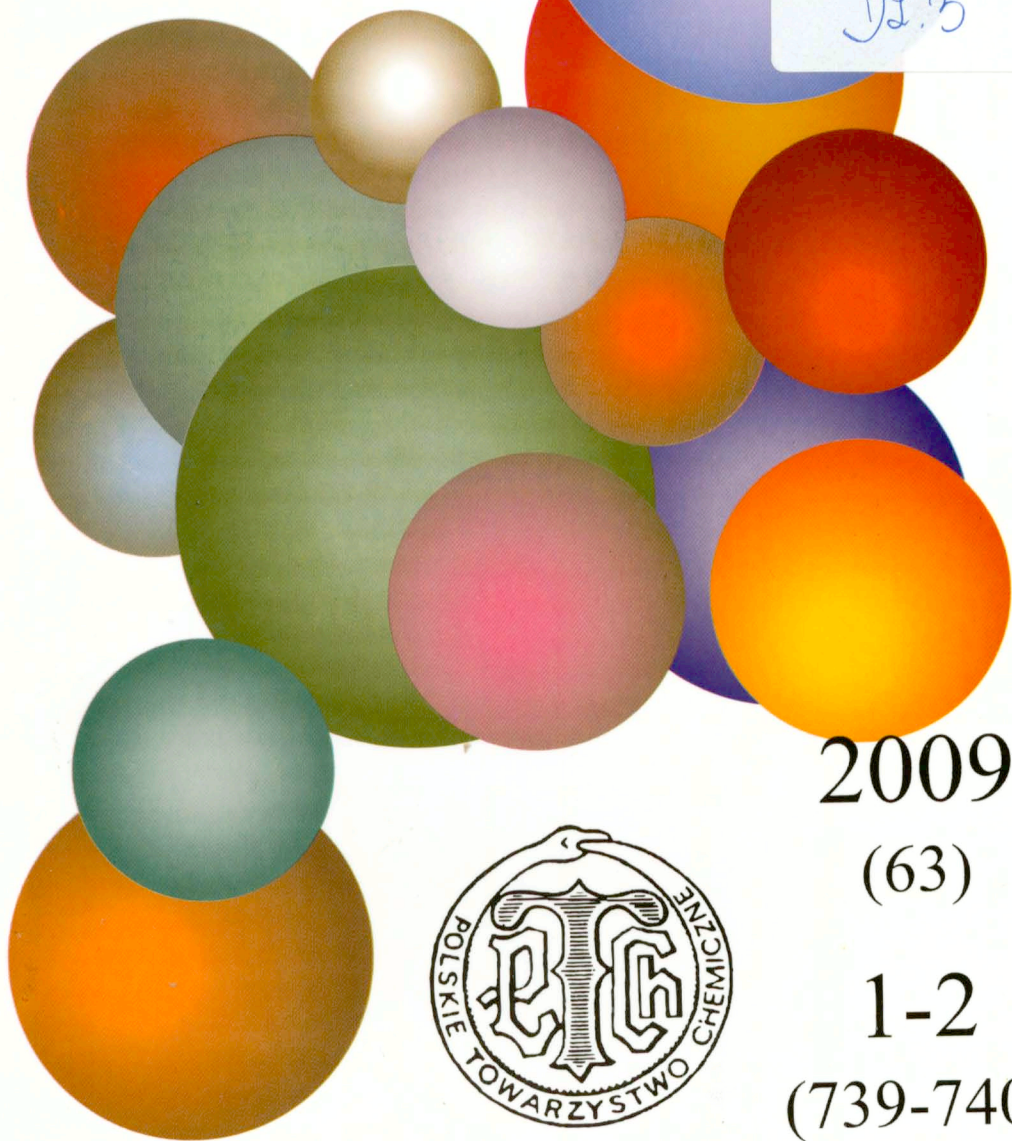


A 1263 II

WIADOMOŚCI *chemiczne*

Dł. 3



2009

(63)

1-2

(739-740)

NANOCZĄSTKOWE KATALIZATORY PALLADOWE W REAKCJACH TWORZENIA WIĄZAŃ C-C

NANOSIZED PALLADIUM CATALYSTS IN C-C BOND FORMING REACTIONS

Anna M. Trzeciak, Józef J. Ziółkowski

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

Abstract

Wstęp

1. Katalizatory palladowe
2. Reakcja Hecka w stopionej soli $[\text{Bu}_4\text{N}]\text{Br}$
3. Pd(0) i Pd(II) naniesiony na tlenki nieorganiczne
4. Wpływ cieczy jonowych na tworzenie nanocząstek Pd(0)

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane



Prof. dr hab. Anna M. Trzeciak ukończyła studia chemiczne na Uniwersytecie Wrocławskim w 1977 r. (dr 1981, dr hab. 1991, prof. 2000), obecnie jest profesorem zwyczajnym na Wydziale Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego, kieruje Zakładem Dydaktycznym Chemii Nieorganicznej i Zespołem Badawczym Katalizy Homogenicznej. Jej specjalność naukowa to chemia nieorganiczna, chemia koordynacyjna, kataliza homogeniczna i nanokataliza. Jest autorką lub współautorką 114 publikacji i ponad 150 komunikatów konferencyjnych. Należy do American Chemical Society, Royal Society of Chemistry i PTChem. Od 2005 pełni funkcję Prodziekana Wydziału Chemii UWr. ds. Nauki.

ABSTRACT

The important role of palladium nanoparticles has been recently demonstrated in many catalytic systems designed for C–C bond forming reactions [1–4]. There are examples of catalytic systems described earlier as homogeneous in which Pd(0) nanoparticles were now identified. In the article three different palladium catalytic systems are discussed. In the first one, Pd(0) nanoparticles, obtained by chemical reduction of PdCl₂ and stabilized by polyvinylpyrrolidone, were used for Heck coupling in [Bu₄N]Br medium. Decrease of nanoparticles size in reaction conditions was explained as a result of dissolution of Pd(0) colloid and simultaneous formation of catalytically active monomolecular anionic palladium complexes [33]. The second example presents application of Pd(II) and Pd(0) supported on alumina-based oxides in Suzuki-Miyaura reaction [36]. Reduction of Pd(II) to Pd(0) nanoparticles under reaction conditions was confirmed. In contrast to the first described case, in Suzuki-Miyaura reaction the size of Pd(0) nanoparticles was the same before and after the catalytic cycle. The catalytic activity of both palladium forms was quite high, however Pd(0) formed *in situ* was slightly more efficient as catalyst. In the third part of the article studies of palladium reduction in anionic complexes of [IL]₂[PdX₄] type are shown, where IL = imidazolium cation [37]. These complexes catalyzed well Suzuki-Miyaura cross-coupling, but they were not stable under reaction conditions and decomposed to Pd(0) nanoparticles and Pd black. Using ESI-MS method it was possible to identify polynuclear (Pd₃, Pd₅) intermediate forms, stabilized with imidazolium cations or *N*-heterocyclic carbenes. In all systems discussed in the article co-existence of Pd(0) nanoparticles and monomolecular complexes was observed. That is important for understanding of the nature of catalytically active forms in C–C bond forming reactions.

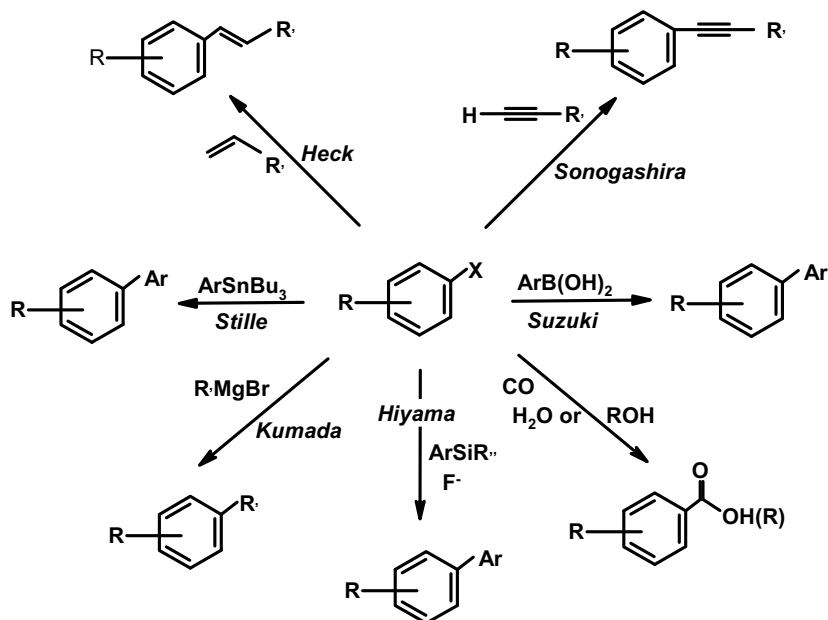
Keywords: C–C bond forming reactions, Heck reaction, Suzuki-Miyaura reaction, Pd(0) nanoparticles, palladium colloid, *N*-heterocyclic carbene

Słowa kluczowe: tworzenie wiązań C–C, reakcja Hecka, reakcja Suzuki-Miyaura, nano-cząstki Pd(0), koloid palladowy, karben *N*-heterocykliczny

WSTĘP

Reakcje tworzenia wiązań C–C katalizowane związkami metali przejściowych należą do ważnych procesów syntezy organicznej, które często umożliwiają otrzymanie skomplikowanych związków wielofunkcyjnych w prostszy sposób niż klasyczne metody syntezy organicznej [1–6]. Zainteresowanie tymi reakcjami jest związane głównie z szerokimi możliwościami zastosowania ich produktów do otrzymywania farmaceutyków czy środków ochrony roślin [3]. W porównaniu z metodyką typowej syntezy organicznej, wprowadzenie katalizatorów pozwala zwykle na uzyskanie produktów w krótszym procesie, złożonym z mniejszej liczby etapów, często bez konieczności wydzielania związków pośrednich. Ważną cechą reakcji katalitycznych jest także duża tolerancja na obecność grup funkcyjnych, które w stosowanych warunkach nie ulegają reakcjom, co pozwala uniknąć kłopotliwych procedur ich blokowania [7, 8]. Szczególnie atrakcyjne wydaje się zastosowanie reakcji katalitycznych w syntezie złożonych produktów naturalnych, zawierających w cząsteczce kilka różnych grup funkcyjnych. Produkty tego typu są bardzo cenne i wytwarza się je przeważnie w niewielkich ilościach. Zastosowanie odpowiednich katalizatorów umożliwia także selektywną syntezę określonych izomerów optycznych, co jest także wykorzystywane w produkcji farmaceutyków.

Przykłady reakcji tworzenia wiązań C–C przedstawiono na Rys. 1.



Rysunek 1. Reakcje tworzenia wiązań C–C katalizowane przez pallad
Figure 1. Palladium catalyzed C–C bond forming reactions

Wspólną cechą tych reakcji jest ten sam substrat, halogenek aryłowy. Wiadomo także, że najlepszych katalizatorów omawianych reakcji należy poszukiwać wśród związków palladu, ponieważ właśnie pallad jest najbardziej aktywny w reakcjach tworzenia wiązań C–C. Jedną z lepiej poznanych i szeroko stosowanych reakcji jest reakcja Hecka [4, 9, 10]. Produktami tej reakcji są arylowane olefiny, w szczególności mogą to być pochodne kwasu cynamonowego, jeśli R¹ jest grupą estrową. Substratami reakcji Hecka oprócz estrów, bywają inne funkcjonalizowane olefiny, jak np. alkohole czy nityle. Użycie pochodnych styrenu jako substratów w reakcji Hecka z halogenkiem aryłowym jest dogodną metodą otrzymywania stilbenów.

W reakcji Sonogashira otrzymuje się aryłowe pochodne alkinów, a modelową reakcją jest zwykle synteza difenyloacetyleny w wyniku sprzęgania halogenobenzenu z fenyloacetylenem [11]. Reakcje Suzuki, Stille, Kumada i Hiyama prezentują różne drogi prowadzące do produktów diarylowych, od najprostszego bifenylu do jego różnie podstawionych pochodnych. Wśród tych reakcji największym zainteresowaniem cieszy się reakcja Suzuki (Suzuki-Miyaura), ze względu na łatwą dostępność i stosunkowo niskie ceny kwasów fenyloboronowych [12–15].

Intensywny rozwój chemii związków krzemu i ich coraz większa dostępność w ostatnich latach spowoduje prawdopodobnie upowszechnienie reakcji Hiyamy [16, 17]. Pewną wadą tej reakcji jest konieczność stosowania ko-katalizatorów fluorowców, które, jak wykazały badania, ułatwiają aktywację wiązania Si–C w substracie silanowym. Ostatnio jednak pojawiają się doniesienia wskazujące na możliwość efektywnego zastosowania samych katalizatorów palladowych, bez wspomaganie solami fluorowcowymi, co znacznie upraszcza układ katalityczny [18].

Reakcje karbonylacji halogenków aryłowych przedstawiają dogodny sposób otrzymywania kwasów i estrów, zaczynając od najprostszych benzoesanów [19–21]. Synteza kwasów karboksylowych na drodze karbonylacji może być prowadzona w wodzie, jest więc dodatkowo przyjazną dla środowiska [22].

1. KATALIZATORY PALLADOWE

Pallad okazał się metalem najbardziej przydatnym jako katalizator reakcji tworzenia wiązań C–C, m.in. ze względu na łatwość aktywacji halogenków aryłowych w reakcji utleniającego przyłączenia, która stanowi kluczowy etap wszystkich omawianych reakcji.

Katalizatory, a raczej prekursorzy katalizatorów palladowych, można podzielić na trzy główne grupy:

1. Związki monomolekularne, rozpuszczalne w środowisku reakcji, będące prekursorami katalizatorów homogenicznych.
 - a) PdCl_2P_2 – kompleksy Pd(II) z ligandami fosforowymi, gdzie P = ligandy mono- lub bidentne, ligandy typu *pincer*,
 - b) PdCl_2L_2 , $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ – prekursorzy palladowe bez ligandów fosforowych, L = cod, PhCN, ligandy azotowe.

2. Nanocząstkowe koloidy Pd(0) stabilizowane rozpuszczalnymi polimerami, np. PVP (PVP = poliwinylpirolidon).
3. Prekursory heterogenizowane
 - a) kompleksy Pd(II) lub Pd(0) naniesione na nośniki nieorganiczne, głównie tlenki, np. Al_2O_3 ,
 - b) Pd(0) naniesiony na nośniki nieorganiczne lub nierozpuszczalne polimery.

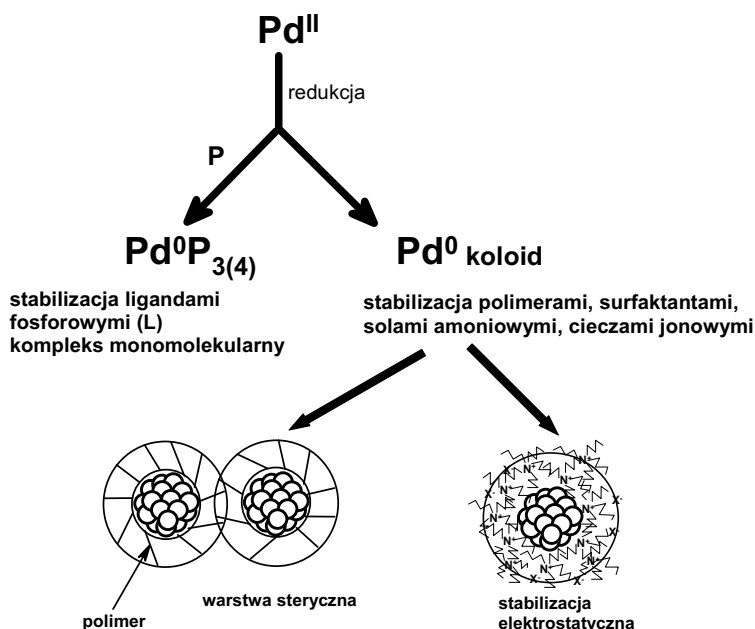
Podstawą przedstawionego podziału prekursorów palladowych jest ich rozpuszczalność w środowisku reakcji. Można oczywiście dokonać także klasyfikacji według innych kryteriów, na przykład ze względu na obecność ligandów fosforowych w układach katalitycznych.

Większość aktywnych układów zawiera ligandy fosforowe, skoordynowane do palladu lub wprowadzane jako wolne, często w znacznym nadmiarze w stosunku do metalu. Wiadomo, że poprzez modyfikacje ligandów fosforowych można w istotny sposób wpływać na wydajność i selektywność reakcji i dlatego synteza nowych, odpowiednio funkcjonalizowanych ligandów fosforowych, jest przedmiotem intensywnych prac [23, 24]. Jednak z punktu widzenia wymagań związanych z zieloną chemią, ostatnio rekomendowane są przede wszystkim układy, które nie zawierają ligandów fosforowych [25].

Stosując klasyfikację prekursorów palladowych opartą na ich rozpuszczalności warto zwrócić uwagę na nanocząstkowe koloidy Pd(0), które można uznać za postać pośrednią pomiędzy kompleksami monomolekularnymi i związkami heterogenizowanymi. Nanocząstki Pd(0) aktywne w reakcjach katalitycznych mają zwykle wielkość 2–20 nm i strukturę krystaliczną widoczną m.in. w pomiarach TEM. Tworzą regularny wielościan złożony z kilkuset atomów metalu, do których mogą się przyłączać ligandy i związki organiczne. Interesującymi przykładami takich struktur są opisane przez Moiseeva klastery o składzie $\text{Pd}_{561}\text{L}_{60}(\text{OAc})_{180}$ (L = phen, bipy) i $\text{Pd}_{561}(\text{phen})_{60}\text{O}_{60}(\text{PF}_6)_{60}$ [26].

Co ciekawe, wyniki współczesnych badań pokazują, że nanocząstki Pd(0) mogą tworzyć się *in situ* w układach reakcyjnych zarówno w wyniku redukcji palladu w kompleksach Pd(II), jak i z prekursorów heterogenizowanych w efekcie wymywania palladu z nośnika i następnie jego redukcji [27, 28]. Redukcja palladu przebiega zwykle dość łatwo, także w warunkach reakcji katalitycznych, i może kończyć się utworzeniem nieaktywnej czerni palladowej. Na Rys. 2 przedstawione są różne możliwości stabilizacji Pd(0) przeciwdziałające tworzeniu czerni. Redukcja palladu w obecności ligandów fosforowych prowadzi do utworzenia kompleksów typu PdP_3 lub PdP_4 , w zależności od zawady sterycznej liganda fosforowego. Jeśli ligandów fosforowych nie ma w układzie, to produktem redukcji palladu, mogą być nanocząstki palladu, pod warunkiem obecności czynnika stabilizującego, który może efektywnie zapobiegać aglomeracji nanocząstek. Czynnikiem stabilizującym poprzez tworzenie zawady sterycznej wokół nanocząstek są polimery i surfaktanty, natomiast sole amoniowe i ciecze jonowe są stabilizatorami elektrostatycznymi.

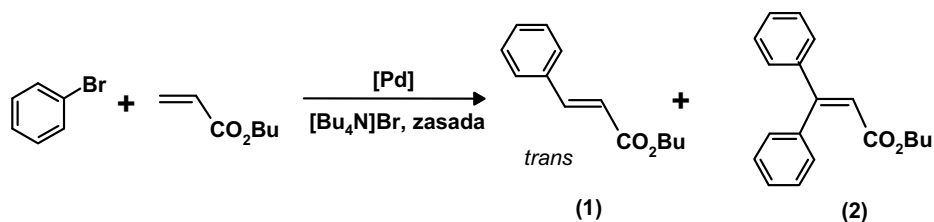
Jeśli stabilizujący polimer jest rozpuszczalny w środowisku reakcji katalitycznej (np. PVP = poliwinylpiperolidon jest rozpuszczalny w wodzie i w większości rozpuszczalników organicznych), to tworzy się koloidalny roztwór nanocząstek.



Rysunek 2. Tworzenie i stabilizacja Pd(0)
Figure 2. Formation and stabilization of Pd(0)

2. REAKCJA HECKA W STOPIONEJ SOLI [Bu₄N]Br

Pozytywny wpływ dodatku soli tetraalkiloamoniowych na wydajność reakcji Hecka został opisany po raz pierwszy przez Jeffery'a [29, 30]. Prowadzenie reakcji w stopionej soli, podobnie jak w cieczy jonowej, ma dodatkową zaletę polegającą na wyeliminowaniu z układu rozpuszczalnika organicznego. Ponadto możliwy jest efektywny rozdział katalizatora (rozpuszczalnego w stopionej soli) od substratów i produktów organicznych, co sprzyja otrzymaniu czystych produktów wolnych od zanieczyszczeń związkami palladu. Oddzielony katalizator może być ponownie zastosowany, co obniża koszt całego procesu. W modelowej reakcji Hecka (Rys. 3) zastosowano nadmiar bromobenzenu w stosunku do akrylanu butylu, co pozwoliło na otrzymanie dwóch produktów – cynamonianu butylu (1) i fenylocynamonianu butylu (2) [31]. Katalizatorami reakcji były proste związki Pd(II) bez ligandów fosforowych, kolid Pd(0) stabilizowany PVP oraz Pd(II) i Pd(0) naniesione na Al₂O₃. Wszystkie reakcje prowadzono w takich samych warunkach w stopionym [Bu₄N]Br i nieoczekiwanie uzyskano bardzo podobne wyniki (Rys. 4) [30, 32, 33].



[Pd] = PdCl₂(PhCN)₂, [Bu₄N]₂[PdBr₄], Pd(0)/PVP, Pd(0)/Al₂O₃, Pd(II)/Al₂O₃

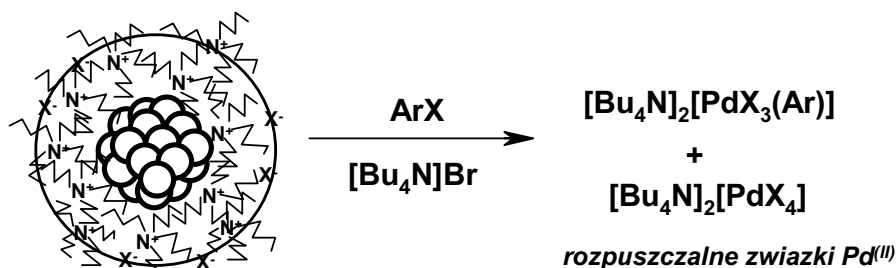
Rysunek 3. Schemat reakcji Hecka
Figure 3. Heck reaction scheme

POCZĄTKOWA POSTAĆ PREKURSORA KATALIZATORA		
HOMO(geniczna)	NANO(rozmiarowa)	HETERO(genizowana)
PdCl ₂ (PhCN) ₂ 4% monoarylowy 96% diarylowy	Pd ⁽⁰⁾ /PVP 5% monoarylowy 95% diarylowy	Pd ^(II) /Al ₂ O ₃ 13% monoarylowy 87% diarylowy
[Bu ₄ N] ₂ [PdBr ₄] 2% monoarylowy 98% diarylowy		Pd ⁽⁰⁾ /Al ₂ O ₃ 17% monoarylowy 83% diarylowy
ROZPUSZCZALNE		NIEROZPUSZCZALNE

Rysunek 4. Wydajność reakcji Hecka z różnymi katalizatorami palladowymi
Figure 4. The yield of Heck reaction with different palladium catalysts

Głównym produktem reakcji, którego wydajność wynosiła od 83 do 98%, był fenylcynamonian butylu (2), natomiast cynamonian butylu otrzymano z wydajnością 4–17%.

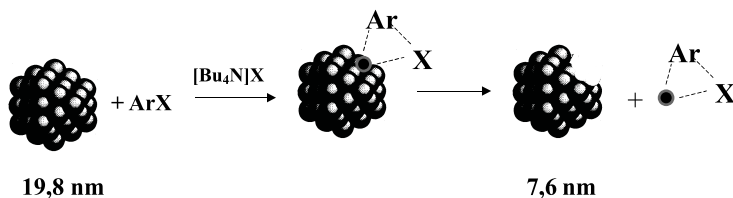
Podobna aktywność katalityczna badanych układów sugerowała, że we wszystkich przypadkach aktywna forma katalizatora jest taka sama, to przypuszczalnie potwierdziły badania przeprowadzone *in situ* w układach katalitycznych. Okazało się, że w obecności soli tetrabutylamoniowej i halogenku arylowego koloidu palladowy tworzy rozpuszczalne kompleksy anionowe typu [Bu₄N]₂[PdX₃Ar] (X = Cl, Br, I) (Rys. 5). Tworzenie tych kompleksów powoduje zmniejszenie średnich rozmiarów nanocząstek palladu, a wielkość tego efektu zależy od rodzaju halogenku arylowego ArX i jest największy dla X = I. W modelowej reakcji koloidu Pd/PVP z ArI w środowisku [Bu₄N]Br średnica nanocząstek zmniejszyła się od 19,8 nm do 7,6 nm (Rys. 6). Równocześnie badania metodami XPS i UV-VIS wykazały obecność anionowych kompleksów Pd(II), [Bu₄N]₂[PdX₃Ar] i [Bu₄N]₂[PdX₄] [33].



koloid Pd⁽⁰⁾ stabilizowany [Bu₄N]X

Rysunek 5. Tworzenie monomolekularnych kompleksów Pd(II) z koloidu Pd(0)

Figure 5. Formation of monomolecular Pd(II) complexes from Pd(0) colloid



Rysunek 6. Redispersja koloidu Pd(0) w obecności halogenku aryłowego i soli tetrabutylamoniowej

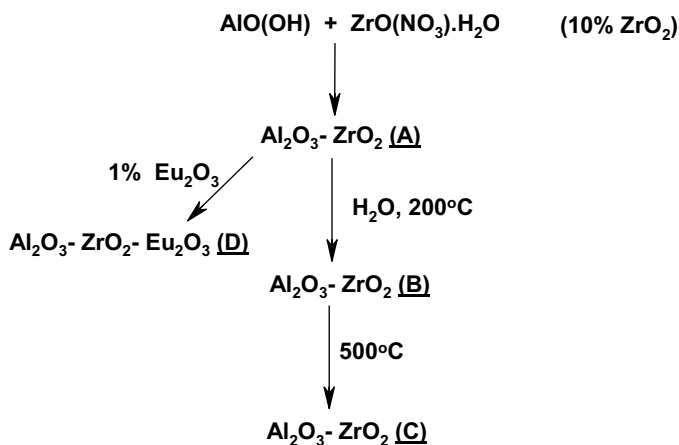
Figure 6. Redispersion of Pd(0) colloid in the presence of aryl halide and tetrabutylammonium salt

Podobna reakcja, z udziałem halogenku aryłowego i bromku tetrabutylamoniowego oraz palladu naniesionego na Al₂O₃, powodowała wymywanie palladu z nośnika do roztworu [32]. Przyczyną tego zjawiska było, podobnie jak w poprzednim przypadku, tworzenie najpierw produktu utleniającego przyłączenia na powierzchni nośnika, a następnie lepiej rozpuszczalnych, kompleksów anionowych. Warto podkreślić, że tworzenie anionowych związków palladu może być tylko jednym z etapów procesu katalicznego. Związki te mogą ulegać redukcji do nanocząstek w środowisku reakcji katalicznej lub osadzać się ponownie na nośniku. Proces readsorpcji związków palladu był intensywnie badany m.in. przez Kohlera, który wykazał, że na końcu reakcji katalicznej praktycznie cały pallad jest związany ponownie przez nośniki typu tlenków [34, 35].

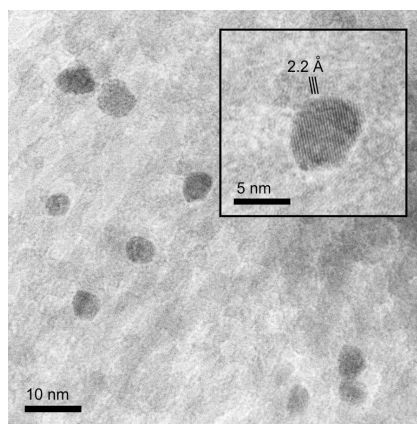
Podsumowując można stwierdzić, że w środowisku soli tetraalkiloamoniowej wszystkie prekursorzy palladowe, które nie zawierają ligandów fosforowych, tworzą takie same rozpuszczalne związki anionowe. Nie można jednak wykluczyć, że w reakcji katalicznej biorą udział, oprócz tych związków, także nanocząstki Pd(0) oraz Pd(0) związany z nośnikiem.

3. Pd(0) I Pd(II) NANIESIONY NA TLENKI NIEORGANICZNE

Tlenki nieorganiczne, np. tlenki glinu, krzemu, cyrkonu, tytanu, a także tlenki mieszane, zawierające Al + Zr, Al + Mg, Al + Fe, stanowią bardzo dobre nośniki dla katalizatorów palladowych. Są to materiały porowate o powierzchniach właściwych ok. 200 m²/g i porach o wielkości 2–20 nm. Tlenki nieorganiczne otrzymane metodą zol-żel można następnie poddać obróbce hydrotermalnej lub kalcynacji (Rys. 7), co powoduje modyfikację powierzchni [36]. Tak przygotowane nośniki wiążą PdCl₂, który w wyniku redukcji hydrazyną tworzy nanocząstki Pd(0) rozmieszczone na powierzchni lub w porach nośnika (Rys. 8).

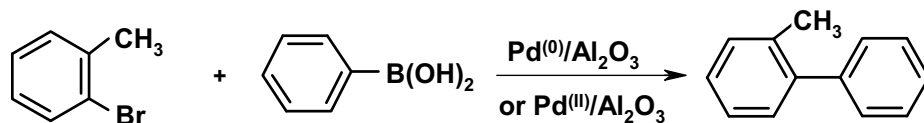


Rysunek 7. Synteza nośników nieorganicznych
Figure 7. Synthesis of inorganic supports



Rysunek 8. Obraz TEM nanocząstek Pd(0) na nośniku Al₂O₃-ZrO₂
Figure 8. TEM picture of Pd(0) nanoparticles on Al₂O₃-ZrO₂ support

Nanocząstki Pd(0) na nośnikach tlenkowych okazały się dobrymi katalizatorami reakcji Suzuki-Miyaura (Rys. 9) już w temperaturze 40°C [36]. Po 4 h reakcji uzyskiwano od 50 do 90% 2-metylobifenylu. Interesujące, że średnica nanocząstek nie ulegała istotnej zmianie podczas reakcji i pozostawała równa ok. 11 nm. Katalizator zachowywał się więc zupełnie inaczej niż w warunkach reakcji Hecka w środowisku soli tetraalkiloamoniowej. Jeszcze lepsze wyniki w reakcji Suzuki-Miyaura uzyskano stosując Pd(II) naniesiony na tlenki $\text{Al}_2\text{O}_3 + \text{ZrO}_2$, ale bez wcześniejszej redukcji hydrazyną. Analiza katalizatorów po reakcji pokazała, że na nośnikach znajdują się nanocząstki Pd(0) o średniej wielkości ok. 7 nm, które powstały *in situ*. Ten sposób prowadzenia reakcji umożliwiał otrzymanie produktu z wydajnością ponad 95% już w temperaturze 40°C. Otrzymane wyniki pokazują, że redukcja palladu w warunkach reakcji katalitycznej prowadzi do mniejszych i bardziej aktywnych nanocząstek niż redukcja hydrazyną lub metanolem.



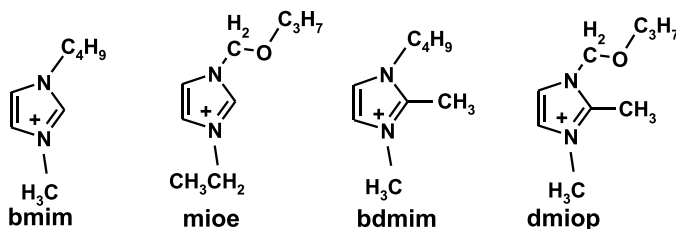
Rysunek 9. Schemat reakcji Suzuki-Miyaura
Figure 9. Scheme of Suzuki-Miyaura reaction

4. WPLYW CIECZY JONOWYCH NA TWORZENIE NANOCZĄSTEK Pd(0)

Redukcję palladu w warunkach reakcji Suzuki-Miyaura zaobserwowano nie tylko dla palladu naniesionego na nośnik, ale także wtedy, gdy jako prekursorów katalizatorów użyto kompleksy anionowe typu $[\text{IL}]_2[\text{PdX}_4]$, gdzie IL = kation imidazoliowy [37]. Badania aktywności katalitycznej tych kompleksów pokazały, że wydajność produktu zależy od rodzaju kationu imidazoliowego. Najwyższe wydajności 2-metylobifenylu otrzymano dla kompleksu z kationem IL = dmiop zawierającym grupę eterową związaną z azotem imidazoliowym (Rys. 10). Zaobserwowany wpływ kationu imidazoliowego na wydajność reakcji Suzuki-Miyaura był początkowo trudny do zrozumienia, ponieważ wydawało się, że kompleksy $[\text{IL}]_2[\text{PdX}_4]$, prekursorzy reakcji Suzuki-Miyaura, ulegają rozkładowi w taki sam sposób. Pojawienie się ciemnej barwy roztworu sugerowało tworzenie się czerni palladowej. Dalsze badania pokazały jednak, że proces jest bardziej skomplikowany.

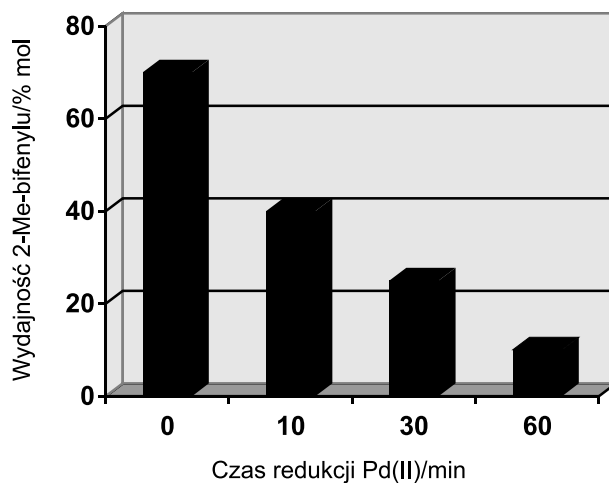
Prekursor katalizatora	Wydajność (%)
[bmim] ₂ [PdCl ₄]	52
[bdmim] ₂ [PdBr ₄]	58
[dmiop] ₂ [PdCl ₄]	70
[mioe] ₂ [PdCl ₄]	36

[Pd] $1 \cdot 10^{-5}$ mol; PhBrCH₃ $1 \cdot 10^{-3}$ mol; PhB(OH)₂ $1.1 \cdot 10^{-3}$ mol;
KOH $1.95 \cdot 10^{-3}$ mol; 2-propanol 3 ml; temp 40°C



Rysunek 10. Wydajność 2-metylobifenylu otrzymanego w reakcji Suzuki-Miyaury z różnymi prekursorami palladowymi

Figure 10. The yield of 2-methylbiphenyl obtained in Suzuki-Miyaura reaction with different palladium precursors



Rysunek 11. Wydajność 2-Me-bifenylu w reakcji Suzuki-Miyaury w zależności od czasu redukcji prekursora [dmiop]₂[PdCl₄] przed wprowadzeniem substratów

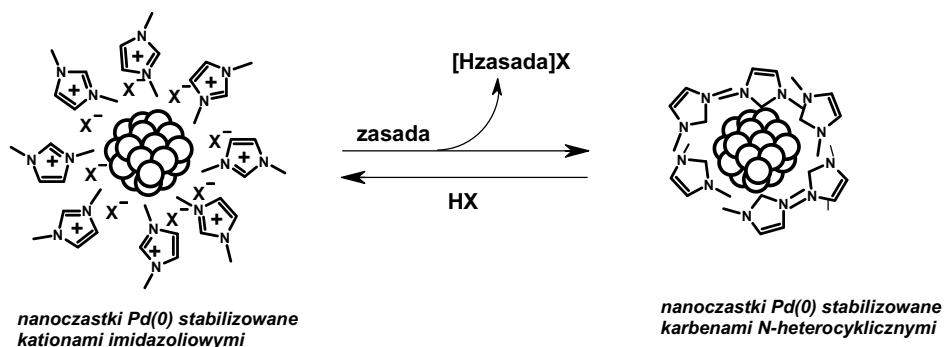
Figure 11. The yield of 2-Me-biphenyl obtained in the Suzuki-Miyaura reaction over different reduction time of [dmiop]₂[PdCl₄] before introduction of substrates

Kompleksy palladu $[\text{IL}]_2[\text{PdX}_4]$ ulegały rozkładowi z utworzeniem Pd(0) już w obecności samego rozpuszczalnika (ROH) i zasady (KOH). Wpływ tego procesu na przebieg reakcji Suzuki-Miyaura jest widoczny na Rys. 11, gdzie przedstawiono zależność wydajności reakcji od czasu przechowywania roztworu $[\text{IL}]_2[\text{PdX}_4]$, w temperaturze 40°C, przed dodaniem reagentów (halogenku arylowego i kwasu fenyloboronowego). Wydłużanie tego czasu powodowało obniżenie wydajności. Otrzymano 70% 2-Me-bifenylu w reakcji, w której substraty dodano od razu do roztworu zawierającego $[\text{IL}]_2[\text{PdX}_4]$ i KOH w ROH, a tylko 10% kiedy przed wprowadzeniem substratów roztwór zawierający prekursor palladowy był pozostawiony na 1 h.

Badania metodą XRD wykazały obecność w mieszaninie nanocząstek Pd(0), których rozmiar wzrastał od 4 do 7 nm wraz z wydłużaniem czasu przechowywania roztworu katalizatora bez substratów. Wyniki tego eksperymentu świadczą o aglomeracji nanocząstek palladu w czasie i równoczesnym obniżeniu ich aktywności. Jednak mimo to, uzyskiwano stosunkowo wysokie wydajności reakcji Suzuki-Miyaura katalizowanej przez kompleksy $[\text{IL}]_2[\text{PdX}_4]$, co sugerowało działanie czynników stabilizujących nanocząstki i ograniczających ich aglomerację. Badania metodą ESI-MS pokazały, że w obecności ROH/KOH kompleksy $[\text{IL}]_2[\text{PdX}_4]$ ulegają przekształceniu w kompleksy Pd(0) monomeryczne ($[\text{bmim}]_3\text{Pd}(\text{OH})_2$) i wielordzeniowe ($[\text{bmim}]_x\text{Pd}_3(\text{H}_2\text{O})_7$).

Szczególnie interesujące jest tworzenie form wielometalicznych, ponieważ można je uznać za prekursory nanocząstek palladu. W zidentyfikowanych formach pallad znajduje się w otoczeniu kationów imidazoliowych lub karbenów *N*-heterocyklicznych, utworzonych przez deprotonację kationu imidazoliowego. Na przykład, jon o ładunku +1 i składzie $[[\text{bmim}]_5\text{Pd}_3(\text{H}_2\text{O})]^+$ prawdopodobnie zawiera jeden kation imidazoliowy i cztery ligandy karbenowe: $[[\text{bmim}][\text{bmim-y}]_4\text{Pd}_3(\text{H}_2\text{O})]^+$. Propozycja taka wynika z faktu, że tylko kation imidazoliowy posiada ładunek, podczas gdy karben jest cząsteczką obojętną. W obecności kwasu fenyloboronowego udało się zidentyfikować związek fenyłowy, $[[\text{bmim}]_3\text{PdPh}]^+$ w którym pallad jest na +2 stopniu utlenienia. Alternatywnie może to być kation Pd(0) o składzie $[[\text{bmim}][\text{bmim-y}]_2\text{PdPh}]^+$. Związek fenyłowy odgrywa ważną rolę w cyklu katalitycznym reakcji Suzuki-Miyaura, można go określić jako jedną z form aktywnych.

Ważnym rezultatem przedstawionych badań jest stwierdzenie, że kationy imidazoliowe są łatwo transformowane do karbenów i odwrotnie: karbeny *N*-heterocykliczne mogą ulegać protonacji tworząc kationy imidazoliowe. Obie formy oddziałują z palladem zredukowanym tworząc odpowiednie kationy (Rys. 12), a samo oddziaływanie ma stabilizujący wpływ na tworzenie się nanocząstek palladu, co przeciwdziała ich aglomeracji.



Rysunek 12. Różne sposoby stabilizacji nanocząstek Pd(0)
 Figure 12. Different examples of stabilization of Pd(0) nanoparticles

PODSUMOWANIE

Nanocząstki Pd(0) można uznać za katalizatory o właściwościach pośrednich pomiędzy rozpuszczalnymi kompleksami palladu, które tworzą układy homogeniczne, a katalizatorami heterogenicznymi. Reakcje katalityczne mogą zachodzić na powierzchni nanocząstek, prawdopodobnie głównie na krawędziach lub miejscach zdefektowanych, co przypomina działanie katalizatorów heterogenicznych. Znane są także liczne przykłady układów, w których nanocząstki stanowią źródło rozpuszczalnych kompleksów palladu, prekursorów katalizatorów homogenicznych.

W artykule przedstawiono przykład układu katalitycznego, w którym nanocząstki Pd(0) powstają z kompleksu Pd(II) użytego jako prekursor. Podobnie, tworzenie nanocząstek Pd(0) zaobserwowano podczas reakcji Suzuki-Miyaura z Pd(II) naniesionym na nośnik tlenkowy. W świetle tych wyników można przyjąć, że niezależnie od rodzaju użytego prekursora palladowego, nanocząstki Pd(0) odgrywają istotną rolę w reakcjach tworzenia wiązań C-C.

PODZIĘKOWANIE

Praca realizowana w ramach grantu MNiSW PZB-KBN-118/T09/2004/06. W badaniach przedstawionych w artykule uczestniczyli doktoranci z Zespołu Katalizy Homogenicznej: dr Wojciech Wojtków, dr Iweta Pryjomska-Ray, mgr inż. Andrzej Gniewek, mgr Wojciech Zawartka i mgr Michał Szulmanowicz.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] B. Cornils, W. A. Herrmann (Eds.), *Applied Homogeneous Catalysis with Organometallic Compounds: A Comprehensive Handbook in Two Volumes*, VCH, Weinheim, 1996.

- [2] F. Diederich, P.J. Stang (Eds.), *Metal-Catalyzed Cross-Coupling Reactions*, VCH, Weinheim, 1997.
- [3] M. Beller (Ed.), *Transition Metals for Organic Synthesis; Building Blocks and Fine Chemicals*, VCH, Weinheim, 2004.
- [4] P. Beletskaya, A.V. Cheprakov, *Chem. Rev.*, 2000, **100**, 3009.
- [5] A.M. Trzeciak, J.J. Ziółkowski, *Coord. Chem. Rev.*, 2005, **249**, 2308.
- [6] A.M. Trzeciak, J.J. Ziółkowski, *Coord. Chem. Rev.*, 2007, **251**, 1281.
- [7] J. Gawroński, K. Gawrońska, K. Kacprzak, M. Kwit, *Współczesna synteza organiczna. Wybór eksperymentów*. PWN, warszawa, 2004.
- [8] J. Tsuji, *Palladium Reagents and Catalysts. New Perspectives for the 21st century*, Wiley, 2004.
- [9] R.F. Heck, *Acc. Chem. Res.*, 1979, **12**, 146.
- [10] F. Alonso, I.P. Beletskaya, M. Yus, *Tetrahedron*, 2005, **61**, 230.
- [11] K. Sonogashira, [w:] *Handbook of Organopalladium Chemistry for Organic Syntheses*, ed. E. Negishi, Wiley & Sons, New York, 2002.
- [12] N. Miyaura, A. Suzuki, *Chem. Rev.*, 1995, **95**, 2457.
- [13] F. Bellina, A. Carpita, R. Rossi, *Synthesis*, 2004, 2419.
- [14] R.B. Bedford, C.S.J. Cazin, *Coord. Chem. Rev.*, 2004, **248**, 2283.
- [15] N.T.S. Phan, M. van der Sluys, C.W. Jones, *Adv. Synth. Catal.*, 2006, **348**, 609.
- [16] Y. Hatanaka, T. Hiyama, *J. Org. Chem.*, 1988, **53**, 918.
- [17] T. Hiyama, *J. Organomet. Chem.*, 2002, **653**, 58.
- [18] B.C. Rann, R. Dey, K. Chattopadhyay, *Tetrahedron Lett.*, 2008, **49**, 3430.
- [19] M. Beller, B. Cornils, C.D. Frohling, C.W. Kohlpaintner, *J. Mol. Catal. A: Chem.*, 1995, **104**, 17.
- [20] R. Skoda-Foldes, L. Kollar, *Curr.Org.Chem.*, 2002, **6**, 1097.
- [21] W. Wojtków, A.M. Trzeciak, R. Choukroun, J.L. Pellegatta, *J. Mol. Catal. A: Chem.*, 2004, **224**, 81.
- [22] A.M. Trzeciak, J.J. Ziółkowski, *J. Mol. Catal. A: Chem.*, 2000, **154**, 93.
- [23] N.J. Whitcombe, K.K. Hii, S.E. Gibson, *Tetrahedron*, 2001, **57**, 7449.
- [24] W.A. Herrmann, V.P.W. Bohm, *J. Organomet. Chem.*, 1999, **572**, 141.
- [25] E. Peris, R.H. Crabtree, *Coord. Chem. Rev.*, 2004, **248**, 2239.
- [26] M.N. Vargaftik, V.P. Zagorodnikov, I.P. Stolarov, I.I. Moiseev, D.I. Kochubey, V.A. Likhobolov, A.L. Churilin, K.I. Zamarayev, *J. Mol. Catal.*, 1989, **53**, 315.
- [27] J.G. de Vries, *Dalton Trans.*, 2006, 421.
- [28] D. Astruc, *Inorg. Chem.*, 2007, **46**, 1884.
- [29] T. Jeffery, J.-C. Galland, *Tetrahedron Lett.*, 1994, **35**, 4103.
- [30] T. Jeffery, M. David, *Tetrahedron Lett.*, 1998, **39**, 5751.
- [31] I. Pryjomska-Ray, A.M. Trzeciak, J.J. Ziółkowski, *J. Mol. Catal. A: Chem.*, 2006, **257**, 3.
- [32] I. Pryjomska-Ray, A. Gniewek, A.M. Trzeciak, J.J. Ziółkowski, W. Tylus, *Topics in Catal.*, 2006, **40**, 173.
- [33] A. Gniewek, A.M. Trzeciak, J.J. Ziółkowski, L. Kępiński, J. Wrzyszczyk, W. Tylus, *J. Catal.*, 2005, **229**, 332.
- [34] K. Köhler, R.G. Heidenreich, J.G.E. Krauter, J. Pietsch, *Chem. Eur. J.*, 2002, **8**, 622.
- [35] S.S. Pröckl, W. Kleist, M.A. Gruber, K. Köhler, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2004, **43**, 1881.
- [36] A. Gniewek, J.J. Ziółkowski, A.M. Trzeciak, M. Zawadzki, H. Grabowska, J. Wrzyszczyk, *J. Catal.*, 2008, **254**, 121.
- [37] W. Zawartka, A. Gniewek, A.M. Trzeciak, J.J. Ziółkowski, J. Pernak, *J.Mol.Catal. A: Chem.*, w druku.

**SPEKTROFOTOMETRYCZNE
I ELEKTROCHEMICZNE METODY OZNACZANIA
AKTYWNOŚCI ANTYOKSYDACYJNEJ**

**SPECTROPHOTOMETRIC AND ELECTROCHEMICAL
METHODS FOR DETERMINATION OF ANTIOXIDANT
ACTIVITY**

Jan Małyшко*, Monika Karbarz

*Uniwersytet Humanistyczno-Przyrodniczy Jana Kochanowskiego, Instytut Chemii,
ul. Świętokrzyska 15, 25-408 Kielce
malyszko@pu.kielce.pl*

Abstract

Wstęp

1. Metoda TEAC

2. Metoda DPPH

3. Metody FRAP I CUPRAC

4. Metoda Folin-Ciocalteu (FC)

5. Metody elektrochemiczne

6. Substancje wzorcowe

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane

Dr hab. Jan Małyszko jest absolwentem Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego (1958). Stopień naukowy doktora nauk chemicznych uzyskał na Uniwersytecie Warszawskim (1966), a doktora habilitowanego na Uniwersytecie Marii Curie Skłodowskiej (1978). Obecnie jest emerytowanym profesorem chemii Uniwersytetu Humanistyczno-Przyrodniczego Jana Kochanowskiego (UJK) w Kielcach. Jego zainteresowania skupiają się wokół mechanizmu i kinetyki procesów elektrodowych oraz elektrochemii i elektroanalitycznego oznaczania związków o znaczeniu biologicznym.

Dr Monika Karbarz ukończyła w 2002 r. studia chemiczne na Wydziale Matematyczno-Przyrodniczym Akademii Świętokrzyskiej (obecnie UJK). Pracuje na stanowisku asystenta w Zakładzie Chemii Analitycznej Instytutu Chemii tegoż Uniwersytetu. Stopień doktora nauk chemicznych uzyskała w lipcu 2008 r. na Wydziale Chemicznym Politechniki Rzeszowskiej za rozprawę na temat mechanizmu anodowego utleniania troloksu (antyoksydanta) w środowiskach o zróżnicowanej aktywności protonów.

ABSTRACT

In the last decades, free radicals have been discussed to play a key role in the pathology of several diseases, such as cancer, arteriosclerosis or inflammatory diseases [1, 2]. Numerous dietary antioxidants, *e.g.* vitamin C, phenolic and polyphenolic compounds as well as carotenoids are considered as effective agents in prevention of these diseases [4]. The chemical diversity of antioxidants occurring in food makes it difficult to separate individual antioxidant compounds from the animal or vegetable matrix and quantify them. Antioxidant activity is widely used as a parameter to characterize the redox status of different biological or dietary samples. Many analytical methods for determining of total antioxidant activity (TAA) have been proposed in the literature of the last decade.

The present review deals with the methods involving electron-transfer reactions with chromogen compounds: the trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) [6–29], the DPPH assay [31–41], the ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay [42–48], the cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) assay [49–55], and the Folin-Ciocalteu (FC) method [56]. These assays enable to measure the activity of an antioxidant through the reduction of an oxidizing agent, which changes colour during the redox reaction. The degree of colour change corresponds to the concentration of antioxidant in the sample. The main purpose of this review is to describe and discuss the chemical fundamentals of these methods. The applications of voltammetry and other electroanalytical methods were also demonstrated [58–71]. In addition, properties and the use of reference compounds in the antioxidant activity assessment was considered [72–85].

The summary contains conclusions on the scope of application, the most important advantages and shortcomings of the methods described [50, 86–88].

Keywords: antioxidants; free radicals; total antioxidant capacity

Słowa kluczowe: antyoksydanty (przeciwutleniacze); wolne rodniki; całkowita aktywność antyoksydacyjna

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

ABTS	– 2,2'-azynobis(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonian)
DPPH	– 1,1-difenylo-2-pikrylohydrazyl
FRAP	– ang. <i>ferric reducing antioxidant power</i>
RFT	– reaktywne formy tlenu (ang. <i>reactive oxygen species</i> , ROS)
SHE	– standardowa elektroda wodorowa (ang. <i>standard hydrogen electrode</i>)
TAA	– całkowita aktywność antyoksydacyjna (ang. <i>total antioxidant activity</i>)
TEAC	– ang. <i>trolox equivalent antioxidant capacity</i>
Troloks	– kwas 6-hydroksy-2,5,7,8-tetrametylochromano-2-karbo- ksylowy

WSTĘP

Wolne rodniki uczestniczą w procesach biochemicznych i fizjologicznych zachodzących w żywych organizmach. Główną rolę w powstawaniu wolnych rodników w komórkach odgrywa tlen, którego różne reaktywne formy biorą udział w procesach metabolicznych. Należy do nich anionorodnik ponadtlenkowy (O_2^-), rodnik wodoronadtlenkowy (HO_2^{\cdot}), rodnik hydroksylový (OH^{\cdot}), tlenek azotu (NO^{\cdot}), jak również indywidua, które nie są wolnymi rodnikami: nadtlenuk wodoru (H_2O_2), nadtlenuozotan(III) ($ONOO^-$) oraz tlen singletowy (1O_2). Reakcje wolnych rodników z kwasami nukleinowymi, białkami oraz lipidami komórek organizmu prowadzą z kolei do powstania wolnych rodników organicznych. Zagadnienie to zostało obszernie opisane w monografii Bartosza [1].

W zdrowym organizmie zachowana jest równowaga między wytwarzaniem a usuwaniem wolnych rodników. Naruszenie tej równowagi na korzyść wolnych rodników i innych reaktywnych form tlenu (RFT) wytwarza tzw. stres oksydacyjny, mogący prowadzić do szeregu chorób degeneracyjnych i nowotworowych, a także przyspieszający procesy starzenia się organizmu [2].

Organizmy żywe bronią się przed nadmiarem wolnych rodników za pomocą rozmaitych mechanizmów antyoksydacyjnych. Ochrona antyoksydacyjna żywej komórki wykorzystuje szereg związków, które można ogólnie podzielić na następujące grupy: (1) enzymy ochronne, (2) inne związki wielkocząsteczkowe oraz (3) antyoksydanty (przeciwutleniacze) niskocząsteczkowe. Do pierwszej grupy należą przede wszystkim enzymy rozkładające RFT na drodze katalitycznej i przyspieszające dysproporcjonowanie wolnych rodników. Do drugiej grupy zalicza się szereg protein, m.in. albuminę i ferrytynę, oraz szereg polipeptydów.

Działanie ostatniej grupy omawianych substancji, antyoksydantów (przeciwutleniaczy) niskocząsteczkowych, polega na wchodzeniu w reakcje redoks z czynnikami utleniającymi. Według Halliwella i Gutteridge'a [3] pod pojęciem antyoksydanta należy rozumieć substancję, która występując w małych stężeniach, w porównaniu z substratem (substancją ulegającą utlenieniu), znacznie opóźnia lub zapobiega utlenieniu tegoż substratu.

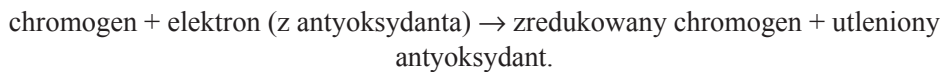
Antyoksydanty niskocząsteczkowe można podzielić na endogenne i egzogenne. Pierwsza grupa obejmuje związki wytwarzane przez organizm ludzki, w tym tripeptyd glutation, koenzym Q_{10} , a wśród hormonów estron i estradiol oraz melatoninę. Niektóre z antyoksydantów endogennych, jak kwas moczowy, bilirubina i kwas α -liponowy, są produktami metabolizmu. Antyoksydanty egzogenne są dostarczane z żywnością lub w postaci suplementów (jako nutraceutyki). Większość z nich stanowią związki naturalne pochodzenia roślinnego.

Z analitycznego punktu widzenia bardzo istotny jest podział antyoksydantów pod względem ich rozpuszczalności, gdyż ona warunkuje wybór rozpuszczalnika do prowadzenia oznaczeń. Najliczniejszą grupę stanowią antyoksydanty rozpuszczalne w wodzie, m.in. kwas askorbinowy i kwas moczowy. Do tej grupy należy zaliczyć flawonoidy, mimo że ich rozpuszczalność w wodzie jest znacznie ograni-

czona. Kolejną grupę tworzą antyoksydanty o stosunkowo dużych rozmiarach cząsteczek, a w konsekwencji o właściwościach hydrofobowych, rozpuszczalne w tłuszczach. Wśród nich znajdują się tokoferole i tokotrienole (składniki witaminy E), koenzym Q₁₀, retinol (witamina A) oraz kalcyferole (witamina D). Substancje te odgrywają ważną rolę w ochronie lipidowych membran komórek przed działaniem reaktywnych form tlenu. Przegląd działania antyoksydantów pochodzenia naturalnego można znaleźć w artykule Sroki i in. [4].

Oznaczenie zawartości poszczególnych antyoksydantów w badanym materiale i zsumowanie ich aktywności jest czynnością bardzo pracochłonną, mało skuteczną i nie zawsze możliwą. Dodatkowe komplikacje może spowodować występowanie efektu synergetycznego, w przypadku obecności kilku antyoksydantów. Bardziej skuteczne wydawało się zatem oznaczenie całkowitej aktywności antyoksydacyjnej (ang. *total antioxidant activity*, TAA) danego materiału. Metody oznaczania TAA można ogólnie podzielić na dwie grupy, oparte na: (1) reakcjach wymiany elektronu (ang. *electron transfer*, ET) oraz (2) reakcjach przeniesienia atomu wodoru (ang. *hydrogen atom transfer*, HAT).

Przedmiotem tego przeglądu są metody oznaczania TAA obiektu na podstawie jego właściwości redukujących. Oznaczanie opiera się na reakcji redoks z chromogenem wykazującym łagodne zdolności utleniające, zachodzącej według schematu:



Jeżeli chromogen redukuje się do substancji bezbarwnej, to przebieg reakcji można śledzić spektrofotometrycznie obserwując zanik absorpcji przez badaną próbkę. Im więcej antyoksydantów zawiera próbka, tym łatwiej następuje zanik barwy.

Opisany przebieg reakcji można również monitorować spektrofлуometrycznie, jeżeli substancja indykatorowa lub produkt jej redukcji ma właściwości fluoryzujące. Do tej grupy, której nie będziemy bliżej omawiać, należy m.in. metoda ORAC (ang. *oxygen radical absorbance capacity*) [5]. Uważa się, że jest ona oparta na reakcji przeniesienia atomu wodoru.

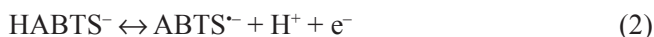
1. METODA TEAC

Najczęściej stosowana w praktyce metoda oznaczania TAA polega na wykorzystaniu zaniku barwy rodnika generowanego przez utlenianie 2,2'-azynobis((3-etylobenzotiazolino-6-sulfonianu) amonowego, znanego pod akronimem ABTS. W roztworze wodnym dominującą formą tego związku jest anion ABTS²⁻. W silnie zakwaszonych roztworach następuje ilościowe przyłączenie protonu z utworzeniem HABTS⁻. Stała równowagi reakcji dysocjacji



została wyznaczona przez Scott i in. [6] jako $\text{p}K_a = 2,08 \pm 0,02$.

Właściwościom elektrochemicznym ABTS w roztworach wodnych były poświęcone dość liczne publikacje, stanowiąc klucz do właściwości redoks form tego związku na różnych stopniach utlenienia. Podstawowe badania przeprowadzili autorzy cytowanej już pracy [6]. Posługując się woltamperometrią cykliczną na elektrodach ze szklanego węgla wykazali, że anodowe utlenianie formy protonowanej HABTS^- , w $1,5 \text{ mol L}^{-1}$ roztworze HClO_4 , przebiega przez dwa dobrze rozdzielone, odwracalne stadia jednoelektronowe:



Na tej podstawie zostały wyznaczone potencjały formalne par redoks $\text{HABTS}^-/\text{ABTS}^{\cdot-}$ oraz $\text{ABTS}^{\cdot-}/\text{ABTS}^0$, które wynoszą odpowiednio 0,81 i 1,09 V względem SHE.

Anodowe utlenianie ABTS w buforze octanowym, pH 4–5, daje przebieg pierwszego pików anodowego i katodowego podobny jak w środowisku silnie kwaśnym, jeżeli zmiana kierunku skanowania następuje przed osiągnięciem drugiego pików anodowego. Zmienia się tylko położenie pierwszej pary pików, związanej w tym przypadku z reakcją elektrodową



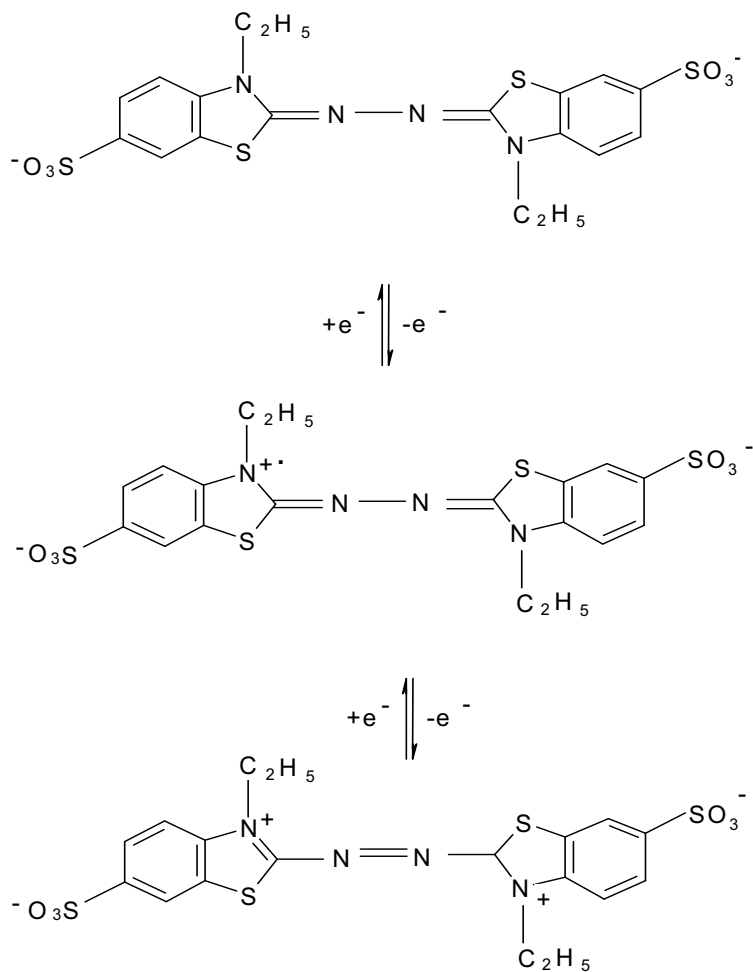
Jest to zgodne ze znaną w elektrochemii regułą, że anodowe utlenianie form nieprotonowanych zachodzi przy potencjałach niższych niż sprzężonych z nimi form protonowanych. Wyznaczony na tej podstawie potencjał formalny układu $\text{ABTS}^{2-}/\text{ABTS}^{\cdot-}$ wynosi 0,68 V względem SHE. Schemat procesu utleniania ABTS^{2-} przedstawia Rys. 1.

Jeżeli w roztworach słabo kwaśnych skanuje się potencjał również w zakresie reakcji (3), to przebieg krzywych woltamperometrycznych jest podobny jak w środowisku silnie kwaśnym, lecz tylko przy małych stężeniach ABTS i bardzo dużych szybkościach skanowania, ν [6–11]. Wzrost stężenia, jak również zmniejszenie ν powodują częściowy zanik pików katodowego związanego z reakcją elektrodową (3), przy jednoczesnym wzroście wysokości pików katodowego odpowiadającego reakcji odwrotnej w stosunku do (4). Prawdopodobną przyczyną jest homogeniczna reakcja reproporcjonowania

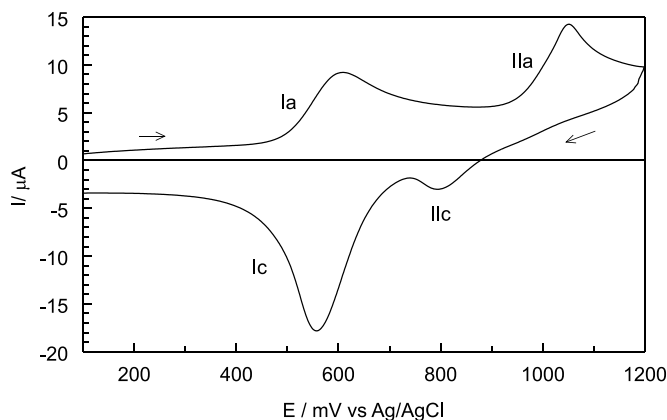


która prowadzi do regeneracji rodnika $\text{ABTS}^{\cdot-}$. Sytuację przejściową obrazuje cykliczna krzywa woltamperometryczna ABTS w metanolu, przedstawiona na Rys. 2

[12]. W przebiegu powrotnym (po zmianie kierunku polaryzacji) obserwuje się zmniejszony pik redukcji ABTS⁰ (pik IIc) oraz powiększony pik redukcji rodnika ABTS⁻ (pik Ic). Jednocześnie kształt II pików anodowych (pik IIa) wskazuje na słabą adsorpcję produktu reakcji elektrodowej.



Rysunek 1. Mechanizm utleniania anionu ABTS²⁻
 Figure 1. Oxidation mechanism of the ABTS²⁻ anion



Rysunek 2. Cykliczne krzywe voltamperometryczne 1 mM ABTS w metanolu na dyskowej elektrodzie z węgla szklistego (średnica 1,0 mm). Elektrolit podstawowy 0,1 M NaClO₄ i 0,1 M CH₃COOH.

Szybkość skanowania potencjału 2 V s⁻¹. Strzałki wskazują kierunek zmian potencjału

Figure 2. Cyclic voltammograms of 1 mM ABTS in methanol on a glassy carbon electrode (diameter 1 mm).

Background electrolyte 0,1 M NaClO₄ and 0,1 M CH₃COOH. Potential scan rate 2 V s⁻¹.

Arrows indicate directions of potential scanning

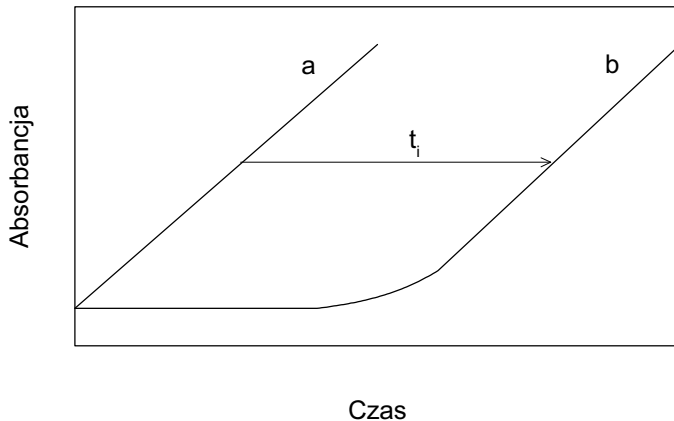
Widma elektronowe różnych form ABTS zbadali i opisali Scott i in. [6]. Anion ABTS²⁻ jest bezbarwny, gdyż absorbuje światło tylko w zakresie nadfioletowym, z maksimum przy długości fali 340 nm ($\epsilon_{\max} = 3,66 \cdot 10^4 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Wraz z zakwaszeniem roztworu pasmo to przesuwają się w stronę fal krótszych tak, że 1 M roztworze HClO₄ jego maksimum położone jest przy 310 nm ($\epsilon_{\max} = 2,09 \cdot 10^4 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Przesunięcie to jest związane ze zmianą równowagi kwasowo-zasadowej w układzie HABTS⁻/ABTS²⁻. Rodnik ABTS⁻, który powstaje w wyniku utraty jednego elektronu przez HABTS⁻ lub ABTS²⁻, wykazuje w roztworach wodnych cztery maksima absorpcji: przy 417, 645, 728 i 810 nm. Do celów analitycznych wykorzystuje się na ogół pasmo przy $\lambda_{\max} = 728 \text{ nm}$ ($\epsilon_{\max} = 1,50 \cdot 10^4 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Nie jest ono wprowadzić najbardziej intensywne, lecz jego położenie w zakresie dość długich fal zmniejsza interferencję z barwnymi składnikami matrycy.

W pierwotnej procedurze zaproponowanej przez Millera i in. [13] rodnik ABTS⁻ był generowany na drodze reakcji (4) przez utlenianie nadtlakiem wodoru, w obecności metmioglobiny spełniającej rolę katalizatora. Produktem przejściowym procesu jest ferrylioglobina, a omawiany rodnik jest końcowym produktem sekwencji reakcji. Do wytwarzania rodnika ABTS⁻ mogą być wykorzystane również inne reakcje enzymatyczne, np. z udziałem peroksydazy chrzanowej [14, 15] lub lakkazy [16]. Używa się także utleniaczy silniejszych niż H₂O₂ lub rozpuszczony tlen. Jednym z nich jest stały MnO₂ [17], którego nadmiar oddziela się przez odsączenie. Van den Berg i in. [18] jako prekursor utleniacza wprowadzili ABAP (2,2'-azobisamidynopropan), który w obecności tlenu ulega w podwyższonej temperaturze rozpadowi z wytworzeniem wolnych rodników alkilowych według schematu



Rodniki powstałe podczas tej reakcji z kolei generują rodnik $ABTS^{\cdot-}$. W praktyce najczęściej używanym utleniaczem jest $K_2S_2O_8$, zaproponowany przez zespół Rice-Evans [19]. W tym przypadku utleniacz powinien być wprowadzony w niewielkim niedomiarze w stosunku do ABTS, gdyż nadmiar spowoduje dalsze utlenianie rodnika $ABTS^{\cdot-}$ do bezbarwnego $ABTS^0$. Wytwarzanie rodnika $ABTS^{\cdot-}$ z wykorzystaniem reakcji enzymatycznych ma tę zaletę, że zachodzi szybko. W przeciwieństwie do tego, bezpośrednie generowanie „chemiczne”, chociaż z pozoru prostsze, wymaga dłuższego czasu do zupełnego przereagowania (w przypadku $K_2S_2O_8$ powyżej 6 godz.) lub podwyższonej temperatury ($60^{\circ}C$ przy zastosowaniu ABAP jako utleniacza).

Jeżeli w próbce znajdują się antyoksydanty, to reagują one w pierwszej kolejności z obecnymi w układzie wolnymi rodnikami, a dopiero po ich wyczerpaniu pojawia się nadmiar zielononiebieskiego rodnika $ABTS^{\cdot-}$. Ten sposób postępowania, określany jako addycyjny, jest przedstawiony schematycznie na Rys. 3. Zakłada się przy tym, że czas inkubacji (indukcji), t_i , jest proporcjonalny do zawartości antyoksydantów w badanej próbce. Ogólną słuszność tego założenia potwierdzili Yu i Ong [20] na przykładzie szeregu antyoksydantów, m.in. kwasu askorbinowego, kwercetyny, i kemferolu, które reagowały szybko z rodnikiem wskaźnikowym. Niektóre antyoksydanty reagujące zbyt wolno, np. genisteina, nie spełniały tego założenia.



Rysunek 3. Schematyczny wykres kinetyki utleniania $ABTS^{2-}$ (a) w nieobecności oraz (b) w obecności antyoksydantów. t_i oznacza czas indukcji
 Figure 3. Schematic representation of the kinetics of $ABTS^{2-}$ oxidation (a) in the absence and (b) the presence of antioxidants. t_i is the incubation time

Opisana poprzednio kolejność wprowadzania odczynników była krytykowana, gdyż antyoksydanty mogą od razu reagować ze stosunkowo silnym utleniaczem, bez pośrednictwa rodnika, a wskutek tego wyniki będą obarczone dodatnim błędem systematycznym. W związku z tym, pierwotne postępowanie zostało w następnych

latach zmodyfikowane przez wprowadzanie antyoksydanta do roztworu zawierającego wytworzony wcześniej rodnik $ABTS^{\cdot-}$ (procedura postaddycyjna) [21]. Roztwory zawierające rodnik $ABTS^{\cdot-}$ można przechowywać przez wiele dni w stanie zamrożonym ($-20^{\circ}C$). Przed pomiarem rozcieńcza się wyjściowy roztwór rodnika roztworem buforu fosforanowego albo metanolem lub etanolem (w przypadku antyoksydantów lipofilowych). Rozcieńczenie ma na celu stworzenie optymalnych warunków do pomiaru spektrofotometrycznego, tj. uzyskania początkowej absorbancji ok. 0,70. Po upływie określonego czasu oznacza się spektrofotometrycznie ilość rodnika, który nie przereagował z badanym antyoksydantem, zwykle w temp. $30^{\circ}C$.

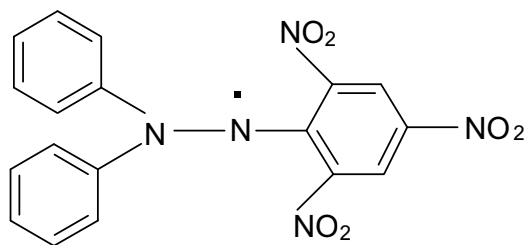
Opisaną metodę powszechnie określa się akronimem TEAC (ang. *trolox equivalent antioxidant capacity*) z powodu zastosowania w niej troloksu jako substancji wzorcowej. Ponieważ rodnik $ABTS^{\cdot-}$ może być generowany zarówno w środowisku wodnym, jak też w rozpuszczalnikach organicznych i mieszanych, metoda TEAC nadaje się do oznaczania udziału składników zarówno hydrofilowych, jak i lipofilowych w TAA [22]. Jak wynika z opisanych wcześniej właściwości elektrochemicznych $ABTS$ w roztworach wodnych, zdolności utleniające rodnika $ABTS^{\cdot-}$ są uwarunkowane przez pH. Oznaczenia metodą TEAC w środowisku wodnym prowadzi się na ogół w tzw. warunkach fizjologicznych, tj. w buforze fosforanowym przy pH w granicach od 7,1 do 7,4. W temperaturze pokojowej rodnik $ABTS^{\cdot-}$ jest stosunkowo nietrwały i ulega powolnemu rozkładowi, wskutek czego absorbancja roztworu dość szybko samorzutnie maleje (ok. 30% na godz.). Zatem, w przypadku antyoksydantów reagujących powoli z $ABTS^{\cdot-}$, zachodzi konieczność korekty wyników TAA, gdyż w przeciwnym przypadku będą one obciążone dodatnim błędem systematycznym. Ponadto nie można zapominać o tym, że musi upłynąć dostatecznie długi czas do ustalenia równowagi rodnika $ABTS^{\cdot-}$ z antyoksydantem. Doświadczenia kinetyczne, które przeprowadzili Labrinea i Georgiou [23] metodą przepływu zatrzymanego, wykazały, że szereg antyoksydantów o charakterze fenoli reaguje w roztworach wodnych powoli z tym rodnikiem, zwłaszcza w kwaśnych roztworach (pH 4,6). W niektórych przypadkach, np. BHT, kwasu galusowego i kwasu *p*-kumarowego, równowaga nie zostaje w pełni osiągnięta w czasie 10 min nawet przy pH 7,4.

W ostatnich latach zaproponowano automatyzację metody TEAC przez zastosowania techniki wstrzykowo-przepływowej, która pozwala na wielokrotne powtarzanie pomiarów analitycznych w krótkim czasie. Ubytek wskaźnikowego rodnika, generowanego na drodze chemicznej, monitorowano zarówno spektrofotometrycznie [24–26], jak i amperometrycznie [27, 28]. W jednej z opublikowanych prac zastosowano elektrochemiczne generowanie $ABTS^{\cdot-}$ [29].

Analogiczną do poprzednio opisaną jest metoda z wykorzystaniem rodnika wytwarzanego z dimetylo-*p*-fenylenodiaminy, DMPD, (w postaci dichlorowodorku) [30]. W kwaśnych roztworach wodnych związek ten, pod wpływem utleniaczy, tworzy kationorodnik $DMPD^{\cdot+}$ zabarwiony purpurowo ($\lambda_{\max} = 505$ nm). Oznaczanie TAA opiera się tu na pomiarze zmiany absorbancji rodnika pod wpływem dodanego antyoksydanta.

2. METODA DPPH

W porównaniu z metodą TEAC, nieco mniej rozpowszechniona jest metoda zaproponowana przez Berseta i in. [31, 32], opierająca się na zmiataniu trwałego, silnie zabarwionego na purpurowo rodnika 2,2-difenyl-1-pikrylohydrazylu, DPPH[•], którego niesparowany elektron jest zlokalizowany przy atomie azotu (patrz wzór na Rys. 4). W metanolu DPPH[•] wykazuje pasmo absorpcji w zakresie widzialnym z maksimum przy 515 nm ($\epsilon_{\text{max}} = 12,5 \text{ mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Niewątpliwą zaletą metody jest użycie gotowego rodnika (łatwo dostępnego w handlu), bez potrzeby generowania go z prekursora, jak w przypadku ABTS. Inną jego zaletą jest znaczna stabilność jego roztworów. Niestety DPPH rozpuszcza się wyłącznie w rozpuszczalnikach organicznych oraz ich mieszaninach z wodą, co znacznie ogranicza jego zastosowanie do oznaczania TAA.



Rysunek 4. Wzór strukturalny rodnika DPPH[•]
Figure 4. Molecular structure of DPPH radical

Trwały rodnik DPPH[•] od dawna przyciągał uwagę elektrochemików. Wyniki podstawowych badań elektrochemicznych na elektrodzie platynowej w acetonitrylu, metanolu, etanolu, acetonie i DMSO opublikowali Solon i Bard [33] już w 1964 r. stwierdzając, że rodniki te ulegają zarówno redukcji, jak i utlenieniu:



Obydwie reakcje elektrodowe mają charakter odwracalny lub *quasi*-odwracalny. Elektrochemiczną i spektralną charakterystykę DPPH[•] w 11 rozpuszczalnikach organicznych podali również Kalinowski i Klimkiewicz [34]. Warto dodać, że zbadano także właściwości elektrochemiczne rodnika DPPH[•] unieruchomionego na elektrodzie grafitowej, znajdującej się w kontakcie z roztworem wodnym [35].

Berset i in. [32] zaproponowali, aby TAA wyrażać jako ilość antyoksydanta potrzebną do zmniejszenia początkowego stężenia DPPH[•] o połowę, w jednostkach EC₅₀ (ang. *efficient concentration 50%*). Czas niezbędny do osiągnięcia tego poziomu oznacza się symbolem t_{EC50} . Należy podkreślić, że z powodów sterycznych szereg antyoksydantów reaguje bardzo powoli z rodnikiem DPPH[•]. Sanchez–Moreno i in.

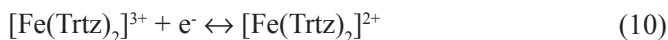
[36] wprowadzili kolejny parametr, AE (ang. *antiradical efficiency*), do wyrażenia TAA. Jest on definiowany jako

$$AE = 1/(EC_{50} t_{EC50}) \quad (9)$$

Spektrofotometryczna metoda oznaczania TAA na podstawie zaniku absorpcji rodnika DPPH \cdot została sprawdzona doświadczalnie na licznych przykładach przez Molyneux [37]. Niedawne badania przeprowadzone przez Oselika i in. [38] wykazały, że roztwory DPPH są bardzo wrażliwe na światło. Tak np. zanik absorbancji w roztworach metanolowych i acetonowych, przechowywanych przy świetle w 25°C, mierzony przy $\lambda = 517$ nm, wynosił po 120 min odpowiednio 20 i 35%, podczas gdy w ciemności nie obserwowano zauważalnych zmian nawet po 150 min. Wskazuje to na konieczność przestrzegania odpowiednich warunków doświadczalnych podczas dokonywania oznaczeń analitycznych. Ostatnio podjęto również próby wykorzystania tej reakcji do automatyzacji oznaczania TAA zarówno techniką spektrofotometryczną [39], jak również amperometryczną [40, 41].

3. METODY FRAP I CUPRAC

Kolejną metodę oznaczania TAA, znaną pod akronimem FRAP (ang. *ferric reducing antioxidant power*), zaproponowali Benzie i Strain [42]. Metoda opiera się na redukcji kompleksu Fe(III) z 2,4,6-*tris*(2-pirydylo)-s-triazyną, Trtz, stanowiącego analog powszechnie znanej ferroiny. Produktem reakcji



jest kompleks Fe(II), intensywnie zabarwiony na niebiesko, $\lambda_{\text{max}} = 593$ nm. Trwałość kompleksu zależy od pH. Optymalne warunki do oznaczania TAA na podstawie wzrostu absorbancji w wyniku powstawania kompleksu Fe(II) występują przy pH 3,6 (bufor octanowy). Układ redoks $[\text{Fe}(\text{Trtz})_2]^{3+}/[\text{Fe}(\text{Trtz})_2]^{2+}$ wykazuje w opisanych warunkach potencjał formalny ok. 0,70 V względem SHE, a więc zbliżony do ABTS $^{2-}/\text{ABTS}^-$ (0,68 V). Mimo że metoda FRAP nie może być stosowana w warunkach „fizjologicznych” (pH \approx 7), to niewątpliwą jej zaletą jest prostota i niski koszt używanych odczynników. Zastosowanie metody FRAP, pierwotnie przeznaczonej do oznaczania TAA w osoczu krwi [43], zostało później rozszerzone na badanie składników żywności [44–46].

Ostatnio zaproponowano pewne warianty metody FRAP, oparte na zastosowaniu jonu $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ lub powszechnie znanego kompleksu Fe(III) z 1,10-fenantroliną, czyli ferroiną, $[\text{Fe}(\text{Phen})_3]^{3+}$ [47]. Ostatnią metodę zastosowali Szydłowska-Czerniak i in. [48] do oznaczania TAA olejów jadalnych (w ekstraktach acetonowych lub metanolowych).

Kolejna modyfikacja, opatrzona przez autorów akronimem CUPRAC (ang. *cupric reducing antioxidant capacity*) [49], wykorzystuje redukcję Cu(II) do Cu(I). Jon Cu(I) występuje tu w postaci kompleksu z neokuproiną, 2,9-dimetylo-1,10-fenantroliną (Nc). Kompleks $[\text{Cu}(\text{Nc})_2]^{2+}$ jest intensywnie zabarwiony na żółto, $\lambda_{\text{max}} = 450 \text{ nm}$. Potencjał formalny układu $[\text{Cu}(\text{Nc})_2]^{2+}/[\text{Cu}(\text{Nc})_2]^+$ wynosi około 0,6 V [50], a więc jest niższy od potencjału układu $[\text{Fe}(\text{Trtz})_2]^{3+}/[\text{Fe}(\text{Trtz})_2]^{2+}$. W konsekwencji utlenianie przez Cu(II) jest bardziej wybiórcze niż przez Fe(III) w metodzie FRAP. Ponadto, w odróżnieniu od FRAP, metodę CUPRAC stosuje się w roztworach o pH ok. 7, a więc w warunkach zbliżonych do metody TEAC. Oznaczanie można również prowadzić w rozpuszczalnikach niewodnych lub mieszanych, przez co staje się użyteczne przy badaniu antyoksydantów hydrofobowych (lipofilowych). Dotychczas sprawdzono możliwość zastosowania metody do oznaczania α -tokoferolu [51], kwasu askorbinowego [52, 53] oraz różnych związków fenolowych [50, 54, 55].

4. METODA FOLIN-CIOCALTEU (FC)

Metoda Folin-Ciocalteu (FC) jest używana od dawna do oznaczania ogólnej zawartości grup fenolowych na podstawie ich utleniania za pomocą soli heteropolikwasów fosforowolframomolibdenowych. Obecnie metoda jest stosowana na ogół w zmodyfikowanej postaci, opracowanej przez Singletona i in. [56]. Potrzebny do tego odczynnik przygotowuje się przez długotrwałe gotowanie wodnego roztworu $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ z $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ oraz stężonych kwasów solnego i fosforowego w odpowiednich proporcjach. Następnie do mieszaniny dodaje się $\text{Li}_2\text{SO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, otrzymując w ten sposób odczynnik FC o intensywnie żółtym zabarwieniu. Dokładny wzór chemiczny odczynnika nie jest znany, lecz uważa się, że jego działanie opiera się na redukcji molibdenu(VI)



prowadzącej do powstania zielonego i niebieskiego zabarwienia. Reakcja ta jest chemicznie odwracalna.

Oznaczanie fenoli (i innych reduktorów) przeprowadza się w środowisku alkalicznym, doprowadzając pH do ok. 10 przez dodatek Na_2CO_3 . W tych warunkach fenole występują w postaci fenolanów, które wykazują niższy potencjał utleniania niż ich molekularne odpowiedniki, a zatem reagują z utleniaczami łatwiej i zwykle szybciej. Oznaczenia dokonuje się na podstawie pomiaru wzrostu absorbancji przy $\lambda_{\text{max}} = 765 \text{ nm}$. Jako substancja wzorcowa, zalecany jest kwas galusowy. Należy zaznaczyć, że odczynnik FC nie jest specyficzny w stosunku do fenoli i utlenia cały szereg innych reduktorów, jak np. kwas askorbinowy. Mimo że odczynnik stosowany w metodzie FC nie ma ściśle określonego składu, stała się ona jednym ze standardów oznaczania aktywności antyoksydacyjnej, gdyż jest prosta, wygodna i dostarcza odtwarzalnych wyników.

W literaturze pojawiają się propozycje zastosowania do oznaczania TAA także innych silnych utleniaczy. Ostatnio Ozyurt i in. [57] zaproponowali użycie do tego celu soli Ce(IV) w wodnym roztworze H_2SO_4 . Metoda jest w swej istocie bardzo prosta, gdyż opiera się na pomiarze zmniejszeniu absorbancji ceru(IV) przy $\lambda_{max} = 320$ nm w wyniku reakcji z antyoksydantami. Z powodu wysokiego potencjału redoks układu Ce(IV)/Ce(III) metoda wymaga ścisłego przestrzegania warunków pH, aby nie dopuścić do utlenienia innych substancji organicznych zawartych w badanej próbce. Autorzy cytowanej pracy wypróbowali skuteczność metody na kilku pojedynczych substancjach z grupy flawonoidów oraz na wodnych ekstraktach z pokrzywy. Wyniki zostały porównane z uzyskanymi równoległe przy użyciu metod TEAC oraz CUPRAC.

5. METODY ELEKTROCHEMICZNE

Za pokrewne w stosunku do „chemicznych” metod oznaczania TAA za pomocą reakcji redoks należy uznać metody elektroanalityczne, a zwłaszcza voltamperometrię. Analiza danych dostarcza tu dwóch parametrów: (a) potencjału półfali (lub piku) anodowego utleniania oraz (b) natężenia prądu granicznego lub prądu piku, które odzwierciedlają stężenie antyoksydanta. Wykorzystanie obydwu tych parametrów do oceny antyoksydantów zaproponowali po raz pierwszy Chevion i in. [58, 59].

Potencjał piku (lub półfali) jest bezpośrednio związany z potencjałem formalnym układu redoks, E° , do którego należy antyoksydant, i pozwala ocenić, czy zajdzie reakcja z danym odczynnikiem utleniającym. Potencjał formalny można zatem uznać za miarę mocy antyoksydacyjnej (ang. *antioxidant power*). Posługując się tym kryterium, Blasco i in. [60] wyróżnili antyoksydanty o dużej ($E^\circ = 0,3$ V) i średniej mocy ($E^\circ = 0,5$ V). Yang i in. [61] zaproponowali ocenę mocy antyoksydacyjnej flawonoidów na podstawie wartości potencjału półfali ($E_{1/2}$) pierwszej fali anodowego utleniania. Niezależnie od nich, Kilmartin i in. wykorzystali potencjały pierwszego piku anodowego w voltamperometrii cyklicznej do charakterystyki polifenoli występujących w winach [62] oraz w naparach herbaty i kawy [63].

Do oznaczania aktywności antyoksydacyjnej (w sensie stężenia lub zawartości antyoksydantów w próbce) wykorzystuje się pomiar natężenia prądu granicznego lub prądu piku. Rzadziej stosuje się odczyt ładunku na podstawie powierzchni pod falą lub pikiem anodowym. Należy na wstępie zaznaczyć, że zastosowanie voltamperometrii w tej dziedzinie nie ma jednolitego charakteru. Metoda umożliwia oznaczenie indywidualnych antyoksydantów, jeżeli ich potencjały półfali różnią się w istotny sposób. Szczególnym przypadkiem jest zastosowanie voltamperometrii w urządzeniach detekcyjnych przy zautomatyzowanej analizie metodą ABTS lub DPPH, o czym była mowa we wcześniejszych rozdziałach.

Oryginalną metodę pośrednią oznaczania TAA za pomocą różnicowej voltamperometrii pulsowej, opartą na zaniku prądu redukcji tlenu na cienkowarstwowej elektrodzie rtęciowej, opracowała Korotkova i in. [64–66]. Pod względem teoretycznym metoda została opracowana przez Tur’jana i in. [67]. Elektrochemiczna

redukcja tlenu na rtęci jest wprawdzie procesem jednostopniowym z przyłączeniem 4 elektronów, lecz zachodzi wieloetapowo. W pierwszym etapie powstaje anionorodnik ponadtlenkowy



który w roztworze wodnym częściowo (zależnie od pH) przechodzi w rodnik wodonadtlenkowy



Anionorodnik $\text{O}_2^{\cdot-}$ jest bardzo reaktywny i może utlenić wiele substancji organicznych (antyoksydantów). Tym samym zmniejsza się jego udział w dalszych etapach redukcji tlenu, co obniża mierzony katodowy prąd pikowy i przesuwa pik w stronę dodatnich potencjałów. Oznaczenie TAA wymaga zatem trzykrotnego pomiaru prądu pikowego w elektrolicie podstawowym: (1) w obecności tlenu bez antyoksydanta, (b) po dodaniu antyoksydanta, (c) po usunięciu tlenu za pomocą gazu obojętnego.

Oprócz woltamperometrii, proponowano zastosowanie innych metod elektroanalitycznych. Niedawno Budnikov i in. [68, 69] opracowali metodę oznaczania TAA krwi oraz osocza krwi przez miareczkowanie kulometryczne bromem generowanym anodowo. Do monitorowania przebiegu miareczkowania została użyta technika biamperometryczna. Niestety, autorzy nie przeprowadzili żadnych badań porównawczych z wykorzystaniem innych metod oznaczania TAA, zwłaszcza że brom należy do silnych utleniaczy.

Należy również zanotować próbę zastosowania potencjometrii do oznaczania TAA, podjętą przez Braininę i in. [70, 71]. Autorzy wykorzystali przesunięcie potencjału układu redoks $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$, służącego jako mediator, pod działaniem reduktora, którym jest antyoksydant. Potencjał układu należy zmierzyć dwukrotnie, tj. przed

$$E_1 = E^\circ + (RT/F) \ln [c_{\text{ox}}/c_{\text{red}}] \quad (14)$$

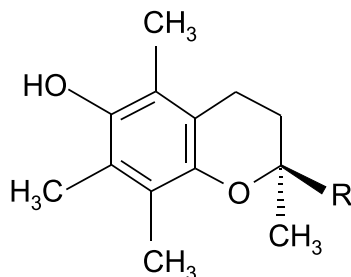
oraz po wprowadzeniu badanej próbki

$$E_2 = E^{\circ\prime} + (RT/F) \ln [(c_{\text{ox}} - c_x)/(c_{\text{red}} + c_x)] \quad (15)$$

c_{ox} oraz c_{red} oznaczają tu początkowe stężenia formy utlenionej i zredukowanej mediatora, $E^{\circ\prime}$ jego potencjał formalny, a c_x jest stężeniem antyoksydanta, wyrażonym w równoważnikach na litr. Metoda, chociaż bardzo prosta, jest jednocześnie mało czuła i wymaga starannego doboru stosunku stężenia mediatora do antyoksydanta.

6. SUBSTANCJE WZORCOWE

Intensywności sygnałów analitycznych mierzonej w różnych procedurach do oznaczania TAA (np. absorbancja lub prąd pikowy w woltamperometrii) nie można przewidzieć na podstawie przesłanek teoretycznych i z tego powodu wymagana jest kalibracja przy użyciu substancji wzorcowych. Muszą nimi być umiarkowanie silne reduktory, rozpuszczalne zarówno w wodzie, jak i w niektórych rozpuszczalnikach organicznych oraz w ich mieszaninach z wodą. Ważna jest też znajomość mechanizmu reakcji utlenienia i związanej z tym liczby wymienianych elektronów. W literaturze do oznaczania TAA proponowano wiele substancji wzorcowych, m.in. kwas galusowy, kwas kawowy, eugenol, izoeugenol, kwas moczowy, troloks oraz kwas askorbinowy. Nenadis i in. [72] dokonali krytycznej oceny szeregu substancji wzorcowych. Autorzy stwierdzili, że wzorce powinny być indywidualnie dostosowane do określonej matrycy i trudno jest zalecić wzorzec uniwersalny. W praktyce powszechnie stosuje się dwie substancje wzorcowe: troloks i kwas askorbinowy.



troloks: R = COOH

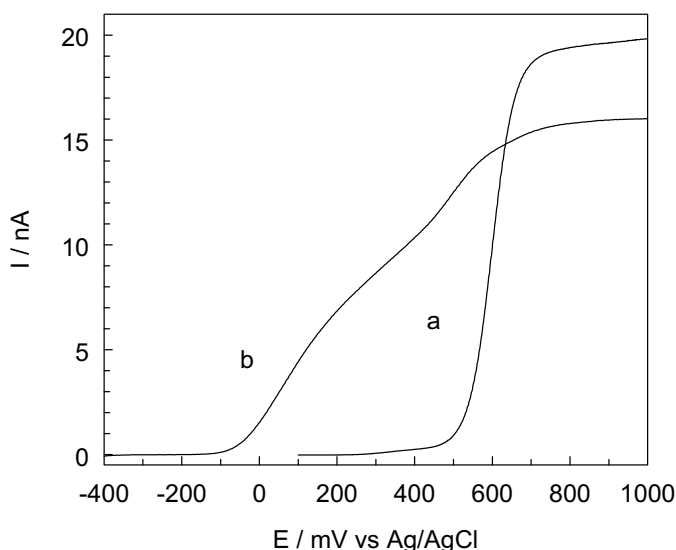
α -tokoferol: R = C₁₆H₃₃ (łańcuch fitylowy)

Rysunek 5. Struktura troloksu i α -tokoferolu
Figure 5. Molecular structure of trolox and α -tocopherol

Troloks (Rys. 5) jest analogiem α -tokoferolu, głównego składnika witaminy E, rozpuszczalnej w tłuszczach. Zastąpienie długiego łańcucha fitylowego, występującego w cząsteczce α -tokoferolu, grupą karboksylową powoduje wzrost właściwości hydrofilowych, co z kolei polepsza rozpuszczalność w wodzie. Rozpuszczalność ta jest wprawdzie nadal dosyć ograniczona i wynosi zaledwie ok. 0,2 mM [73], lecz rośnie ze wzrostem pH, wskutek stopniowego tworzenia się lepiej rozpuszczalnej soli. Cząsteczka troloksu zawiera dwie grupy funkcyjne: karboksylową i fenolową. Stałą dysocjacji kwasowej grupy fenolowej podali Steenken i Neta [74] jako $pK_{a2} = 11,9$, podczas gdy analogiczną wartość dla grupy karboksylowej wyznaczyli Małyszko i Mechanik [75] ($pK_{a1} = 3,6$) na podstawie miareczkowania potencjometrycznego. Nieco inny zestaw tych stałych opublikowali ostatnio Mitrai i in. [76] ($pK_{a1} = 5,0$, $pK_{a2} = 11,5$).

Analiza przebiegu reakcji troloksu z rodnikiem ABTS, dokonana przez Artsa i in. [77], wykazała, że substancje te reagują w stosunku stechiometrycznym jak 1:1,9, a więc zbliżonym do 1:2. Wynika stąd, że rodnik fenoksyłowy troloksu, wytworzony w wyniku reakcji z rodnikiem ABTS, jest jedynie produktem przejściowym i reaguje z kolejnym rodnikiem ABTS. Fakt, że doświadczalna liczba stechiometryczna jest nieco mniejsza od 2, wskazuje na możliwość częściowego zużywania produktu przejściowego (rodnika) w reakcji ubocznej, np. dimeryzacji.

Kinetykę reakcji troloksu z rodnikiem DPPH[•] w etanolu Friaa i Brault [78] badali metodą przepływu zatrzymanego i otrzymali stałą szybkości $3,2 \cdot 10^2 \text{ mol}^{-1} \text{ dm s}^{-1}$. Zbliżoną wartość tej stałej ($3,6 \cdot 10^2 \text{ mol}^{-1} \text{ dm s}^{-1}$) uzyskali Santosh i in. [79] w metanolu. Przejście z bezwodnego etanolu do mieszaniny z wodą (1:1) powoduje znaczne przyspieszenie tej reakcji.



Rysunek 6. Stacjonarne krzywe voltamperometryczne anodowego utleniania 2 mM troloksu w metanolu zawierającym 0,2 M NaClO₄ jako elektrolit podstawowy. Stężenie (C₂H₅)₄NOH: (a) 0, (b) 4,0 mM.

Krzywe zarejestrowano na mikroelektrodzie dyskowej z włókna węglowego o średnicy 35,4 μm przy szybkości skanowania potencjału 5 mV s⁻¹

Figure 6. Steady-state voltammograms of the anodic oxidation of 2 mM trolox in methanol containing 0,2 M NaClO₄ as a background electrolyte. Concentration of (C₂H₅)₄NOH: (a) 0, (b) 4,0 mM. Curves were recorded on a carbon fiber disc microelectrode of 35,4 μm diameter at a scan rate of 5 mV s⁻¹

W ostatnich latach przeprowadzono również systematyczne badania nad mechanizmem elektrochemicznego utleniania troloksu w różnych rozpuszczalnikach [75, 80–83], głównie na elektrodach węglowych. Wynika z nich, że proces ten zachodzi w dwu etapach, każdorazowo z utratą jednego elektronu i wytworzeniem rodnika fenoksyłowego, jako produktu przejściowego. Produkt utleniania (jon fenoksoniowy) może wchodzić w reakcje chemiczne ze składnikami roztworu. Na Rys. 6

przedstawiono stacjonarne krzywe woltamperometryczne utlenienia troloksu w metanolu na mikroelektrodzie z włókna węglowego (wg danych [84]). Krzywa (a) odpowiada jedностopniowemu, dwuelektronowemu utlenieniu w niebuforowym roztworze, zawierającym 0,2 M NaClO_4 jako elektrolit podstawowy. Wprowadzenie równoważnej ilości silnej zasady, $(\text{C}_2\text{H}_5)_4\text{NOH}$, powoduje dosyć wyraźne rozdzielanie procesu na dwa odrębne stopnie jednoelektronowe (krzywa (b)). Jednocześnie zamiana formy cząsteczkowej troloksu na anionową ułatwia utlenianie anodowe, co przejawia się znacznym przesunięciem krzywej w kierunku ujemnych potencjałów. Forma anionowa jest silniej solwatowana od cząsteczkowej, co znajduje odzwierciedlenie w zmniejszeniu współczynnika dyfuzji, a w konsekwencji spadku natężenia prądu granicznego.

Na drugim miejscu wśród substancji wzorcowych do oznaczania TAA należy wymienić kwas askorbinowy, którego zaletą w porównaniu z troloksem jest szybsza reakcja z większością utleniaczy. Kim i in. [85] zaproponowali stosowanie jednostki VCEAC (ang. *vitamin C equivalent antioxidant capacity*), wyrażonej w mg kwasu askorbinowego na 100 g próbki, jako równoważnika aktywności antyoksydacyjnej.

PODSUMOWANIE

Jest rzeczą godną zastanowienia, że mimo opracowania i szerokiego stosowania kilku metod oznaczania TAA, żadna z nich nie stała się dotychczas obowiązującym standardem. Przedstawione metody pozwalają na oznaczanie TAA w roztworach wodnych i rozpuszczalnikach mieszanych o różnych zakresach pH, a mianowicie w roztworach kwaśnych (FRAP), obojętnych (ABTS i DPPH) oraz zasadowych (FC). Różnorodność reakcji redoks stosowanych do oznaczania TAA może nasuwać wątpliwości, czy uzyskiwane za ich pomocą wyniki będą zgodne. Przyczyny rozbieżności, wynikające z błędów systematycznych, mogą być zarówno natury kinetycznej (różna szybkość reakcji redoks), o czym wspomniano już w rozdziale o metodzie TEAC, jak i termodynamicznej (zbyt mała różnica potencjałów formalnych antyoksydanta i utleniacza). Wspomniane już różnice pH mogą powodować, że w poszczególnych procedurach oznaczane antyoksydanty mogą występować pod różnymi postaciami, np. molekularnymi (w roztworach kwaśnych) i jonowymi (w roztworach zasadowych). W przypadku materiałów biologicznych, żywności oraz jej suplementów rozbieżności mogą także wynikać z interferencji ze składnikami matrycy.

W literaturze jest niewiele publikacji poświęconych porównaniu wyników oznaczania TAA indywidualnych substancji różnymi metodami. Gliszczyńska-Świągło [86] wyznaczyła wartości TAC kilku witamin rozpuszczalnych w wodzie, stosując równolegle metodę TEAC oraz FRAP. Zgodność wyników (w granicach ok. 1%) uzyskała autorka jedynie w przypadku kwasu askorbinowego. Pirydoksyna, pirydoksal, pirydoksamina i tiamina nie wykazywały zdolności do redukcji Fe(III) w metodzie FRAP, a w przypadku kwasu foliowego wyniki uzyskane metodą FRAP były ok. 30% mniejsze niż w metodzie TEAC. Apak i in. [50] porównali wyniki

oznaczania TAA szeregu antyoksydantów, w tym polifenoli, α -tokoferolu oraz kwasu askorbinowego, przy użyciu trzech metod: CUPRAC, ABTS i FC. Najbardziej zbliżonych wyników dostarczyły metody CUPRAC i ABTS (w mieszaninach etanolu z wodą), natomiast wyniki uzyskane metodą FC są znacznie wyższe (nawet powyżej 100%). Zdaniem autorów, jest to związane z podwyższeniem mocy redukcyjnej substancji fenolowych z powodu ich przejścia w postać anionów.

Prior i in. [87] rozpatrywali zalety i wady różnych metod oznaczania TAA mając na uwadze te, które należałoby zalecić do stosowania w praktyce jako wzorcowe. Autorzy stwierdzili, że odpowiednie wymagania spełniają metody: ORAC, FC i TEAC. Należy przypomnieć, że mechanizm pierwszej z nich jest oparty na reakcji przeniesienia atomu wodoru. Do nieco odmiennych wniosków doszli Stratil i in. [88], zalecając jako wzorcowe trzy metody oparte na reakcjach wymiany elektronu: TEAC, DPPH oraz FRAP.

Do oznaczania TAA używa się również innych metod [89, 90], których omówienie wykracza poza ramy tematyczne tego artykułu. Ogólny opis innych metod oznaczania aktywności antyoksydacyjnej można znaleźć w specjalistycznych artykułach przeglądowych [91–93]. Szereg praktycznych wskazówek na temat oznaczania TAA wybranymi metodami zawiera monografia pod red. Grajka [94].

PODZIĘKOWANIE

Autorzy pragną złożyć gorące podziękowanie dr Annie Podśędek i dr Dorocie Sosnowskiej z Instytutu Biochemii Technicznej Politechniki Łódzkiej za cenne wskazówki dotyczące praktyki oznaczania aktywności antyoksydacyjnej. Przedstawiona praca była częściowo finansowana przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego ze środków na naukę w ramach promotorskiego projektu badawczego Nr 3 T09A 054 29.

PIŚMIENICTWO CYTOWANE

- [1] G. Bartosz, *Druga twarz tlenu. Wolne rodniki w przyrodzie*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2003.
- [2] Ś. Ziemiański, M. Wartanowicz, [w:] Ś. Ziemiański (red.), *Normy żywienia człowieka. Fizjologiczne podstawy*, Wyd. Lekarskie PZWL, Warszawa 2001, ss. 292–308.
- [3] B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, *Free Radic. Biol. Med.* 1995, **18**, 125.
- [4] Z. Sroka, A. Gamian, W. Cisowski, *Postepy Hig. Med. Dosw.* (online), 2005, **59**, 34.
- [5] G. Cao, H.M. Alessio, R.G. Cutler, *Free Radic. Biol. Med.*, 1993, **14**, 303.
- [6] S.L. Scott, W. Chen, A. Bakac, J.H. Espenson, *J. Phys. Chem.* 1993, **97**, 6710.
- [7] R. Bourbonnais, D. Leech, M.G. Paice, *Biochim. Biophys. Acta*, 1998, **1379** 381.
- [8] G.T.R. Palmore, H.-H. Kim, *J. Electroanal. Chem.*, 1999, **464**, 110.
- [9] S. Tsujimura, H. Tatsumi, J. Ogawa, S. Shimizu, K. Kano, T. Ikeda, *J. Electroanal. Chem.*, 2001, **496**, 69.

- [10] J.H. Thomas, J.M. Drake, J.R. Paddock, S. Conklin, J. Johnson, C.J. Seliskar, H.B. Halsall, W.R. Heineman, *Electroanalysis*, 2004, **16**, 547.
- [11] M. Solis-Oba, V.M. Ugalde-Saldivar, I. González, *J. Electroanal. Chem.*, 2005, **579**, 59.
- [12] S. Michałkiewicz, J. Małyżko, dane nieopublikowane.
- [13] N.J. Miller, C.A. Rice-Evans, M.J. Davies, V. Gopinathan, A. Milner, *Clin. Sci.*, 1993, **84**, 407.
- [14] A. Cano, M. Acosta, M.B. Arnao, *Redox Report*, 2000, **5**, 370.
- [15] A. Cano, O. Alcaraz, M. Acosta, M.B. Arnao, *Redox Report*, 2002, **7**, 103.
- [16] M. Klis, J. Rogalski, R. Bilewicz, *Bioelectrochem.*, 2007, **71**, 2.
- [17] N.J. Miller, J. Sampson, L.P. Candeias, P.M. Bramley, C.A. Rice-Evans, *FEBS Lett.*, 1996, **384**, 240.
- [18] R. van den Berg, G.R.M.M. Haenen, H. van den Berg, A. Bast, *Food Chem.*, 1999, **66**, 511.
- [19] R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, C. Rice-Evans, *Free Radic. Biol. Med.*, 1999, **26**, 1231.
- [20] T.-W. Yu, C.N. Ong, *Anal. Biochem.*, 1999, **275**, 217–223.
- [21] M. Strube, G.R.M.M. Haenen, H. van den Berg, A. Bast, *Free Radic. Res.*, 1997, **26**, 515.
- [22] M.B. Arnao, A. Cano, M. Acosta, *Food Chem.*, 2001, **73**, 239.
- [23] E.P. Labrinea, A. Georgiou, *Anal. Chim. Acta*, 2004, **526**, 63.
- [24] S. Buratti, N. Pelegrini, O.V. Brenna, S. Mannino, *J. Agric. Food Chem.*, 49, **2001**, 5136.
- [25] O. Erel, *Clin. Biochem.*, 2004, **37**, 277–285.
- [26] M.J.R. Lima, I.V. Tóth, A.O.S.S. Rangel, *Talanta*, 2005, **68**, 207.
- [27] S. Milardovic, I. Kereković, R. Derrico, V. Rumenjak, *Talanta*, 2007, **71**, 213.
- [28] S. Milardovic, I. Kereković, V. Rumenjak, *Food Chem.*, 2007, **105**, 1688.
- [29] D. Iveković, S. Milardović, M. Roboz, B.S. Grabarić, *Analyst*, 2005, **130**, 708.
- [30] V. Fogliano, V. Verde, G. Randazzo, A. Ritieni, *J. Agric. Food Chem.*, 1999, **47**, 1035.
- [31] W. Brand-Williams, M.E. Cuvelier, C. Berset, *Lebensm. Wiss. Technol.*, 1995, **28**, 25.
- [32] V. Bondet, W. Brand-Williams, C. Berset, *Lebensm. Wiss. Technol.*, 1997, **30**, 609.
- [33] E. Solon, A.J. Bard, *J. Am. Chem. Soc.*, 1964, **86**, 1926.
- [34] M.K. Kalinowski, J. Klimkiewicz, *Monatsh. Chem.*, 1983, **114**, 1043.
- [35] Q. Zhuang, F. Scholz, F. Pragst, *Electrochem. Commun.*, 1999, **1**, 406.
- [36] C. Sanchez-Moreno, J.A. Larrauri, F. Saura-Calixto, *J. Sci. Food Agric.*, 1998, **76**, 270–276.
- [37] P. Molyneux, *J. Sci. Technol.*, 2004, **26**, 211.
- [38] B. Ozcelik, J.H. Lee, D.B. Min, *J. Food Sci.*, 2006, **68**, 487.
- [39] L.M. Magalhaes, M.A. Segundo, S. Reis, J.L.F.C. Lima, *Anal. Chim. Acta*, 2006, **558**, 310.
- [40] S. Milardovic, D. Iveković, V. Rumenjak, B.S. Grabarić, *Electroanalysis*, 2005, **17**, 1847.
- [41] S. Milardović, D. Ivekovic, B.S. Grabarić, *Bioelectrochem.*, 2006, **68**, 175.
- [42] I.F.F. Benzie, J.J. Strain, *Anal. Biochem.*, 1996, **239**, 70.
- [43] T.Z. Liu, N. Chin, M.D. Kiser, W.N. Bigler, *Clin. Chem.*, 1982, **28**, 2225.
- [44] I.F.F. Benzie, Y.T. Szeto, *J. Agric. Food Chem.*, 1999, **47**, 633.
- [45] P.T. Gardner, T.A.C. White, D.B. McPhail, G.G. Duthie, *Food Chem.*, 2000, **68**, 471.
- [46] M. Ozgen, R.N. Reese, A.Z. Tulio, J.C. Scheerens, A.R. Miller, *J. Agric. Food Chem.*, 2006, **54**, 1151.
- [47] K.I. Berker, K. Güçlü, I. Tor, R. Apak, *Talanta*, 2007, **72**, 1157.
- [48] A. Szydłowska-Czerniak, C. Dianoczki, K. Recseg, G. Karlovits, E. Szlyk, *Talanta*, 2008, **76**, 899.
- [49] R. Apak, K. Güçlü, M. Özyürek, S.E. Karademir, *J. Agric. Food Chem.*, 2004, **52**, 7970.
- [50] R. Apak, K. Güçlü, M. Özyürek, S.E. Çelik, *Microchim. Acta*, 2008, **160**, 413.
- [51] E. Tütem, R. Apak, E. Günaydi, K. Sözgen, *Talanta*, 1997, **44**, 249.
- [52] K. Güçlü, K. Sözgen, E. Tütem, M. Özyürek, R. Apak, *Talanta*, 2005, **65**, 1226.
- [53] M. Özyürek, K. Güçlü, B. Bektaşoğlu, R. Apak, *Anal. Chim. Acta*, 2007, **588**, 88.

- [54] R. Apak, K. Güçlü, M. Özyürek, S.E. Karademir, E. Erçađ, *Int. J. Food Sci. Nutr.*, 2006, **57**, 292.
- [55] M. Özyürek, B. Bektařodlu, K. Güçlü, N. Güngör, R. Apak, *Anal. Chim. Acta*, 2008, **630**, 28.
- [56] V.L. Singleton, J.A. Rossi, *Am. J. Enol. Vitic.*, 1965, **16**, 144.
- [57] D. Ozyurt, B. Demirata, R. Apak, *Talanta*, 2007, **71**, 1155.
- [58] S. Chevion, E.M. Berry, N. Kitrossky, R. Kohen, *Free Radic. Biol. Med.*, 1997, **22**, 411.
- [59] S. Chevion, M.A. Roberts, M. Chevion, *Free Radic. Biol. Med.*, 2000, **28**, 860.
- [60] A.J. Blasco, M.C. Rogerio, M.C. Gonzalez, A. Escarpa, *Anal. Chim. Acta.*, 2005, **539**, 237.
- [61] B. Yang, A. Kotani, K. Aral, F. Kusu, *Anal. Sci.*, 2001, **17**, 599.
- [62] P.A. Kilmartin, H. Zou, A.L. Waterhouse, *J. Agric. Food Chem.*, 2001, **49**, 1957.
- [63] P.A. Kilmartin, C.F. Hsu, *Food Chem.*, 2003, **82**, 501.
- [64] E.I. Korotkova, Y.A. Karbainov, A.V. Shevchuk, *J. Electroanal. Chem.*, 2002, **518**, 56.
- [65] E.I. Korotkova, Y.A. Karbainov, O.A. Avramchik, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2003, **375**, 465.
- [66] E.I. Korotkova, O.A. Avramchik, T.V. Kagiya, Y.A. Karbainov, N.V. Tcherdyntseva, *Talanta*, 2004, **63**, 729.
- [67] Y.I. Tur'yan, P. Gorenbein, R. Kohen, *J. Electroanal. Chem.*, 2004, **571**, 183.
- [68] G.K. Budnikov, G.K. Ziyatdinova, D.M. Gil'Metdinova, *J. Anal. Chem.*, 2004, **59**, 654.
- [69] G.K. Ziyatdinova, H.C. Budnikov, V.I. Pogorel'tzev, T.S. Ganeev, *Talanta*, 2006, **68**, 800.
- [70] L.K. Shpigun, M.A. Arharova, K.Z. Brainina, A.V. Ivanova, *Anal. Chim. Acta*, 2006, **573–574**, 419.
- [71] K.Z. Brainina, A.V. Ivanova, E.N. Sharafutdinova, E.L. Lozovskaya, E.I. Sharkina, *Talanta*, 2007, **71**, 13.
- [72] N. Nenadis, O. Lazaridou, M.Z. Tsimidou, *J. Agric. Food Chem.*, 2007, **55**, 5452.
- [73] J. Chen, L. Gorton, B. Akesson, *Anal. Chim. Acta*, 2002, **474**, 137.
- [74] S. Steenken, P. Neta, *J. Phys. Chem.*, 1982, **86**, 3661.
- [75] J. Małyszko, M. Mechanik, *Polish J. Chem.*, 2004, **78**, 1575.
- [76] A. Mitrai, A. Ouchi, K. Mukai, A. Tokunaga, K. Mukai, K. Abe, *J. Agric. Food Chem.*, 2008, **56**, 84.
- [77] M.J.T.J. Arts, G.R.M.M. Haenen, H.-P. Voss, A. Bast, *Food Chem. Toxicol.*, 2004, **42**, 45.
- [78] O. Friaa, D. Brault, *Org. Biomol. Chem.*, 2006, **4**, 2417.
- [79] K.S. Santosh, K.I. Priyadarsini, K.B. Sainis, *Redox Rep.*, 2002, **7**, 35.
- [80] S.B. Lee, C.Y. Lin, P.M.W. Gill, R.D. Webster, *J. Org. Chem.*, 2005, **70**, 10466.
- [81] J. Małyszko, M. Karbarz, *J. Electroanal. Chem.*, 2006, **595**, 136.
- [82] M. Karbarz, J. Małyszko, *Electroanalysis*, 2008, **20**, 1884.
- [83] A. Kotani, M. Adagiri, K. Takamura, F. Kusu, *J. Electroanal. Chem.*, 2008, **624**, 323.
- [84] M. Karbarz, *Rozprawa doktorska*, Wydział Chemiczny Politechniki Rzeszowskiej, Rzeszów 2008.
- [85] D.-O. Kim, K.W. Lee, H.J. Lee, C.Y. Lee, *J. Agric. Food Chem.*, 2002, **50**, 3713.
- [86] A. Gliszczyńska-Święto, *Food Chem.*, 2006, **96**, 131.
- [87] R.L. Prior, X. Wu, K. Schaich, *J. Agric. Food Chem.*, 2005, **53**, 4290.
- [88] P. Stratil, B. Klejdus, V. Kubáň, *J. Agric. Food Chem.*, 2006, **54**, 607.
- [89] B.K. Głód, C. Kowalski, *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 2004, **13/S12**, 23.
- [90] B.K. Głód, K. Kaczmarski, K. Baumann, *Chem. Anal.* 2006, **51**, 51.
- [91] M. Antolovich, P.D. Prenzler, E. Patsalides, S. McDonald, K. Robards, *Analyst*, 2002, **127**, 183.
- [92] D. Huang, B. Ou, R.L. Prior, *J. Agric. Food Chem.*, 2005, **53**, 1841.
- [93] L.M. Magalhaes, M.A. Segundo, S. Reis, J.L.F.C. Lima, *Anal. Chim. Acta*, 2008, **613**, 1.
- [94] *Przeciwutleniacze w żywności*, praca zbiorowa pod red. W. Grajka, Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa 2007, rozdz. 10.

**ALLELOPATYCZNE WŁAŚCIWOŚCI
METABOLITÓW WTÓRNYCH
ROŚLIN UPRAWNYCH**

**ALLELOCHEMICAL PROPERTIES OF PLANT CROP
SECONDARY METABOLITES**

Izabela Jasicka-Misiak

*Katedra Chemii Analitycznej i Ekologicznej, Wydział Chemii, Uniwersytet Opolski,
ul. Oleska 48, 45-052 Opole
e-mail: izajm@uni.opole.pl*

Abstract

1. Allelopatia – terminologia i rys historyczny
 2. Lokalizacja allelozwiązków w tkankach roślin oraz sposoby ich przedostawania się do środowiska.
 3. Aktywność biologiczna allelozwiązków produkowanych przez rośliny
 - 3.1. Karotany (dukany) – seskwiterpenoidy z nasion marchwi
 - 3.2. Fenolowe i terpenowe związki roślin zbożowych
 - 3.3. Allelozwiązki zawarte w roślinach słonecznika
 4. Allelozwiązki jako potencjalne pestycydy
- Piśmiennictwo cytowane
-



Dr Izabela Jasicka-Misiak – adiunkt w Katedrze Chemii Analitycznej i Ekologicznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Opolskiego. Studia magisterskie w Instytucie Chemii Uniwersytetu Opolskiego, w latach 1990–1995 na kierunku Chemia ze specjalnością agrobiochemia. Stopień doktora nauk chemicznych z zakresu chemii produktów naturalnych uzyskała w 2005 roku.

Głównym tematem jej zainteresowań naukowych jest izolacja, identyfikacja oraz badanie aktywności biologicznej substancji pochodzenia naturalnego z różnych źródeł.

ABSTRACT

Allelopathy has been defined by the International Allelopathy Society as „any process involving secondary metabolites produced by plants, microorganisms, viruses and fungi that influence the growth and development of agricultural and biological systems, including positive and negative effects [1]”. Allelochemicals can be released into the environment and despite what effect they evoke towards living organisms this kind of specific chemical interactions is known as „allelopathy”.

Allelopathic phenomena have been observed and studied from ancient times. Theophrastus from Eresos, a disciple of Aristotle, reported an inhibitory effect of pigweed *Polygonum spp.* on alfalfa in ca. 350 B.C., whereas Pliny described the harmful effects of several plants on cropland in ca. 1 A.D. [2–5]. Although chemical interactions between plants have been known for thousands years, the term allelopathy was used for the first time in 1937 [5]. It derives from Latin words *allelon* („of each other”) and *pathos* („to suffer”) and refers to the chemical interactions among species. In recent years there has been an increasing interest towards the perspective of exploiting allelopathy and allelochemicals as an alternative strategy for controlling weeds in particular, but also for controlling insects and plant diseases.

Plants produce a wide variety of secondary metabolites that play important roles in ecological interactions. This is one, probably the most pronounced, of a variety of ways in which certain plants can protect themselves against competition, infection or feeding in their natural habitats. Some of secondary metabolites may also play an important role in chemical mediation of growth and development of plant communities. These substances are called „allelochemicals” and are released into the environment in order to interfere with the growth of competing plants or act as chemical defence against pathogens and animals. Therefore such compounds might be considered as constituents of plant defence system and could be treated as a kind of chemical weapons. Originally, compounds like allelochemicals were thought to occur exclusively in higher plants. Ongoing research, however, has revealed them also to be synthesized by bacteria, lower plants and fungi.

Allelochemicals may furnish an entirely new generation of naturally produced weed-controlling compounds, replacing synthetic herbicides and other pesticides with non-acumulatting easy-degradable substances.

Keywords: allelopathy, allelochemicals, terpenes, phenolic compounds, natural pesticides

Słowa kluczowe: allelopatia, allelozwiązki, terpeny, związki fenolowe, naturalne pestycydy

1. ALLELOPATIA – TERMINOLOGIA I RYS HISTORYCZNY

Termin *allelopatia* wprowadzony został w pierwszej połowie XX wieku; wywodzi się on z języka greckiego i jest połączeniem dwóch słów: *allelon* – wzajemny i *pathos* – oddziaływanie, cierpienie, wrażliwość. Pojęcie to wprowadził do terminologii biochemicznej austriacki fizjolog Hans Molisch, w 1937 roku. Obejmowało ono oddziaływania typu inhibitorowego (hamującego) i stymulatorowego (pobudzającego) pomiędzy gatunkami roślin wyższych, glonów, grzybów wyższych oraz mikroorganizmów [1, 2]. Definicja wprowadzona przez Molischa nadal znajduje uznanie, niemniej jednak ulega zmianom wraz z rozwojem wiedzy dotyczącym zjawiska allelopatii [3–5]. Obecnie istnieje tendencja do poszerzania zakresu pojęcia allelopatii, dlatego też wielu autorów do zjawisk allelopatycznych zalicza także interakcje pomiędzy wydzielinami albo produktami biotransformacji składników strukturalnych części organizmów (opadłe liście, resztki poźniwne) a innymi organizmami. Obecność tych związków chemicznych może mieć wpływ na rozwój innych osobników gatunku wydzielającego, np. potomstwa [6].

Związki, które uczestniczą w oddziaływaniach pomiędzy organizmami, nazywane są związkami allelopatycznymi (allelozwiązkami) lub allelopatynami. Pojęcie „allelozwiązki” zostało wprowadzone do literatury przez Whittakera i Feeny’ego [7]. Z kolei Law i Regnier zaproponowali termin „semiochemikalia”. Później wprowadzono podział na feromony i allelozwiązki, w zależności od tego, czy substancje biorą udział w oddziaływaniach między osobnikami tego samego, czy też różnych gatunków. W miarę postępu badań zależności ekologicznych pomiędzy organizmami, wśród związków allelopatycznych wyróżniono:

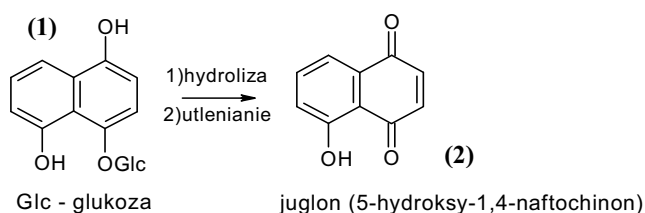
- allomony, związki chemiczne produkowane bądź pozyskiwane przez organizm, korzystne dla tego organizmu;
- kairomony, związki chemiczne korzystne dla organizmu odbierającego je;
- synomony, związki chemiczne korzystne zarówno dla organizmu, który je produkuje, jak i odbiera.

Z kolei, w zależności od przynależności taksonomicznej organizmu wydzielającego, a także odbierającego allelozwiązek, wprowadzono do literatury pojęcia odnoszące się do konkretnych przypadków interakcji, i tak:

- koliny to substancje chemiczne wytwarzane przez rośliny wyższe i oddziałujące na inne rośliny wyższe;
- marazminy to substancje chemiczne wytwarzane przez mikroorganizmy i wpływające na rozwój roślin wyższych;
- fitonocydy to metabolity roślin wyższych, hamujące rozwój mikroorganizmów;
- antybiotyki, czyli substancje wytwarzane i uwalniane w wyniku oddziaływań allelopatycznych pomiędzy mikroorganizmami [2].

Ponadto w oddziaływaniach roślin wyższych z mikroorganizmami wyróżnia się fitoaleksyny, grupę związków chemicznych produkowanych *de novo* przez rośliny, w odpowiedzi na infekcję przez mikroorganizmy [2].

Oddziaływanie jednych roślin na inne obserwowano od momentu, gdy człowiek rozpoczął uprawę roślin oraz w miarę nabywania doświadczenia i dokonywania zmian w ekosystemach. Za autora pierwszych spostrzeżeń dotyczących zjawiska allelopatii uważa się Teofrasta z Eresos (372–285 p.n.e.). Około 350 lat p.n.e. ten uczeń Arystotelesa, zwany ojcem ekologii, podał przykład wpływu roślin rdestu (*Polygonum L.*) na wzrost i rozwój lucerny [2]. Znacznie później, sławny chiński botanik i farmaceuta Lee Shi-Yen, żyjący w latach 1518–1593, opisał podobne zjawiska, dotyczące gatunków roślin wykazujących właściwości lecznicze i wykorzystywanych w medycynie [2]. W 1832 roku szwedzki botanik Augustyn de Candolle, jako jeden z pierwszych zaobserwował i opisał przypadki, w których miały miejsce chemiczne oddziaływania pomiędzy gatunkami roślin wyższych [2, 3, 8]. Zauważył, że osty rosnące w kukurydzy oddziaływały niekorzystnie na wysiewany jako kolejny w płodozmianie owies [8]. De Candolle opisał również doświadczenia, w których korzenie fasoli, zanurzone w wodzie zawierającej substancje wydzielone przez korzenie innych roślin tego samego gatunku, słabły i obumierały [8]. Ponad 50 lat później (1881 rok) P.R. Hoy i J.S. Stickney opisali podobny efekt powodowany przez wydzieliny korzenia orzecha włoskiego *Juglans nigra L.* [2]. W 1925 roku Massey przeprowadził klasyczne już dzisiaj doświadczenie, w którym sprawdzał oddziaływanie orzecha włoskiego na pomidory i lucernę. Zaobserwował on mianowicie, iż na powierzchni koła o średnicy około 30 m od pnia drzewa, wiele roślin słabo się rozwija i zamiera [8]. Obszar, w którym rośliny pomidorów były osłabione, wyraźnie pokrywał się z zasięgiem korzeni drzewa. Toksyną wydzielaną przez orzech okazał się 4-glukozyd-1,4,5-trihydroksynaftalenu (1), który poprzez hydrolizę i utlenianie zostaje przekształcony do juglonu (5-hydroksy-1,4-naftochinonu) (2) (Rys. 1). Juglon jest jednym z silniejszych fitotoksycznych allelozwiązków – hamuje wzrost wielu roślin w stężeniu niższym niż 1 μM [9–11].



Rysunek 1. Schemat powstawania juglonu
Figure 1. Release of juglone into environment

Rośliny wyższe są grupą organizmów, której poświęcono najwięcej uwagi w badaniach zjawiska allelopatii. Fakt ten nie powinien budzić zdziwienia, gdyż to właśnie rośliny, aby zapewnić sobie odpowiednie warunki do życia w zajmowanych niszach ekologicznych, konkurują pomiędzy sobą o wodę, światło i składniki pokarmowe. Muszą również bronić się przed patogenami i fitofagami, a wszystko to przy bardzo ograniczonych możliwościach aktywnego poruszania się. Dlatego też, w toku

rozwoju ewolucyjnego, rośliny wykształciły różne strategie zarówno obrony, jak i ataku [8]. Jedną z najbardziej uniwersalnych jak się wydaje jest wydzielanie do środowiska różnego typu związków chemicznych.

2. LOKALIZACJA ALLELOZWIĄZKÓW W TKANKACH ROŚLIN ORAZ SPOSOBY ICH PRZEDOSTAWANIA SIĘ DO ŚRODOWISKA

Większość roślin jest na stałe związana z miejscem, w którym rozpoczął się ich rozwój i wzrost. To ograniczenie jest jednym z powodów, dla których wydzielanie związków chemicznych do środowiska życia może być traktowane jako efektywny sposób indukowania procesów sprzyjających rozwojowi rośliny, natomiast percepcja znajdujących się tam substancji postrzegana jest jako równie efektywny sposób rejestrowania zmian zachodzących w obrębie siedliska. Mimo iż hamowanie rozwoju roślin konkurujących o zasoby środowiska jest jedynie jedną ze strategii optymalizacji warunków życia, to większość dostępnych informacji dotyczy takich właśnie oddziaływań, noszących nazwę allelopatii.

Zjawisko allelopatii zostało opisane w różnych ekosystemach zarówno naturalnych, jak i zagospodarowanych [4]. Jednakże szczególnym zainteresowaniem, ze względu na możliwości wykorzystania tego zjawiska w praktyce rolniczej, a szczególnie w zintegrowanej ochronie plonów, cieszą się allelozwiązki funkcjonujące w agroekosystemach.

Naturalnymi źródłami substancji o tak interesujących właściwościach są zazwyczaj rośliny, które skutecznie konkurują o zasoby środowiska, a równocześnie opierają się atakom fagów i patogenów. Allelozwiązki wykryto we wszystkich zarówno wegetatywnych, jak i generatywnych organach roślin, [4], niemniej jednak największe znaczenie allelopatyczne przypisuje się substancjom zawartym w organach wegetatywnych. Najbogatszym źródłem allelozwiązków są liście, gdzie allelochemikalia występują w największych ilościach. W organach tych allelozwiązki gromadzone są w wyspecjalizowanych gruczołach wydzielniczych, zwanych trichomami, które umiejscowione są zazwyczaj w najbardziej zewnętrznej warstwie komórek tkanki okrywającej, epidermie lub też w głębszych warstwach, pod epidermą [12].

Liczne prace dowodzą także obecności tych substancji w nasionach [13]. Substancje wydzielone do podłoża przez nasiona mogą je zabezpieczyć przed atakiem patogenów grzybowych, a równocześnie „kontrolować” termin ich kiełkowania poprzez narzucenie im spoczynku bezwzględnego.

Stwierdzono również, iż zawartość allelozwiązków zależy od wieku rośliny. W znacznie większych ilościach uwalniane są one z roślin młodych, aniżeli z roślin dojrzałych i starzejących się.

Większość roślin produkuje, a następnie magazynuje produkty wtórnej przemiany materii, w tym allelozwiązki, w specjalnie do tego celu przeznaczonych strukturach. Przypuszcza się, iż lokalizacja tych substancji w wyspecjalizowanych tkan-

kach bądź komórkach roślin jest często powiązana z ich funkcją biologiczną. Obecność wielu metabolitów wtórnych stwierdzono w gruczołach wydzielniczych zewnętrznej warstwy naskórka. Substancje tam zmagazynowane włączane są w oddziaływanie roślin z owadami lub mikroorganizmami w trakcie bezpośredniego kontaktu tych organizmów z zawartością gruczołów. Stanowią one niejako odpowiedź rośliny na atak określonego czynnika zewnętrznego. Stwierdzono także, iż substancje wydzielane i lokalizowane w gruczołach wytworzonych w epidermie charakteryzują się silniejszą aktywnością fitotoksyczną niż te umiejscowione w głębszych warstwach komórek. Związkom znajdującym się w epidermie często przypisuje się udział w allelopatycznych oddziaływaniach pomiędzy roślinami. Do grupy takich substancji zalicza się przede wszystkim terpeny, które produkowane przez jedne gatunki roślin hamują wzrost i rozwój roślin żyjących w sąsiedztwie. Z kolei głębiej, w wakuolach komórek znajdujących się pod pojedynczą warstwą epidermy, stwierdzono znaczną zawartość związków fenolowych. Podczas uszkodzenia komórki przez fitopatogeny, w plastydach następuje szybka synteza chinonów ze związków fenolowych przy udziale oksydazy polifenolowej. Powstałe w tych warunkach chinony wchodzą w skład systemu obronnego roślin. Tego typu przemiany są typowe dla substancji zlokalizowanych pod epidermą [12, 14].

Rośliny, wykształcając specyficzne struktury, w których mogą gromadzić substancje allelopatyczne, zabezpieczają w ten sposób swój organizm przed autointoksykacją. Przykładem mogą być silnie fitotoksyczne allelozwiązki artemizinin i hiperycyna, które produkujące je rośliny magazynują w specyficznych organellach, w bezpiecznym dla siebie miejscu, unikając w ten sposób autointoksykacji [12, 14].

Allelozwiązki wyprodukowane przez roślinę w określonym miejscu i celu mogą przedostawać się do środowiska wieloma sposobami. Substancje allelopatyczne bardzo często są wydzielane zarówno przez korzenie, jak i przez części nadziemne rosnącej rośliny, mogą też być wymywane z rozkładającego się materiału roślinnego [1]. Uwalnianie substancji allelopatycznych z części nadziemnych odbywa się bądź przez emisję lotnych związków, bądź też poprzez ługowanie z pędów i ulistnienia przez deszcz, mgłę czy krople rosy. Związki te są wydzielane przez gruczoły znajdujące się najczęściej w mezofilu roślin lub są uwalniane z uszkodzonych włosków główkowatych albo pęcherzykowatych, znajdujących się na powierzchni rośliny, w warstwie epidermy. Nieco rzadziej opisuje się wydzielanie do ryzosfery przez system korzeniowy roślin. W opinii wielu badaczy, najważniejszym źródłem emisji allelozwiązków jest wymywanie tego rodzaju substancji albo ich prekursorów z obumarłych tkanek roślinnych. Opisano też przypadki, w których substancje allelopatyczne powstały jako produkty uboczne mikrobiologicznego rozkładu materii organicznej gleby [15, 16].

Allelozwiązki wydzielane do gleby mogą być przekształcane do form mniej aktywnych lub wręcz do związków nieaktywnych. Mogą być szybko wiązane przez połączenia mineralne występujące w glebie, tworząc kompleksy organiczno-mineralne traktowane jako część substancji humusowych. Te z kolei są dalej przekształ-

cane w procesach biologicznych. Przykładem tego typu przemian jest zdolność związków fenolowych do polimeryzacji w glebach ilastych. Naturalny kompleks glebowy może brać udział w detoksykacji substancji allelopatycznych wydzielanych przez rośliny. Cały ten proces zależy jednak od fizykochemicznej natury gleby oraz od występujących w niej mikroorganizmów i ich aktywności.

Związki allelopatyczne, pobierane z gleby przez korzenie roślin, są prawdopodobnie transportowane także do innych organów, dlatego też ich działanie może ujawnić się w obrębie różnych tkanek i komórek [1].

3. AKTYWNOŚĆ BIOLOGICZNA ALLELOZWIĄZKÓW PRODUKOWANYCH PRZEZ ROŚLINY

Substancje aktywne allelopatycznie są w większości niskocząsteczkowymi metabolitami wtórnej przemiany materii o relatywnie prostej budowie chemicznej. Błyskawiczny rozwój technik analitycznych, który nastąpił w ostatnich latach, umożliwił wyizolowanie oraz określenie struktury chemicznej ogromnej liczby (około 100 000) allelozwiązków [17–20]. Równocześnie trwające, rozległe badania zjawiska allelopatii z wykorzystaniem szerokiego spektrum testów biologicznych pozwoliły zdefiniować aktywność większości tych różnorodnych strukturalnie allelozwiązków.

Wiele ze związków wykazujących właściwości allelopatyczne wchodzi w skład systemu obronnego roślin i bierze udział w interakcjach z innymi organizmami. Wszystkie gatunki roślin produkują substancje będące wtórnymi metabolitami i należące do różnych strukturalnie klas związków chemicznych. Właściwościami allelopatycznymi charakteryzują się nie tylko rośliny powszechnie uważane za toksyczne, ale również rośliny uprawne, w tym warzywa.

Szczególną grupę wśród substancji o właściwościach allelopatycznych zajmują mono- i seskwiterpeny. Większość z nich wchodzi w skład olejków eterycznych. Mieszaniny te nadają wydzielającym je roślinom charakterystyczny aromat, dlatego też zarówno one, jak i ich składniki znalazły szerokie zastosowanie w przemyśle spożywczym i perfumeryjnym. Przykład stanowią między innymi olejki otrzymane z oregano (*Origanum vulgare*), z majeranku (*Origanum majorana*), z tymianku (*Thymus capitatus*, *Thymus vulgaris*) lub z lawendy (*Lavandula angustifolia*). Od niedawna wzrosło również zainteresowanie olejkami eterycznymi i ich terpenowymi składnikami jako czynnikami odgrywającymi szczególną rolę w systemie obronnym roślin. Stwierdzono, że mogą one pełnić funkcje obronne przeciwko patogenom grzybowym i bakteryjnym [21–27], owadom [28, 29], jak również przeciw roślinom konkurencyjnym [30–32].

Wiele spośród monoterenów i ich pochodnych zostało opisanych jako inhibitory kiełkowania nasion i wzrostu niektórych gatunków roślin, czyli substancje posiadające właściwości herbicydowe [33–37]. Tworkoski [38] zbadał aktywność herbicydową 25 olejków eterycznych. Stwierdził, że spośród przetestowanych najwyższą aktywnością charakteryzował się olejek cynamonowy (*Cinnamomum zeylanicum*

Blume) zawierający 84% eugenolu. Z oleju eterycznego z nawłoci pospolitej (*Solidago virgaurea* L.), charakteryzującego się aktywnością herbicydową i przeciwgrzybową, wyizolowano między innymi: α -pinen, β -pinen, sabinen, limonen, α -humulen czy β -kariofilen. Z kolei olej pozyskany z gatunku *Ageratum conyzoides* L., jest bogaty w takie związki, jak prekocen I, prekocen II, należące do fenylpropenoidów oraz terpeny β -kariofilen, γ -bisabolen i inne. Zbadano wpływ tego olejku na wzrost roślin testowych: ogórka, rzodkiewki i pomidora. Okazało się, że jest on inhibitorem wzrostu, hamuje zarówno przyrost masy, jak i wzrost korzenia i hypokotyła badanych roślin. Wiadomo również, że główny składnik oleju, prekocen, wykazuje aktywność antybakteryjną [39]. Monoterpeny, takie jak α - i β -pinen, limonen oraz citronelol wyekstrahowano również z liści *Citrus aurantium* L. W testach *in vitro* hamowały one wzrost szarłata szorstkiego (*Amaranthus retroflexus* L.) jednego z bardziej odpornych na syntetyczne herbicydy chwastów [40].

Monoterpeny cykliczne, ze względu na sprzyjający układ atomów w cząsteczce, mogą łatwo tworzyć epoksydy. Mostek tlenowy albo spina pierścień wewnątrz, albo wiąże łańcuch boczny z pierścieniem. Przykładami takich struktur są 1,8-cineol oraz jego naturalny analog 1,4-cineol wchodzące w skład olejków eterycznych wielu gatunków roślin, między innymi z ruty zwyczajnej (*Ruta graveolus* L.) oraz z szalwi (*Salvia* spp.). Związki te są głównymi składnikami odpowiedzialnymi za właściwości allelopatyczne tych olejków. Bardzo silnie ograniczają kiełkowanie i wzrost wielu gatunków chwastów zarówno jedno-, jak i dwuliściennych [32, 41]. Ich zastosowanie praktyczne w rolnictwie jest jednak niemożliwe ze względu na dużą lotność tych połączeń.

Odporność roślin na infekcje przez grzyby jest wynikiem wytwarzania w tkankach substancji uniemożliwiających inwazję patogena. Przykładem związku o takim charakterze jest ipomeamaron, seskwiterpen występujący w batatach (*Ipomea batatas*). Jego poziom w tkankach rośliny wyraźnie wzrasta po zakażeniu grzybem *Ceratomyella fimbriata* [1]. Zatem jest to fitoaleksyna. Kolejnym przykładem jest gwajanolidynowy seskwiterpen letucenina A, którą wyizolowano z liści sałaty porażonej przez *Pseudomonas chichorii* [42, 43].

Ważnym związkiem zapobiegającym zakażeniom bakteriami i grzybami, a także odstrasżającym owady jest seskwiterpenowy dimer gossypol. Związek ten występuje w niektórych odmianach bawełny [1]. Warto dodać, że gossypol jest chemosterylantem i powoduje czasową niepłodność mężczyzn. Stwierdzono to w Chinach, gdy używano oleju z bawełny do przyrządzania potraw [44]. Z kolei seskwiterpenowa rzytytyna uczestniczy w oddziaływaniu ziemniak–zaraza ziemniaczana *Phytophthora infestans*, ograniczając rozwój grzyba w początkowym okresie infekcji [3].

Dehydroazulanina C jest gwajanolidowym laktone seskwiterpenowym, który wyizolowano z korzeni wielu gatunków roślin z rodziny *Compositae*. Substancja ta wykazuje aktywność fitotoksyczną w stosunku do różnych gatunków roślin zarówno jedno-, jak i dwuliściennych [44, 45], co jest wynikiem dwojakiego mechanizmu działania tego związku. Układ α -metylenolaktonowy jest odpowiedzialny za hamo-

wanie kiełkowania i wzrostu roślin, natomiast ugrupowanie cyklopentenonowe pełniące rolę akceptora Michaela, odpowiada za plazmolizę oraz zakłócanie funkcji membran plazmatycznych [46]. Do tej samej klasy związków należy partenina wyizolowana z *Parthenium hysterophorus* L. Substancja ta oraz jej strukturalne analogi wykazują silną aktywność fitotoksyczną [47–51]. Ponadto partenina jest selektywną fitotoksyną, która ogranicza kondensację chlorofili, hamuje procesy fotosyntezy oraz aktywność niektórych enzymów, na przykład proteaz i amylaz w tkankach *Ageratum conyzoides* L. [41].

Artemizininę, również należącą do klasy laktonów, i jej strukturalne analogi otrzymano z pędów bylicy rocznej (*Artemisia annua* L.). Substancja ta znana jest przede wszystkim jako efektywny środek stosowany przeciwko malarii. Jednakże artemizininą wykazuje również silną aktywność fitotoksyczną. Substancja ta w stężeniu 33 μM hamuje w 50% wzrost korzeni testowanych roślin dwuliściennych. Podobną aktywność zarówno w stosunku do roślin jedno-, jak i dwuliściennych wykazują syntetyczne analogi artemiziny, które ograniczają kondensację chlorofili i karotenoidów w tkankach testowanych roślin [52]. Z kolei ailantom, należący do klasy laktonów kwasinoidowych, zidentyfikowany został w bożodrzewie (*Ailanthus altissima* (Mill.)), gatunku z rodziny rutowatych, jako główny składnik ekstraktu posiadający aktywność herbicydową [53]. Związek ten okazał się jednak bardzo szybko biodegradowany przez mikroorganizmy glebowe i w trakcie tych procesów tracił swą aktywność [53].

Większość naturalnych laktonów seskwiterpenowych wykazuje silną aktywność herbicydową wyłącznie w warunkach laboratoryjnych; w warunkach polowych jest ona znacznie niższa. Dlatego też służą one przede wszystkim jako wzorce struktur, na bazie których tworzone są syntetyczne analogii wykazujące wyższą aktywność pestycydową w warunkach polowych.

Odmianą strukturalnie grupą substancji o potencjalnych właściwościach allelopatycznych są saponiny. Substancje te są glikozydowymi pochodnymi triterpenów, a dokładniej steroli. Obecność w cząsteczce saponin hydrofobowej części triterpenowej (steroidowej) i hydrofilowej reszty cukrowej nadaje tym substancjom charakter amfifilowy. Mogą one zatem działać jako surfaktanty destabilizując błony biologiczne, z czym, jak się przypuszcza, związana jest między innymi ich aktywność herbicydowa oraz przeciwgrzybowa [54].

Sz szczególnie bogatym źródłem saponin są rośliny należące do niektórych rodzajów lucerny (*Medicago sativa*). Rośliny te posiadają właściwości allelopatyczne, które przypisuje się obecności saponin, a dokładnie glikozydowi kwasu medikagenowego [55, 56].

Substancje allelopatyczne wydzielane przez organy roślinne do roztworu glebowego mogą oddziaływać na organizmy konkurencyjne. Wśród substancji allelopatycznych rozpuszczalnych w wodzie najczęściej wymienia się związki fenolowe, benzoksyzynoidy, glukozynolany i ich pochodne, jak również niektóre kwasy organiczne.

Do grupy prostych fenoli należą między innymi fenylopropenoidy i ich pochodne, które pełnią w roślinach zazwyczaj rolę ochronną przed infekcją mikroorganizmów; wiele z nich ma charakter fitoaleksyn. Na przykład, niektóre odmiany cebuli (*Allium cepa* L.) zawierające kwas protokatechowy, wykazują dużą odporność na porażenie grzybem *Colletotrichum circinans* [1].

Silnymi inhibitorami wzrostu roślin są także kwasy fenolowe zidentyfikowane w wielu gatunkach roślin, między innymi należących do rodzin: liliowatych (*Liliaceae*), rdestnicowatych (*Potamogetonaceae*), różowatych (*Rosaceae*) oraz psiankowatych (*Solanaceae*). Wśród tych allelopatyn najczęściej wymienia się kwasy: kumarynowy, ferulowy, wanilinowy, syrenowy i *p*-hydroksybenzoesowy [57]. Wymieniony wyżej kwas ferulowy wraz z kwasem kofeinowym zostały opisane jako allelozwiązki powszechnie występującej paproci orlica pospolita (*Pteridium aquilinum* L.). Jak wykazały badania, w stanowiskach tego gatunku trudno znaleźć inne rośliny, a przyczyną takiej dominacji jest aktywność fitotoksyczna obu kwasów wymywanych przez deszcz z obumarłych pędów [8]. Kwasy benzoesowy i cynamonowy hamują wzrost i wywołują zniekształcenia morfologiczne korzeni soi [58].

Ze względu na obecność kwasu *p*-hydroksybenzoesowego i wanilinowego, wydzieliny z korzeni czerwonej papryki, wykazują działanie autotoksyczne, hamują wzrost korzeni zarodkowych papryki rosnącej w uprawie monokulturowej [59].

Jedną z lepiej poznanych silnych toksyn roślinnych jest sorgoleon (2-hydroksy-5-metoksy-3-[(8'z,11'z)-8',11',14'-pentadekatrieno]-*p*-benzochinon) [60–62]. Związek ten należący do benzochinonów oraz jego hydrochinonowa pochodna są allelozwiązkami zidentyfikowanymi w wydzielinach z korzeni sorgo (*Sorghum* spp.). Wyniki szczegółowych badań aktywności sorgoleonu wskazują, iż hamuje on centra reakcji fotochemicznych, szczególnie fotosystemu II (PS II). Jest on kompetycyjnym inhibitorem dioksygenazy hydroksyfenylopirogronianowej, a rezultatem jego działania jest ograniczenie syntezy plastochinonu [63, 64]. W testach *in vitro* okazał się dużo bardziej aktywny niż powszechnie stosowany herbicyd – atrazyna [65].

Kumaryna oraz jej pochodne, między innymi skopoletyna, są silnymi inhibitorami zarówno kiełkowania nasion, jak i wzrostu wielu gatunków roślin [66]. Z kolei psoralen, jeden z głównych składników ekstraktu z ruty zwyczajnej *Ruta graveolens* (Rue) oraz popularnego warzywa, selera (*Apium graveolens* L.), należący do klasy furanokumaryn, hamuje kiełkowanie nasion sałaty w stężeniu 1ppb [66]. Psoralen i jego pochodne interkalują z DNA i pod wpływem promieniowania ultrafioletowego ulegają fotochemicznej reakcji z DNA, tworząc z nim kowalencyjne addukty – sieciuje on DNA [67].

Z metanolowego ekstraktu z roślin groszku zielonego (*Pisum sativum*) wyizolowano izoflawonoidowy allelozwiązek – pizatyne. Substancja ta hamowała wzrost roślin testowych, między innymi rzeżuchy i sałaty, w zakresie stężeń między 10 μ M a 30 μ M. Wyniki tych badań są pierwszymi, które dotyczą substancji allelopatycznych produkowanych przez groszek [68].

Do produktów wtórnej przemiany materii, odgrywających znaczącą rolę w oddziaływaniach roślina–roślina oraz roślina–mikroorganizm, zalicza się szereg substancji, które w swej strukturze posiadają azot. Do substancji tych zalicza się między innymi alkaloidy, benzoksazyzyny, betalainy, glikozydy cyjanogenne, glukozynolany oraz aminokwasy niebiałkowe. Większość z tych związków wywodzi się od aminokwasów i ich pochodnych, wiele z nich to glikozydy zawierające reszty cukrowe.

Interesującą grupą związków zarówno pod względem budowy strukturalnej, jak i różnorodnej aktywności biologicznej są alkaloidy. Zainteresowanie grupą alkaloidów sięga czasów antycznych i było związane głównie z aktywnością tych związków w stosunku do organizmu ludzkiego oraz ich wpływem na zwierzęta. Obecnie rezultaty większej liczby badań wskazują również, że alkaloidy pełnią rolę substancji chroniących roślinę przed infekcją mikroorganizmów oraz pełnią funkcję deteryentów pokarmowych odstrasżających zwierzęta roślinożerne. Istnieją również przykłady alkaloidów, które wykazują aktywność fitotoksyczną w stosunku do wielu gatunków roślin [69, 70]. Z pieprzu długiego *Piper longum* L. wyizolowano piperydynowy alkaloid – pipernonalinę, która wykazała aktywność fungitoksyczną w stosunku do kilku patogennych grzybów [71].

Jednym z popularniejszych alkaloidów, zawartym w nasionach kawy (*Coffea* spp.), kakaowca (*Theobroma cacao*), kola (*Cola* spp.) oraz liściach herbaty chińskiej (*Thea sinensis*), służących do przemysłowego przygotowywania używek pobudzających funkcje organizmu człowieka jest alkaloid purynowy – kofeina (1,3,7-trimetyloksantyna). Stwierdzono, iż substancja ta jest silną fitotoksyną, którą można byłoby wykorzystać jako naturalny herbicyd. W stężeniu około 2000 ppm całkowicie hamuje ona kiełkowanie oraz w znacznym stopniu ogranicza wzrost chwastów [72, 73].

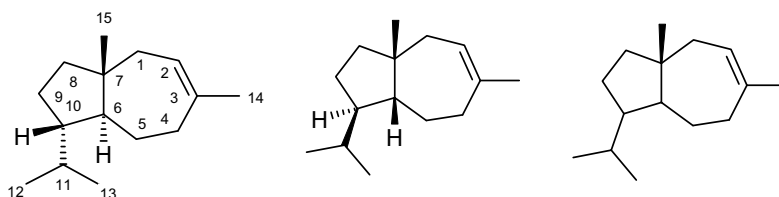
Glukozynolany, zwane także glikozydami olejków gorzycznych, są kolejną grupą metabolitów wtórnych występujących w wielu gatunkach roślin należących do rodziny krzyżowych (*Brassicaceae=Cruciferae*) i pokrewnych. W cząsteczkach tych związków glukoza połączona jest wiązaniem S-glikozydowym z rodnikiem alifatycznym bądź aromatycznym. Rośliny bogate w glukozynolany zawierają w komórkach idioblastycznych enzym mirozynazę (tioglikozydaza – EC 3.2.3.1.) biorący udział w reakcjach hydrolizy glukozydu do wolnej glukozy oraz lotnych związków o charakterze tiocyjanianu, izotiocyjanianu czy nitrylu. Enzym ten jest uwalniany podczas niszczenia struktur komórkowych, na przykład przez rozdrabnianie. W niektórych roślinach, obok mirozynazy, występuje również specyficzna izomeraza, która po odłączeniu glukozy katalizuje izomeryzację układu izotiocyjanianowego w tiocyjanianowy (rodankowy) [74].

Badania aktywności lotnych produktów enzymatycznych przemian glukozynolanów dowiodły, iż związki te mogłyby zostać wykorzystane jako potencjalne herbicydy i fungistatki. Substancje te w znacznym stopniu hamują bowiem kiełkowanie nasion wielu gatunków chwastów [75, 76], jak również ograniczają rozwój fitopatogenów [77].

Wysoki potencjał allelopatyczny posiadają także niektóre aminokwasy, głównie aminokwasy niebiałkowe. Związki te mogą w różnoraki sposób zakłócać prawidłowy wzrost i rozwój roślin, na które będą oddziaływać. Jako analogi aminokwasów białkowych, aminokwasy niebiałkowe mogą być włączane zamiast nich w struktury białka i powodować utratę pierwotnej aktywności biologicznej tych białek (powstają tak zwane białka niefunkcjonalne). Taki mechanizm działania prezentują między innymi kanawanina oraz kwas 2-amino-4-metyloheksenowy. Niebiałkowe aminokwasy mogą także hamować aktywność syntetazy aminoacylo-tRNA, jak również inne etapy biosyntezy białek. Przykładem może być asparagina wydzielana przez korzenie młodych siewek lucerny (*Medicago*) do gleby, gdzie hamuje wzrost siewek pszenicy i lucerny [78].

3.1. KAROTANY (DAUKANY) – SESKWITERPENOIDY Z NASION MARCHWI

Karotany, zamiennie nazywane również daukanami, to niezbyt liczna grupa związków należących do seskwiterpenów. Do klasy tej zalicza się substancje posiadające charakterystyczny piętnastowęglowy szkielet (Rys. 2).



Rysunek 2. Szkielet węglowy karotanów/daukanów
Figure 2. Skeleton of carotanes/daucanes

Substancje te wyizolowano z roślin wyższych, należących między innymi do rodziny baldaszkowatych (*Umbelliferae*), różowatych (*Rosaceae*) oraz złożonych (*Compositae*) (Rys. 3, **struktury 3–15**). Ponadto zidentyfikowano je w niektórych grzybach. Z grzybni *Aspergillus terreus* wyizolowano na przykład kwas (**3**), a z *Glocladium virens* fulwoferugininę (**4**) wykazującą aktywność przeciwbakteryjną oraz przeciwgrzybową. Innym źródłem tych seskwiterpenów są wątrobowce (**5**) oraz gąbki morskie z rodzaju *Higginsia* (**6**) [79].

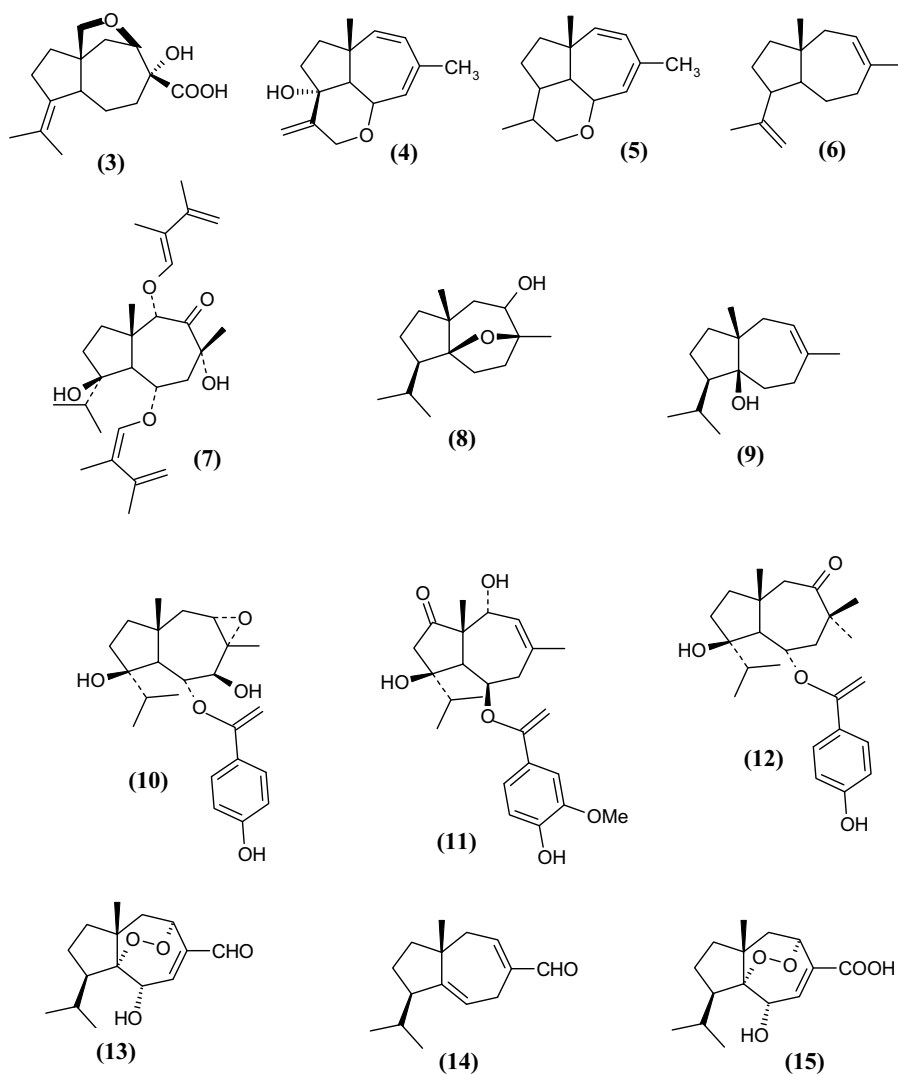
Pierwszą zidentyfikowaną substancją, posiadającą charakterystyczną daukanową strukturę węglową, była laserpetyna (**7**), wyizolowana z okrzyemu szerokolistnego (*Laserpitium latifolium* L.), rośliny należącej do rodziny baldaszkowatych. Kolejnym seskwiterpenem, wyizolowanym w 1909 roku z oleju z nasion marchwi i posiadającym charakterystyczny bicykliczny szkielet węglowy, był daukol (5,8-epoksy-9-daukanol) (**8**). W roku 1925 z tego samego źródła pozyskano kolejny karotanowy seskwiterpen, a mianowicie karotol (8-dauken-5-ol) (**9**). Alkohole te, jak stwierdzono, odpowiadają za charakterystyczny, świeży zapach marchwi [80, 81]. Niewielkie

ilości karotolu zidentyfikowano również w korzeniach marchwi [82], ale wyniki te nie zostały potwierdzone w kolejnych badaniach [83–85].

Jednym z częściej wymienianym źródeł karotanów są rośliny z rodziny baldaszkowatych. Na przykład, kilka nieopisanych wcześniej seskwiterpenoidów o strukturze daukanów wyizolowano z suchych owoców, korzeni i łodyg roślin *Ferula kuhstanica*: **(10)**, **(11)**, **(12)**. Substancje te stosowane w dawkach porównywalnych do dawek standardowo używanych antybiotyków, takich jak ampicylina czy chloramfenikol, wykazały aktywność przeciwko Gram(–) bakteriom, między innymi *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* i *Bacillus subtilis* [86].

Badania dotyczące właściwości allelopatycznych wodnego ekstraktu z liści róży *Rosa rugosa* Thunb., oraz jego wpływu na drobnoustroje dowiodły, że w liściach tej rośliny, po uszkodzeniu, wytwarzana jest substancja hamująca rozwój mikroorganizmów [87]. Związkiem odpowiedzialnym za tę aktywność okazał się rugozal A **(13)**, również seskwiterpen o strukturze karotanu, zawierający α,β -nienasyconą grupę aldehydową. W trakcie dalszych badań dotyczących właściwości allelopatycznych róży ogrodowej wyizolowano i zidentyfikowano prekursor rugozalu A, którym okazał się karota-1,4-dien-14-al. **(14)** [88]. Związek ten łatwo ulegał utlenianiu tlenem atmosferycznym, w wyniku czego tworzył się szereg jego utlenionych pochodnych. Rugozal A okazał się głównym produktem tych przemian [89–91]. Stwierdzono również, iż karota-1,4-dien-14-al jest biosyntetyzowany w wyspecjalizowanych komórkach sekrecyjnych (trichomach), gdzie ulega utlenieniu do rugozalu A, a ten z kolei utlenia się do kwasu rugozowego A **(15)**, który nie posiada już właściwości hamujących rozwój mikroorganizmów. Wysokie stężenie rugozalu A (500 ppm i wyższe) w liściach róży sugeruje, iż jest on głównym allelozwiązkiem odpowiedzialnym za odporność tej rośliny na porażenia przez fitopatogeny. Ponadto rugozal A wykazuje również właściwości antyfidantne w stosunku do gąsienic żerujących na liściach tytoniu [91].

Pochodne daukanowe zostały wyizolowane i zidentyfikowane również w oleju z nasion marchwi. Olej ten stanowi mieszaninę terpenoidów, które produkowane są również przez inne rośliny. Godnym uwagi jest jednak karotol **(9)**, główny i specyficzny dla roślin marchwi, seskwiterpenowy alkohol należący do klasy daukanów. Fungicydowa aktywność karotolu, porównywalna z aktywnością surowego oleju, wskazuje, iż związek ten jest głównym allelopatycznym składnikiem nasion marchwi [92]. Ponadto karotol oraz drugi główny składnik oleju z nasion marchwi, kariofilen, wykazują silne właściwości hamujące kiełkowanie i wzrost roślin testowych [93]. Z kolei z wodnego ekstraktu z nasion marchwi wyizolowano wykazujący fitotoksyczną aktywność kwas krotonowy [94].

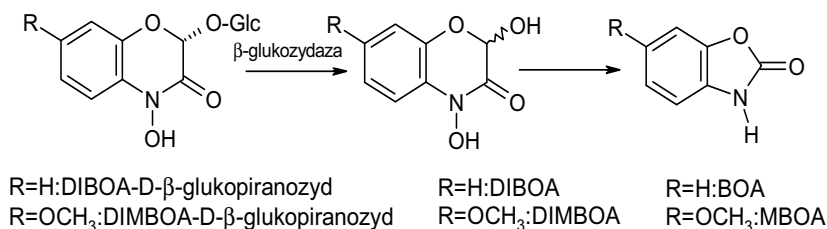


Rysunek 3. Struktury seskwiterpenów karotanowych
 Figure 3. Structures of carotane-like sesquiterpenes

3.2. FENOLOWE I TERPENOWE ZWIĄZKI ROŚLIN ZBOŻOWYCH

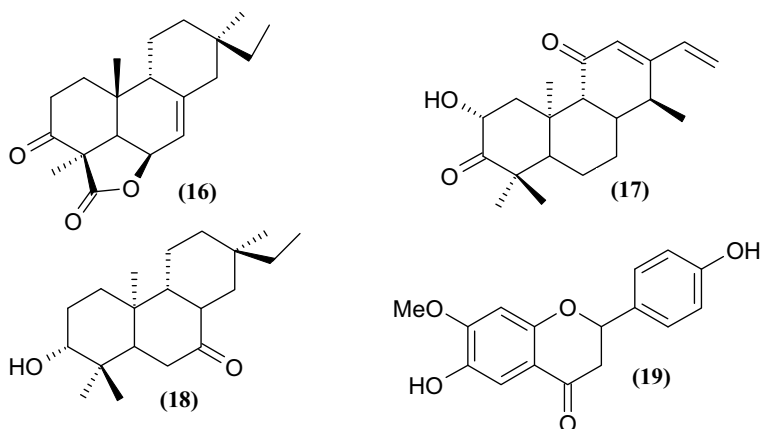
Kolejną dobrze poznaną grupą substancji wykazujących właściwości allelopatyczne są związki zidentyfikowane w roślinach zbożowych. Należą do nich benzoksazynoidy (Rys. 4), a wśród nich cykliczne kwasy hydroksamowe: 2,4-dihydroksy-1,4-benzoksazy-3-on (DIBOA) oraz 2,4-dihydroksy-7-metoksy-1,4-benzoksazy-3-on (DIMBOA), których obecność po raz pierwszy stwierdzono w roślinach

z rodziny traw *Gramineae*. Kwasy te zidentyfikowano także w gatunkach roślin należących do rodzin *Acanthaceae* i *Ranunculaceae*, gdzie jak stwierdzono, pełnią głównie funkcje obronne przeciwko owadom oraz mikroorganizmom [95–97]. DIMBOA jest dominującą formą w roślinach pszenicy i kukurydzy, natomiast DIBOA jest głównym kwasem hydroksamowym występującym w życie. W wodnym ekstrakcie z ziaren żyta zidentyfikowano jeszcze BOA, benzoksazolinon, który jest produktem rozpadu DIBOA. Badania aktywności biologicznej zarówno kwasów hydroksamowych, jak również ich połączeń w formie β -D-glikozydów, dowiodły, iż wszystkie badane substancje okazały się inhibitorami wzrostu testowanych roślin, jednakże największą aktywność wykazywał DIBOA [98, 99]. Stwierdzono również, że podczas infekcji roślin przez grzyba *Puccinia graminis* dochodzi do rozpadu glikozydu DIMBOA. Natomiast powstały po tym rozpadzie wolny DIMBOA powoduje zamieranie porażonych komórek, a tym samym hamuje rozwój grzyba. Obecności kwasów hydroksamowych w roślinach kukurydzy przypisuje się jej odporność na infekcje bakteryjne, szczególnie powodowane przez bakterie z rodzaju *Erwinia* spp. [100]. Liczne badania wykazały także, że kwasy te hamują kiełkowanie i wzrost wielu gatunków chwastów [101, 102].



Rysunek 4. Struktury benzoksazyzoidów
Figure 4. Structures of benzoxyazinoids

W roślinach ryżu (*Oryza sativa* L.) system obronny składa się z biblioteki około 15 związków. Fitotoksyny te należą do diterpenów i są to momilaktony (**16**), fitokazany (**17**), oryzoaleksyny (**18**) oraz sekunaretyny (**19**) (Rys. 5). Substancje te wykazują silne właściwości herbicydowe w stosunku do popularnych w uprawach ryżu chwastów *Echinochloa crusgalli* L. i *Cyperus difformis* L. [103].

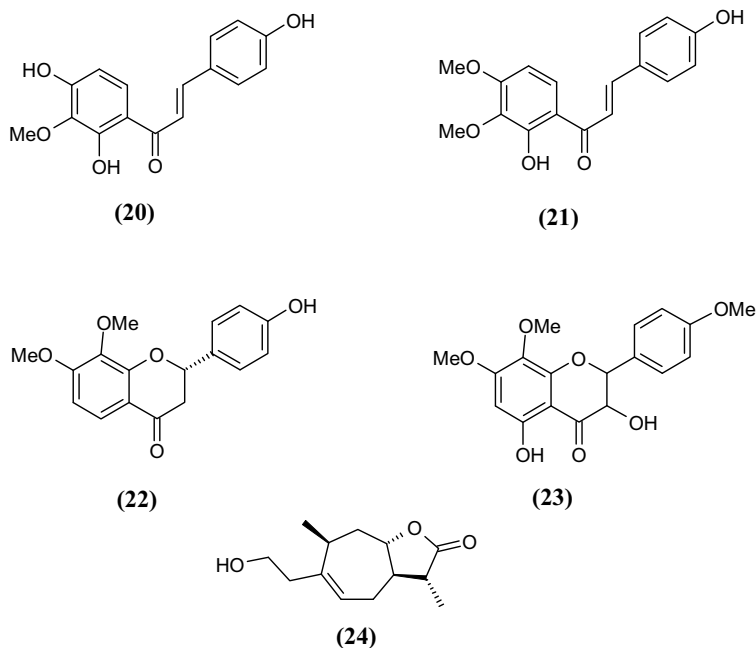


Rysunek 5. Wybrane allelozwiązki występujące w roślinach ryżu (*Oryza sativa* L.)
 Figure 5. Chosen allelochemicals fund in rice (*Oryza sativa* L.)

3.3. ALLELOZWIĄZKI ZAWARTE W ROŚLINACH SŁONECZNIKA

Słonecznik (*Helianthus* spp.) jest rośliną, która w uprawach doskonale eliminuje konkurencyjne rośliny. W różnych odmianach słonecznika zidentyfikowano ponad 200 substancji o silnych właściwościach allelopatycznych. Substancje fenolowe: kulkulanina B (20), heliannony A (21) i B (22) oraz tambulina (23) wykazały silną inhibicję wzrostu pędów pomidora i jęczmienia, których to gatunków roślin użyto do testów aktywności biologicznej [104–106].

Z roślin słonecznika *Helianthus* sp. wyodrębniono szereg laktonów seskwiterpenowych o aktywności allelopatycznej [107, 108]. Wiele spośród nich wykazuje bardzo interesującą aktywność fitotoksyczną w niskich stężeniach, jak na przykład lakton o strukturze (24), wyizolowany z wydzielin kielkujących nasion słonecznika, który w stężeniu 30 ppm w 50% ogranicza wzrost siewek roślin testowych. Związek ten należy do klasy gwajanolidów, które to substancje wraz z laktonami o strukturze germakranolidów zwracają szczególną uwagę badaczy, ze względu na obiecujące właściwości herbicydowe (Rys. 6).



Rysunek 6. Wybrane allelozwiązki wyizolowane z roślin słonecznika (*Helianthus* sp.)
Figure 6. Selected allelochemicals isolated from sunflower (*Helianthus* sp.)

4. ALLELOZWIĄZKI JAKO POTENCJALNE PESTYCYDY

Wiedza gromadzona w miarę postępu badań oddziaływań pomiędzy organizmami pozwala na lepsze zrozumienie przyczyn zmian w ich fizjologii i zachowaniu się. Dzięki temu można coraz efektywniej kontrolować liczebność i obszar występowania tych spośród nich, które uważa się za niepożądane w danym miejscu i czasie. Zagadnienie to nabiera szczególnego znaczenia w rolnictwie traktowanym jako podstawowy sposób pozyskiwania pożywienia. W sytuacjach, kiedy rozwój szkodliwych organizmów zaczyna zagrażać interesom ludzi, podejmujemy z nimi walkę.

Od czasu rozpoczęcia badań skutków ubocznych stosowania pestycydów, znacznie rozszerzono zakres testów toksykologicznych i badań transformacji tych związków w środowisku. Nowo rejestrowane substancje aktywne są znacznie częściej rezultatem syntez prowadzonych metodami chemii kombinatoryjnej albo efektem racjonalnego projektowania, jak również prób wykorzystania zjawiska allelopatii i allelozwiązków.

Badania nad chemicznymi i biologicznymi właściwościami allelozwiązków roślinnych cieszą się szczególnym zainteresowaniem ze względu na możliwość wykorzystania ich jako potencjalnych pestycydów. Związki produkowane przez rośliny i mikroorganizmy jako metabolity wtórne stanowią niewyczerpalne niemalże

źródło struktur do produkcji farmaceutyków, insektycydów, a szczególnie fungicydów oraz herbicydów. Ponadto, substancje te bardzo często prezentują nowe, nieznanе dotąd mechanizmy działania, co w dobie pojawiania się wciąż nowych gatunków roślin odpornych na stosowane, syntetyczne herbicydy jest faktem niezmiernie ważnym i interesującym.

Z toksykologicznego punktu widzenia, niewątpliwą zaletą, która przemawia za wykorzystaniem allelozwiązków w praktyce, jest krótki czas połowicznego rozpadu tych substancji oraz ich szybka biodegradacja przez mikroorganizmy.

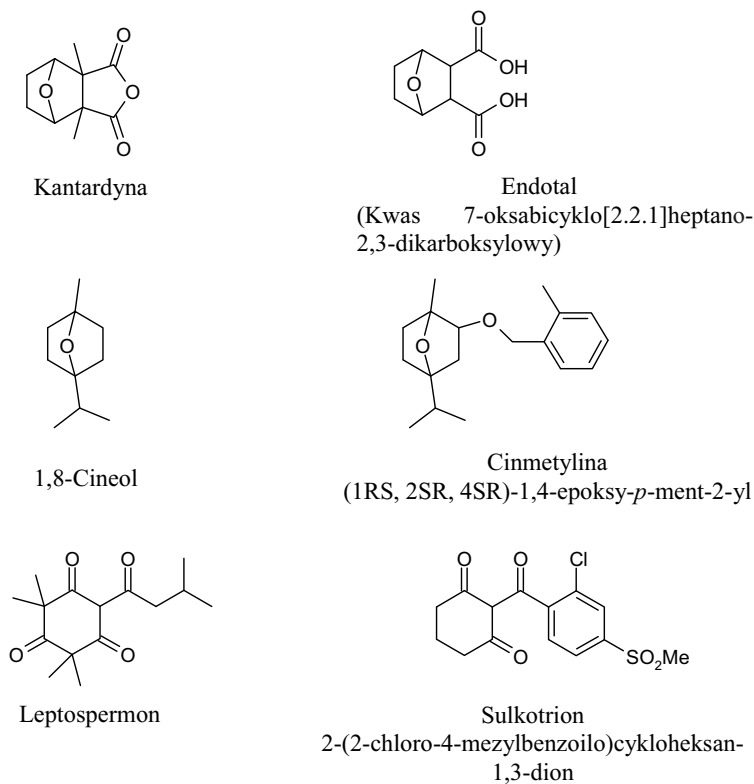
Wobec mnogości przykładów substancji allelopatycznych hamujących rozwój roślin, wydawać by się mogło, że zastosowanie tych substancji jako herbicydów lub innych pestycydów, to jedynie kwestia czasu. Tymczasem liczba przykładów ich zastosowania jako środków komercyjnych nie jest zbyt duża. Stosowanie allelozwiązków jako herbicydów w praktyce napotyka bowiem na wiele trudności. Przeszkody te w dużej mierze związane są ze złożoną strukturą samych substancji naturalnych. Zazwyczaj są to związki o dużej masie cząsteczkowej, nie będące polimerami, posiadające kilka centrów chiralnych. Wszystkie te wymienione cechy substancji pochodzenia naturalnego sprawiają, że ich synteza bywa trudna, wieloetapowa i przysparza chemikom wielu problemów. Z kolei pozyskiwanie tych substancji – ich izolacja z naturalnych źródeł oraz identyfikacja – jest procesem czasochłonnym, a przede wszystkim kosztochłonnym i nieopłacalnym z ekonomicznego, a co za tym idzie użytkowego punktu widzenia. Przeprowadzanie wszelkich modyfikacji w strukturze substancji naturalnych, czyli tworzenie ich analogów, prowadzi bardzo często do utraty pierwotnej aktywności lub zmiany jej charakteru [109].

Kolejną przeszkodą w stosowaniu substancji o właściwościach allelopatycznych jest niewielki zasięg oddziaływań oraz wymagane, bardzo precyzyjne dobranie dawki, zależne nie tylko od gatunku rośliny – celu działania, ale też od jej fazy rozwojowej. Często również zdarza się, iż izolowane są i identyfikowane substancje już znane.

Równie ważnym ograniczeniem w praktycznym zastosowaniu allelochemikałów jest toksyczność tych substancji w stosunku do ssaków, w tym również do człowieka. Substancje produkowane przez rośliny bądź grzyby, niejednokrotnie są silniejszymi toksynami niż popularne syntetyczne trucizny [110].

Pomimo wymienionych trudności, istnieją przykłady zastosowania allelozwiązków jako herbicydów. Jednym z naturalnych herbicydów, który znajduje nabywców i jest stosowany zarówno w Europie, jak i w Azji jest cinmetylina (Argold®, Cinch®). Substancja ta jest strukturalnym analogiem 1,4-cineolu, naturalnej toksyny roślinnej będącej składnikiem olejków eterycznych wielu gatunków roślin (Rys. 7). Została ona odkryta i zbadana przez *Shell Chemicals*. Wyniki tych badań wykazały, że 1,4-cineol jest bardzo silnym inhibitorem syntetazy asparaginowej, enzymu biorącego udział w biosyntezie aminokwasów [111]. Podstawnik benzyloeterowy, który został podłączony do pierścienia 1,4-cineolu spowodował zmniejszenie lotności cineolu, a co za tym idzie możliwość właściwego zastosowania go w warunkach polowych. Cinmetylina jest umiarkowanie efektywnym inhibitorem wzrostu roślin, sto-

sowanym głównie w kontroli chwastów jednoliściennych. Wyniki ostatnio prowadzonych badań [32] dowiodły różnic w aktywności 1,4-cineolu i 1,8-cineolu.



Rysunek 7. Podobieństwa strukturalne pomiędzy wybranymi allelozwiązkami roślinnymi a komercyjnymi herbicydami

Figure 7. Structural similarities between selected plant allelochemicals and commercially available herbicides

Kolejną klasą stosunkowo nowych bioherbicydów są triketony, związki będące pochodnymi leptospermonu, toksyny produkowanej przez rośliny z rodzaju *Calisperm* spp. [112, 113]. Triketony są inhibitorami enzymu biorącego udział w biosyntezie karotenoidów i plastochinonu – dioksygenazy *p*-hydroksyfenylopirogro-nianu (HPPD), ich aktywność objawia się niedoborem chlorofilu w roślinach, co powoduje powstanie charakterystycznych nekrotycznych plam. Na bazie struktur tych naturalnych toksyn powstały syntetyczne herbicydy sulkotrión i mezotrión, silne inhibitory HPPD [114]. Rysunek 7 przedstawia podobieństwa w strukturach stosunkowo prostych allelosubstancji, produkowanych przez rośliny i syntetycznych, komercyjnie dostępnych herbicydów [112, 114, 115].

Aktualne możliwości wykorzystania allelopatii w rolnictwie związane są zatem przede wszystkim z syntezą analogów allelochemikaliów jako substancji aktywnych pestycydów. Ogromne możliwości zastosowania allelozwiązków w praktyce dają

genetyczne modyfikacje roślin prowadzące do wytwarzania pożądanych ilości tych związków w ich tkankach. W wielu ośrodkach prowadzone są badania nad produkcją gatunków roślin charakteryzujących się takimi cechami.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] Kopcewicz J., Lewak S. (red.), 1998, *Podstawy fizjologii roślin*, PWN, Warszawa.
- [2] J. Mizutani, Crit. Rev. Plant Sci., 1999, **18**, 653.
- [3] C.H. Chou, Crit. Rev. Plant Sci., 1999, **18**, 609.
- [4] E. L. Rice., *Allelopathy*, 2nd ed., 1984, Academic Press, Orlando, FL.
- [5] G.R. Waller, *Allelochemicals: Role in agriculture and forestry*, ACS Sympozjum Seria 330, 1987, American Chemical Society, Washington, DC.
- [6] R. Aldrich., *Ekologia chwastów uprawnych*, 1997, Tow. Chem. Inż. Ekol., Opole.
- [7] R.H. Whittaker, P.P. Feeny, Science, 1971, **171**, 757.
- [8] J.B. Harborne, *Ekologia biochemiczna*, 1997, PWN, Warszawa.
- [9] W.J. Rietveld, J. Chem. Ecol., 1983, **9**, 295.
- [10] R.J. Willis, Allelopathy J., 2000, **7**, 1.
- [11] I. Kocacaliskan, I. Terzi, J. Hortic. Sci. Biotechnol., 2001, **76**, 436.
- [12] S.O. Duke, M.V. Duke, R.N. Paul, J.F.S. Ferreira, K.C. Vaughn, C. Canl, M.R. Tellez, A.M. Rimando, R.J. Smeda, [w:] *Recent advances in allelopathy* vol.1, A science for the future, 1999, Servicio de Publicaciones-Universidad de Cádiz.
- [13] K. Yamada, T. Anai, K. Hasegawa, Phytochemistry, 1995, **39**, 1031.
- [14] F.E. Dayan, S.O. Duke, Pestic. Outlook, 2003, **4**, 175.
- [15] M. An, J.E. Pratley, T. Haig, J. Chem. Ecol., 1997, **23**, 1979.
- [16] U. Blum, J. Chem. Ecol., 1997, **23**, 347.
- [17] J.C. Sacchettini, C.D. Poulter, Science, 1997, **277**, 1788.
- [18] K. Tamemoto, Y. Takaishi, B. Chen, K. Kawazoe, H. Shibata, T. Higuti, G. Honda, M. Ito, Y. Takeda, O.K. Kodzhimatov, O. Ashurmetov, Phytochemistry, 2001, **58**, 763.
- [19] M. Tellez, R. Estell, E. Fredrickson, D. Havstad, J. Essen. Oil Res., 1997, **9**, 619.
- [20] M. Tellez, R. Estell, E. Fredrickson, J. Powell, D. Wedge, K. Schrader, M. Kobaisy, J. Chem. Ecol., 2001, **27**, 2263.
- [21] N.G. Porter, P.E. Smale, M.A. Nelson, A.J. Hay, J.W. Van Klink, C.M. Dean, New Zealand J. Botany, 1998, **36**, 125.
- [22] N.G. Porter, A.L. Wilkins, Phytochemistry, 1998, **50**, 407.
- [23] M.V. Bh. Reddy, P. Angers, A. Gosselin, J. Arul, Phytochemistry, 1998, **47**, 1515.
- [24] M. Krauze-Baranowska, M. Mardarowicz, M. Wiwart, L. Pobłocka, M. Dynowska, Z. Naturforsch., 2002, **57c**, 478.
- [25] P.P. Alvarez-Castelano, C.D. Bishop, M.J. Pascual-Villalobos, Phytochemistry, 2001, **57**, 99.
- [26] D.J. Daferera, B.N. Ziogas, M.G. Polissiou, J. Agric. Food Chem., 2000, **48**, 2576.
- [27] D.J. Daferera, B.N. Ziogas, M.G. Polissiou, Crop Protect., 2003, **22**, 39.
- [28] M.B. Isman, Crop Protect., 2000, **19**, 603.
- [29] S.-T. Chang, S.-S. Cheng, S.-Y. Wang, J. Chem. Ecol., 2001, **27**, 717.
- [30] R.K. Kohli, D. Batish, H.P. Singh, Crop Protect., 1998, **17**, 119.
- [31] M.B. Isman, Pest. Outlook, 1999, **2**, 68.
- [32] J.G. Romagni, S.N. Allen, F.E. Dayan, J. Chem. Ecol., 2000, **26**, 303.
- [33] C.Y. Ragasa, J.A. Rideou, J.O. Sy, D. Alcachupas, V.M.I. Inte, J.C. Coll, Phytochemistry, 1997, **46**, 151.

- [34] N. Dudai, A. Poljakoff-Mayber, A.M. Mayer, E. Putievsky, H.R. Lerner, *J. Chem. Ecol.*, 1999, **25**, 1079.
- [35] M. Kobaisy, M.R. Tellez, C.L. Webber, F.E. Dayan, K.K. Schrader, D.E. Wedge, *J. Agric. Food Chem.*, 2001, **49**, 3768.
- [36] M. Kobaisy, M.R. Tellez, F.E. Dayan, S.O. Duke, *Phytochemistry*, 2002, **61**, 37.
- [37] R. Mata, R. Bye, E. Linares, M. Macias, I. Rivero-Cruz, O. Perez, B.N. Timmermann, *Phytochemistry*, 2003, **64**, 285.
- [38] T. Tworzoski, *Weed Sci.*, 2002, **50**, 425.
- [39] C. Kong, F. Hu, T. Xu, Y. Lu, *J. Chem. Ecol.*, 1999, **25**, 2347.
- [40] I.S. Al Saadawi, M.B. Arif, A.J. Al. Rubeaa, *J. Chem. Ecol.*, 1985, **11**, 1527.
- [41] H.P. Singh, D.R. Batish, R.K. Kohli, *Crop Protect.*, 2002, **21**, 347.
- [42] M. Takasugi, S. Okinaka, N. Katsui, T. Masamune, A. Shirata, M. Ohuchi, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1985, **1985**, 621.
- [43] S. Tahara, F. Hanawa, Y. Harada, J. Mizutani, *Agric. Biol. Chem.*, 1988, **52**, 2947.
- [44] J. Rinchar, A. Ciereszko, K. Dąbrowski, *J. Ottobre, Toxicol. Lett.*, 2000, **111**, 189.
- [45] F.A. Macias, J.C.G. Galindo, J.M.G. Molinillo, D. Castellano, *Phytochemistry*, 2000, **54**, 165.
- [46] J.C.G. Galindo, A. Hernandez, F.E. Dayan, M.R. Tellez, F.A. Macias, R.N. Paul, S.O. Duke, *Phytochemistry*, 1999, **52**, 805.
- [47] D.R. Batish, R.K. Kohli, D.B. Saxena, H.P. Sinhg, *Plant Growth Regul.*, 1997, **21**, 189.
- [48] D.R. Batish, R.K. Kohli, D.B. Saxena, H.P. Sinhg, *Curr. Sci.*, 1997, **73**, 369.
- [49] D.R. Batish, H.P. Sinhg, R.K. Kohli, S. Kaur, *J. Crop Product.*, 2001, **4**, 121.
- [50] D.R. Batish, H.P. Sinhg, R.K. Kohli, D.B. Saxena, S. Kaur, *Environ. Exp. Bot.*, 2002, **47**, 149.
- [51] S. Datta, D.B. Saxena, *Pest Manag. Sci.*, 2001, **57**, 95.
- [52] F.E. Dayan, A. Hernandez, S.N. Allen, R.M. Moraes, J.A. Vroman, M.A. Avery, S.O. Duke, *Phytochemistry*, 1999, **50**, 607.
- [53] R.M. Heisey, *Am. J. Bot.*, 1996, **83**, 192.
- [54] A. Osbourn, *Trends Plant Sci.*, 1996, **1**, 4.
- [55] W. Oleszek, M. Jurzysta, P.M. Górski, [w:] *Allelopathy: Basic and Applied Aspects*, 1992, Chapman and Hall, London, 151.
- [56] A.L. Anaya, *Crit. Rev. Plant Sci.*, 1999, **18**, 697.
- [57] H. Wu, T. Haig, J. Pratley, D. Lemerle, M. An, *J. Agric. Food Chem.*, 2001, **49**, 3742.
- [58] R. Baziramakenga, R.R. Simard, G.D. Leroux, *J. Chem. Ecol.*, 1994, **20**, 2821.
- [59] K. Tsuchiya, J.W. Lee, T. Hoshina, *Agric. Res.*, 1994, **28**, 1.
- [60] D.H. Netzly, J.L. Riopel, G. Ejeta, L.G. Butler, *Weed Sci.*, 1988, **36**, 441.
- [61] F.A. Einhellig, I.F. Souza, *J. Chem. Ecol.*, 1992, **18**, 1.
- [62] L. Weston., *Agron. J.*, 1996, **88**, 860.
- [63] J.A. Rasmussen, A.M. Hejl, F.A. Einhellig, J.A. Thomas, *J. Chem. Ecol.*, 1992, **18**, 197.
- [64] M.A. Czarnota, R.N. Paul, F.E. Dayan, L.A. Weston, *Weed Technol.*, 2001, **15**, 813.
- [65] J.C. Streibig, F.E. Dayan, A.M. Rimando, S.O. Duke, *Pestic. Sci.*, 1999, **55**, 137.
- [66] J.R. Vyvyan, *Tetrahedron*, 2002, **58**, 1631.
- [67] O. Gia, S. Mobilo, M. Palumbo, M.A. Pathak, *Photochem. Photobiol.*, 1993, **57**, 497.
- [68] H. Kato-Noguchi, *Phytochemistry*, 2003, **62**, 1141.
- [69] M. Wink, T. Twardowski, [w:] *Allelopathy: Basic and Applied Aspects*, 1992, Chapman and Hall, London, 129–150.
- [70] M. Wink, T. Schmeller, B. Latz-Brüning, *J. Chem. Ecol.*, 1998, **24**, 1881.
- [71] S.E. Lee, B.S. Park, M.K. Kim, W.S. Choi, H.T. Kim, K.Y. Cho, S.G. Lee, H.S. Lee, *Crop Protect.*, 2001, **20**, 523.
- [72] S.J.H. Rizvi, D. Mukerji, S.N. Mathur, *Agric. Biol. Chem.*, 1981, **54**, 1255.

- [73] S.J.H. Rizvi, V. Rizvi, D. Mukerji, S.N. Mathur, *Plant Soil*, 1987, **98**, 81.
- [74] B.A. Halkier, [w:] *Naturally Occurring Glycosides*, 1999, John Wiley and Sons, Chichester, 193.
- [75] S.F. Vauhgn, [w:] *Biologically Active Natural Products: Agrochemicals*, 1999, CRC Press, Boca Raton FL, Vauhgn S.F., 81.
- [76] J. Petersen, R. Belz, F. Walker, K. Hurle, *Agron. J.*, 2001, **93**, 37.
- [77] M. Reichelt, P.D. Brown, B. Schneider, N.J. Oldham, E. Stauber, J. Tokuhisa, D.J. Kliebenstein, T. Mitchel-Olds, J. Gershenzon, *Phytochemistry*, 2002, **59**, 663.
- [78] J.B. Harborn, *Nat. Prod. Rep.*, 1995, **12**, 83.
- [79] E.L. Ghisalberti, *Phytochemistry*, 1994, **37**, 597.
- [80] B.M. Fraga, *Stud. Natural Products*, 1989, **5**, 721.
- [81] D.A. Heatherbell, R.E. Wrolstad, L.M. Libbey, *J. Agric. Food Chem.*, 1971, **19**, 1069.
- [82] R.M. Seifert, R.G. Buttery, *J. Agric. Food Chem.*, 1978, **26**, 181.
- [83] R.G. Buttery, D.R. Black, W.F. Haddon, L.C. Ling, R. Teramshi, *J. Agric. Food Chem.*, 1979, **27**, 1.
- [84] F. Kjeldsen, L.P. Christensen, M. Edelenbos, *J. Agric. Food Chem.*, 2001, **49**, 4342.
- [85] K. Tamemoto, Y. Takaiishi, B. Chen, K. Kawazoe, H. Shibata, T. Higuti, G. Honda, M. Ito, Y. Takeda, O.K. Kodzhimatov, O. Ashurmetov, *Phytochemistry*, 2001, **58**, 763.
- [86] Y. Hashidoko, S. Tahara, J. Mizutani, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1991, **1991**, 1185.
- [87] Y. Hashidoko, S. Tahara, J. Mizutani, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, 1991, **1**, 211.
- [88] Y. Hashidoko, S. Tahara, J. Mizutani, *Z. Naturforsch.*, 1991, **46c**, 349.
- [89] Y. Hashidoko, S. Tahara, J. Mizutani, *Phytochemistry*, 1992, **31**, 779.
- [90] Y. Hashidoko, S. Tahara, J. Mizutani, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, 1993, **1**, 2351.
- [91] Y. Hashidoko, S. Tahara, J. Mizutani, *Phytochemistry*, 1996, **43**, 535.
- [92] I. Jasicka-Misiak, J. Lipok, E.M. Nowakowska, P.P. Wieczorek, P. Młynarz, P. Kafarski, *Z. Naturforsch C*, 2004, **59c**, 791.
- [93] I. Jasicka-Misiak, J. Lipok, P. Kafarski, *J. of Essential Oil Bearing-Plants*, 2002, **5**, 132.
- [94] I. Jasicka-Misiak, P.P. Wieczorek, P. Kafarski, *Phytochemistry*, 2005, **66**, 1485.
- [95] H.M. Niemeyer, *Euphytica*, 1988, **37**, 289.
- [96] A. Friebe, M. Schulz, P. Kück, H. Schnabl, *Phytochemistry*, 1995, **38**, 1157.
- [97] Y. Hashimoto, K. Shudo, *Phytochemistry*, 1996, **43**, 551.
- [98] M. Frey, P. Chomet, E. Glawisching, C. Stettner, S. Grün, A. Winklmair, W. Eisenreich, A. Bacher, R.B. Meeley, S.P. Briggs, K. Simcox, A. Gierl, *Science*, 1997, **277**, 696.
- [99] J.P. Barnes, A.R. Putnam, *Weed Sci.*, 1986, **34**, 384.
- [100] J.P. Barnes, A.R. Putnam, *J. Chem. Ecol.*, 1987, **13**, 889.
- [101] N.R. Burgos, R.E. Talbert, *Weed Sci.*, 2000, **48**, 302.
- [102] J. Grabiński, [w:] *Biochemiczne oddziaływania środowiskowe*, 2001, Akademia Medyczna, Lublin.
- [103] B.E. Scheffler, S.O. Duke, F.E. Dajan, E. Ota, *Resent Adv. Phytochem.*, 2001, **35**, 257.
- [104] R.J. Peters, *Phytochemistry*, 2006, **67**, 2307.
- [105] F.A. Macias, R.M. Varela, A. Torres, J.M.G. Molinillo, *Principles and Practice in plant ecology*, 1999, Boca Raton, FL: CRC Press., 531.
- [106] F.A. Macias, R.M. Oliva, R.M. Varela, A. Torres, J.M.G. Molinillo, *Phytochemistry*, 1999, **52**, 613.
- [107] S. Ohno, K. Tomita-Yokotani, S. Kosemura, M. Node, T. Suzuki, M. Amano, K. Yasui, T. Goto, S. Yamamura, K. Hasegawa, *Phytochemistry*, 2001, **56**, 577.
- [108] F.A. Macias., T. Ascension, J.M.G. Molinillo, R.M. Varela, D. Castellano, *Phytochemistry*, 1996, **43**, 1205.
- [109] B.R. Lieberman, S. Ellinger, E. Pinet, *Phytochemistry*, 1996, **42**, 1537.
- [110] S.O. Duke, F.E. Dayan, A.M. Rimando, K.K. Schrader, G. Aliotta., A. Oliva, J.G. Romagni, *Weed Sci.*, 2002, **50**, 138.

- [111] B.T. Grayson, K.S. Williams, P.A. Freehauf, R.R. Pease, W.T. Ziesel, R.L. Sereno, R.E. Reinsfelder, *Pesticide Sci.*, 1987, **21**, 143.
- [112] D.L. Lee, M.P. Prisbylla, T.H. Cromartie, *Weed Sci.*, 1997, **45**, 601.
- [113] G. Meazza, B.E. Scheffler, M.R. Tellez, A.M. Rimando, J.G. Romagni, S.O. Duke, D. Nanayakara, I.A. Khan, E.A. Abourashed., F.E. Dayan, *Phytochemistry*, 2002, **60**, 281.
- [114] F.E. Dayan, J. Romagni, M. Tellez, A. Rimando, S.O. Duke, *Pestic. Outlook*, 1999, **5**, 185.
- [115] F.E. Dayan, J. Romagni, S.O. Duke, *J. Chem. Ecol.*, 2000, **26**, 2079.

Praca wpłynęła do Redacji 17 grudnia 2007

**PERSPEKTYWY STOSOWANIA METODY
BLOKOWEJ DO SYNTEZY MODYFIKOWANYCH
OLIGONUKLEOTYDÓW W ROZTWORZE
I NA STAŁYM PODŁOŻU**

**PERSPECTIVES OF DIMERIC BUILDING BLOCK
APPROACH TO THE SYNTHESIS OF
OLIGONUCLEOTIDE ANALOGS
BY THE SOLID-PHASE SYNTHESIS
AND IN SOLUTION**

**Małgorzata Bukowiecka-Matusiak*¹,
Iwona Ziemecka²**

*¹ Zakład Biologii Strukturalnej, Katedra Endokrynologii Ogólnej,
Uniwersytet Medyczny w Łodzi
ul. Żeligowskiego 7/9, 90-752 Łódź
e-mail: gosia.matusiak@gmail.com*

² Self-Assembling Systems, Delft University of Technology (Delft, Holandia)

Abstract

Wstęp

1. Metoda syntezy oligonukleotydów w roztworze
2. Metoda syntezy oligonukleotydów na fazie stałej
3. Porównanie metod syntezy oligonukleotydów
4. Modyfikowane oligonukleotydy
5. Metoda syntezy blokowej oligonukleotydów chimerycznych

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane



Mgr Małgorzata Bukowiecka-Matusiak ukończyła chemię na Uniwersytecie Łódzkim w Katedrze Chemii Organicznej i Stosowanej. Pracę magisterską wykonała w Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN, w ramach współpracy naukowej i dydaktycznej pomiędzy UŁ i CBMiM PAN. W trakcie wykonywania pracy magisterskiej rozpoczęła pracę w CBMiM PAN w Zakładzie Chemii Bioorganicznej, gdzie po obronie pracy magisterskiej była słuchaczką Studium Doktoranckiego.

Praca doktorska, wykonana w Zakładzie Chemii Bioorganicznej CBMiM pt. „Stereoregularne P-chiralne chimeryczne oligonukleotydy o zaplanowanych właściwościach hybrydizacyjnych jako sondy w biologii strukturalnej” została wysłana do recenzji.

Obecnie pracuje w Zakładzie Biologii Strukturalnej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.

Mgr Małgorzata Bukowiecka-Matusiak jest współautorką 9 publikacji.



Mgr Iwona Ziemecka ukończyła Międzywydziałowe Studia Matematyczno-Przyrodnicze na Uniwersytecie Łódzkim uzyskując tytuł magistra chemii (lipiec 2008). W latach 2005–2006 w ramach programu Erasmus/Sokrates studiowała na Wydziale Chemii oraz Wydziale Biologii University of Groningen (Holandia) oraz uczestniczyła w projekcie badawczym (Stratingh Institute for Chemistry, Groningen, Holandia). Otrzymała Stypendium Ministra Edukacji i Sportu (2005/2006 i 2006/2007) oraz Stypendium Rektora Uniwersytetu Łódzkiego (2007/2008). Uzyskała dyplom w konkursie „Najlepsza Prezentacja” na 50 Zjeździe PTCh i SITPCh i 11 Międzynarodowej Chemii Środowiska (Toruń, 2007); autorka trzech artykułów (w tym dwóch samodzielnych). Prace magisterską wykonała w Zakładzie Chemii Bioorganicznej Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN w Łodzi. Od września 2008 roku, jest doktorantką w grupie Self-Assembling Systems, Delft University of Technology (Delft, Holandia).

ABSTRACT

Studies on properties and function of nucleic acids constitute the most fascinating cognitive area in biology, chemistry and medicine. Dynamic development of the required techniques, primarily Nuclear Magnetic Resonance (NMR) [4], or crystallization techniques, allowed to obtain a detailed information about structural diversity of complicated biological compounds, for example peptides and nucleic acids.

The replacement of one of the nonbonding oxygens of internucleotide bond by sulfur, selenium, methyl or other functionalized alkyl groups creates a stereogenic centre at the modified phosphorus atom [16]. This arises a question about availability of stereoregular, *P*-defined analogues of DNA and RNA.

Short synthetic oligonucleotides are indispensable tools in biomolecular and structural studies [5, 6]. They also have potential as therapeutics [13, 14] for manipulation of genes expression in a sequence specific manner.

The block synthesis assuming incorporation of *P*-chiral, diastereomerically pure *dimeric building blocks* is attractive, reliable and patent for automated approach to the synthesis of „*chimeric oligonucleotides*”, both in solution and on solid support [23].

The attention of researches turned toward chimeric constructs of **16** containing, in successive internucleotide positions, phosphates and methanephosphonates.

Reynolds *et al.* [34] found that for therapeutic applications, only chimeric oligonucleotides **16** with incorporated R_p -dinucleoside methanephosphonates had acceptable binding affinity towards complementary template of DNA and RNA. Isequential chimeric oligomers, constructed either from diastereomeric mixtures of dinucleoside methanephosphonates, or from those with S_p -configuration, form less stable duplexes with the same complementary RNA templates. The preparation of the aforementioned chimeras utilized a „*dimeric building blocks*” approach [23]. The corresponding dinucleoside (3',5')-methanephosphonates **17** were separated into diastereomers by chromatographic methods. After removal of the 3'-*O*-protecting group, the required R_p -isomers were activated at the 3'-*O*-position, and used as such for condensation *via* the phosphoramidite method [25]. Attempts towards their *P*-epimerization and recycling have failed. Such situation was notwithstanding the requirement of a cost-effective synthesis of new potential therapeutics. Therefore, Stec *et al.* [36–38], and efforts were undertaken in the design of a cost-effective synthesis of R_p -dinucleoside (3',5')-methanephosphonates **17**.

Keywords: block synthesis, chimeric oligonucleotides, phosphoramidite approach, H-phosphonate approach, phosphotriester approach

Słowa kluczowe: synteza blokowa, chimeryczne oligonukleotydy, metoda amidofosforynowa, metoda H-fosfonianowa, metoda fosfotriestrowa

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

DNA	– kwas deoksyrybonukleotydowy
RNA	– kwas rybodeoksynukleotydowy
DMT	– grupa 4,4'-dimetoksytrytylowa
FAST	– 3'-nieblokowane dinukleotydy, szybciej eluowane z kolumny wypełnionej żelem krzemionkowym w mieszaninie rozpuszczalników CHCl_3 ze wzrastającą zawartością EtOH)
SLOW	– 3'-nieblokowane dinukleotydy wolniej eluowane z kolumny w mieszaninie rozpuszczalników CHCl_3 ze wzrastającą zawartością EtOH)
DBU	– 1,8-diazabicyklo[5.4.0]-undec-7-ene
Oligo-PMe	– oligonukleotyd zawierający przynajmniej jedno metanofosfonianowe wiązanie internukleotydowe

WSTĘP

Obecne we wszystkich komórkach organizmów kwasy nukleinowe (DNA i RNA) determinują poprawny przebieg wielu procesów życiowych. To one zawierają informację genetyczną w sekwencji zasad nukleinowych zlokalizowanych w dwuniciowej helisie DNA oraz biorą udział w jej przekazywaniu. Cząsteczki DNA stanowią matrycę dla syntezy RNA o sekwencji komplementarnej do sekwencji genomowego DNA. Utworzony w wyniku transkrypcji mRNA zawiera informację wykorzystywaną bezpośrednio do syntezy białek w procesie translacji [1]. Zakłócenie któregoś z tych procesów może prowadzić do syntezy zmutowanych białek, czego efektem może być onkogeneza lub włączenie innych niekorzystnych procesów w organizmach żywych [2]. Kluczowe wydaje się więc posiadanie możliwie najpełniejszej wiedzy dotyczącej kwasów nukleinowych, ich struktur *in vivo*, oraz funkcji. Dlatego, od blisko trzydziestu lat, wysiłki wielu laboratoriów koncentrują się na opracowaniu metod sekwencyjnie zależnej inhibicji syntezy patogennych białek z wykorzystaniem genetyki molekularnej i komórkowej [3].

Rozwój nowoczesnych technik spektroskopowych, w tym magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) [4], pozwolił na badanie struktury oligonukleotydów, zarówno jednoniciowych, jak i tworzących struktury dwu- i więcej niciowe. Rozwój technik wielowymiarowych NMR [5] umożliwił ustalenie konformacji reszt cukrowych w roztworze (3'-endo, 2'-endo), ustalenie położenia zasad azotowych względem wiązania *N*-glikozydowego, a także odległości pomiędzy poszczególnymi atomami w strukturze [6]. Techniki te dają również możliwość określenia, czy podwójna helisa, utworzona pomiędzy syntetycznym oligonukleotydem a komplementarną matrycą DNA lub RNA, przyjmuje formę *B-DNA*, *A-DNA*, czy *Z-DNA*, oraz pozwalają badać wpływ modyfikacji zasad lub wiązania internukleotydu na strukturę i właściwości takich dupleksów.

Syntetyczne oligonukleotydy mogą być stosowane jako **sondy molekularne**, które posiadają zdolność specyficznego wiązania się za pomocą wiązań wodorowych (typu Watsona-Cricka) z wykrywaną nicią DNA lub RNA, przez co umożliwiają ich identyfikację [1]. Sondy molekularne wykorzystuje się m.in. w celu wczesnego wykrycia chorób o podłożu genetycznym, takich jak anemia sierpowata czy fenyloketonuria [7, 8].

Innym zastosowaniem syntetycznych oligonukleotydów jest wykorzystanie ich jako **starterów w łańcuchowej reakcji polimerazy** (ang. *Polymerase Chain Reaction*, PCR) [1]. Jest to metoda enzymatycznego powielania łańcuchów DNA w warunkach laboratoryjnych.

Syntetyczne oligonukleotydy i ich modyfikowane analogi (np. tiofosforany) mogą stanowić **potencjalne terapeutyki** w terapiach opartych na sekwencyjnie zależnym wyciszaniu określonych genów (onkogenów, genów wirusowych). **Strategia antysensowa** np. zakłada sekwencyjnie zależną inhibicję syntezy patogennych białek [9] poprzez asocjację komplementarnego (antysensowego) oligonukleotydu do określonej sekwencji cytoplazmatycznego dojrzałego mRNA i zahamowanie syn-

tezy białka na etapie *translacji*, w wyniku zablokowania dostępu rybosomu lub utworzenia heterodupleksu rozpoznawanego i degradowanego przez RNazę H [10, 11].

Syntetyczne oligonukleotydy wykorzystuje się również do wyciszania ekspresji genu o homologicznej sekwencji. Do tego celu odpowiednie są cząsteczki *siRNA* (ang. *small interfering RNA*). Powstają one przez pocięcie na fragmenty dwuniciowego RNA (np. wirusowego) w komórce, przez enzym Dicer. Krótkie siRNA wiążą się z kompleksem białkowym o aktywności rybonukleazy zwanym RISC [12]. Kompleks ten wiąże się z komplementarną do siRNA cząsteczką mRNA i tnie ją na fragmenty, uniemożliwiając w ten sposób powstanie białka kodowanego przez to mRNA.

Syntetyczne siRNA wykorzystywane są w biologii molekularnej, prowadzone są też badania nad zastosowaniem ich w medycynie [13, 14].

Syntetyczne oligonukleotydy, wykorzystywane w terapii genowej lub antysensowej, muszą spełniać szereg wymogów dotyczących ich struktury i właściwości. Powinny:

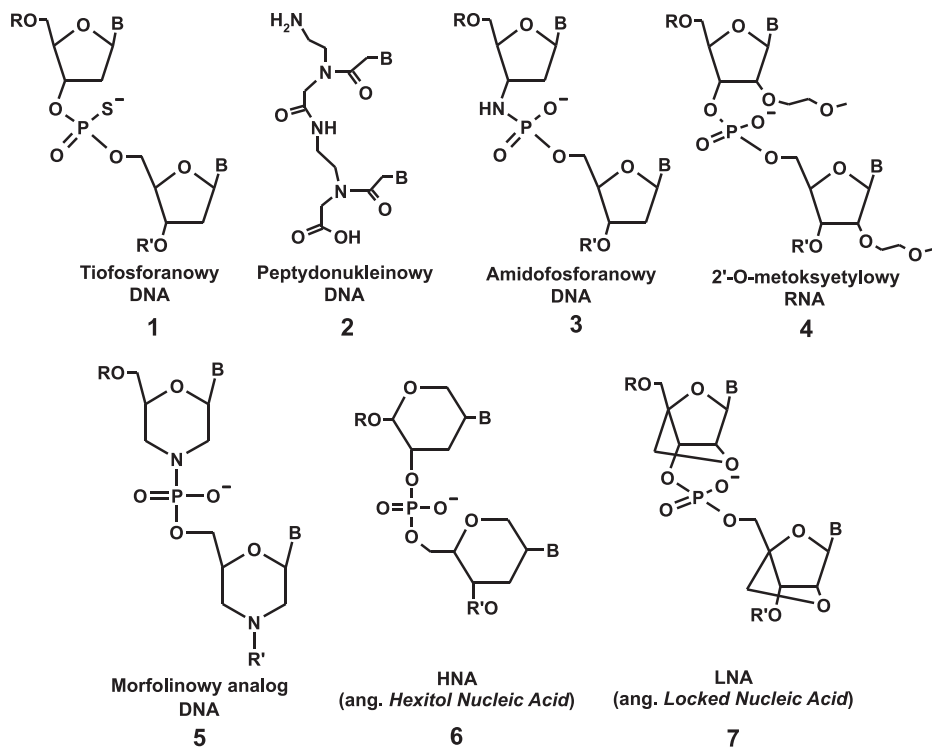
- przenikać przez błony komórkowe tak, aby dotrzeć do wyselekcjonowanej sekwencji docelowej,
- specyficznie i z wysoką wydajnością hybrydować do wybranych sekwencji RNA, aby zminimalizować ewentualne oddziaływania niespecyficzne,
- być odporne na działanie enzymów nukleolitycznych zarówno wewnątrz-, jak i zewnątrzkomórkowych, oraz być trwałe chemicznie w medium komórkowym,
- nie powinny oddziaływać z białkami komórkowymi,
- nie mogą być toksyczne.

Najlepiej poznanymi i najczęściej stosowanymi analogami w badaniach biologicznych i medycznych są analogi tiofosforanowe (Oligo-PS) [4, 15].

Inną grupą analogów o potencjalnych zastosowaniach terapeutycznych i diagnostycznych są oligonukleozydo-(3',5')-metanofosfoniany (Oligo-PMe) [16]. Wprowadzenie niejonowego ugrupowania metanofosfonianowego pozbawionego ładunku elektrycznego zmniejsza ładunek ujemny modyfikowanych oligonukleotydów (co w konsekwencji obniża również rozpuszczalność w mediach komórkowych), zwiększa lipofilowość tych cząstek (poprawia transport do komórki) i zapewnia całkowitą odporność na działanie enzymów nukleolitycznych [17].

Ponieważ niemodyfikowane oligonukleotydy nie spełniają części powyższych warunków, wprowadzane modyfikacje miały na celu m.in. poprawę transportu oligonukleotydów przez błony komórkowe, np. poprzez zmniejszenie całkowitego ładunku elektrostatycznego, a przede wszystkim zwiększenie odporności na działanie endo- i egzozukleaz [18, 19].

Na Rysunku 1 przedstawiono szereg przykładowych modyfikacji szkieletu fosforanowo-cukrowego w kwasach nukleinowych i ich analogach.



Rysunek 1. Wybrane przykłady modyfikacji szkieletu fosforanowo-cukrowego kwasów nukleinowych
 Figure 1. Different modifications of oligonucleotides

Pierwszym i dotychczas jedynym lekiem działającym według mechanizmu anty-sensowego jest tiofosforanowy 19-mer (Vitravene[®]), zatwierdzony w roku 1998 w USA przez Amerykańską Agencję ds. Żywności i Leków (ang. *Food & Drug Administration*, FDA) jako lek przeciw ślepcie wywołanej przez cytomegalowirus (HCMV) u osób zakażonych wirusem HIV [20].

Obecnie w różnych fazach badań klinicznych znajduje się kilkanaście oligonukleotydów I generacji (Oligo-PS) i II generacji (czyli oligonukleotydów dodatkowo modyfikowanych w pozycji 2') [21].

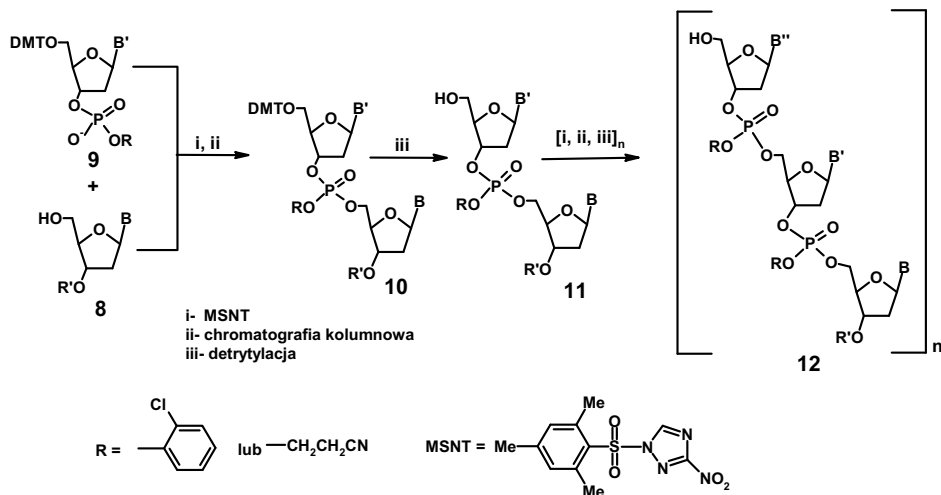
Możliwość różnorodnego zastosowania oligonukleotydów spowodowała dynamiczny rozwój metod syntetycznych analogów kwasów nukleinowych [22].

Czynnikiem decydującym o wyborze metody syntezy jest skala produkcji, długość oligonukleotydu oraz wprowadzone modyfikacje. Ilości związku potrzebne do badań strukturalnych są nieporównywalnie mniejsze w stosunku do ilości potrzebnych do badań klinicznych, stąd też konieczny jest właściwy wybór metod syntezy.

W prezentowanym opracowaniu omówiono aktualny stan wiedzy na temat możliwości i ograniczeń syntezy oligonukleotydów na fazie stałej, syntezy oligonukleotydów w roztworze oraz możliwości łączenia obydwóch metod, jak ma to miejsce w przypadku syntezy oligonukleotydów chimerycznych [23].

1. METODA SYNTEZY OLIGONUKLEOTYDÓW W ROZTWORZE

W początku lat siedemdziesiątych XX w. opracowano *fosfotriestrową metodę syntezy oligonukleotydów* w roztworze [24]. Opiera się ona na reakcji kondensacji 3'-*O*-fosforanu nukleozydu, zawierającego 2-chlorofenylową lub β -cyanoetylową grupę protekcyjną, z 5'-*O*-nukleozydem lub 5'-*O*-oligonukleotydem posiadającym wolną grupę 5'-hydroksylową. Reakcja ta zachodzi w obecności 1-(mezytyleno-2-sulfonylo)-3-nitro-1,2,4-1H-triazolu (MSNT, Rys. 2) jako odczynnika kondensującego.



Rysunek 2. Synteza oligonukleotydów metodą fosfotriestrową w roztworze [24]
 Figure 2. The phosphotriester approach to oligonucleotide synthesis

Deprotekcja grupy 5'-hydroksylowej pozwala na przyłączenie kolejnego nukleotydu. Wszystkie etapy syntezy przeprowadza się w roztworze. Po każdym z nich konieczne jest chromatograficzne oczyszczanie produktu na żelu krzemionkowym.

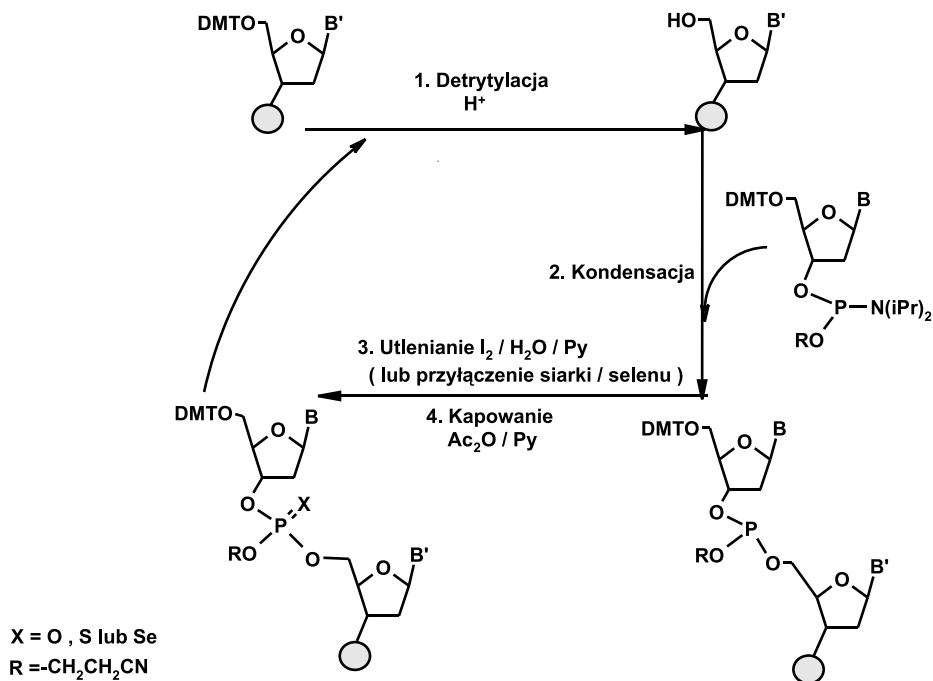
Metodę tę można zaadaptować do syntezy oligonukleotydów na skalę przemysłową. Mimo pracochłonności związanej z oczyszczaniem, jest ona najdogodniejszą metodą do syntezy krótkich oraz średniej długości oligonukleotydów.

2. METODY SYNTEZY OLIGONUKLEOTYDÓW NA FAZIE STAŁEJ

Metody syntezy na fazie stałej zrewolucjonizowały podejście do syntezy biopolimerów, w tym peptydów [7] i oligonukleotydów [22, 25]. W syntezie oligonukleotydów na złożu *metodą amidofosforynową* [25], pierwszy 5'-*O*-DMT-nukleozyd przyłączony jest poprzez grupę 3'-hydroksylową do nierozpuszczalnego złoża za pomocą łącznika, którym najczęściej są kwasy dikarboksyłowe (np. kwas burszty-

nowy). Łącznik pozostaje trwały w czasie wszystkich etapów syntezy i zostaje odcięty od syntetyzowanego oligonukleotydu po zakończeniu syntezy łańcucha [22].

Synteza na fazie stałej jest wieloetapowa. W przypadku metody amidofosforynowej [25], pierwszym etapem jest odblokowanie grupy 5'-hydroksylowej związanego ze złożem nukleozydu za pomocą 2% kwasu dichlorooctowego w CH_2Cl_2 . Następnie przeprowadzona jest reakcja kondensacji z użyciem 5'-*O*-DMT-nukleozydo-3'-*O*-amidofosforynu, aktywowanego za pomocą etylo-*S*-tetrazolu lub 1*H*-tetrazolu [22]. Jako rozpuszczalnik stosuje się głównie acetonitryl (Rys. 3).



Rysunek 3. Synteza oligonukleotydów metodą amidofosforynową na fazie stałej.

W przypadku syntezy n -meru cykl powtarza się $(n-1)$ razy [22]

Figure 3. The phosphoramidite approach to oligonucleotide synthesis.

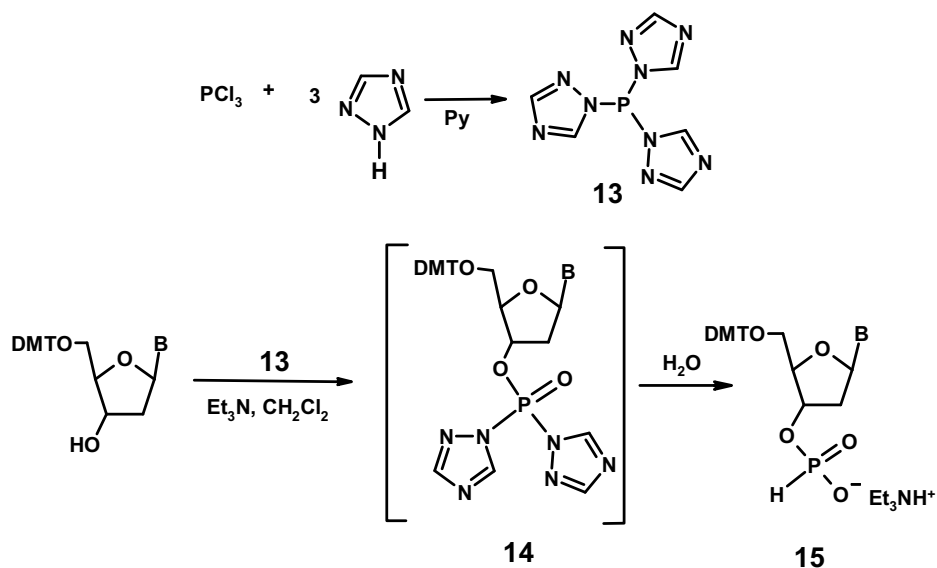
The synthetic cycle is repeated $(n-1)$ times to obtain the n -mer

Reakcja kondensacji przebiega zwykle z wydajnościami powyżej 99,8%, co stanowi warunek powodzenia syntezy. Po każdym etapie kondensacji następuje utlenianie fosforynu do fosforanu, co gwarantuje stabilność produktu w warunkach prowadzenia reakcji. W celu uniemożliwienia kondensacji z grupą 5'-OH nukleotydu, który nie przereagował w tym etapie, blokuje się tę grupę poprzez acylowanie za pomocą roztworu bezwodnika octowego, w obecności 4-dimetyloaminopirydyny (DMAP). Etap ten nazywany jest „kapowaniem”.

Optymalizacja warunków reakcji oraz dobór odpowiednich grup ochronnych doprowadziły do szerokiego wykorzystania tej metody w zautomatyzowanej syntezie oligonukleotydów na fazie stałej zarówno w warunkach laboratoryjnych, jak i w skali przemysłowej.

Standardowe 3'-*O*-amidofosforyny nukleozydów są obecnie dostępne handlowo, a opracowane szczegółowe protokoły mogą być wykorzystane zarówno do syntez standardowych, jak i do syntezy oligonukleotydów modyfikowanych [26].

Alternatywnie stosowaną metodą syntezy oligonukleotydów na złożu jest **metoda H-fosfonianowa** [27]. W metodzie tej jako monomery stosuje się 3'-*O*-H-fosfoniany 5'-*O*-DMT-*N*-blokowanych-nukleozydów, które otrzymać można między innymi w reakcji *tris*(1,2,4-triazolido)fosfiny, generowanej *in situ*, z odpowiednio blokowanym nukleozydem (Rys. 4) lub z wykorzystaniem difenylofosforynu jako odczynnika fosfitylującego [28].

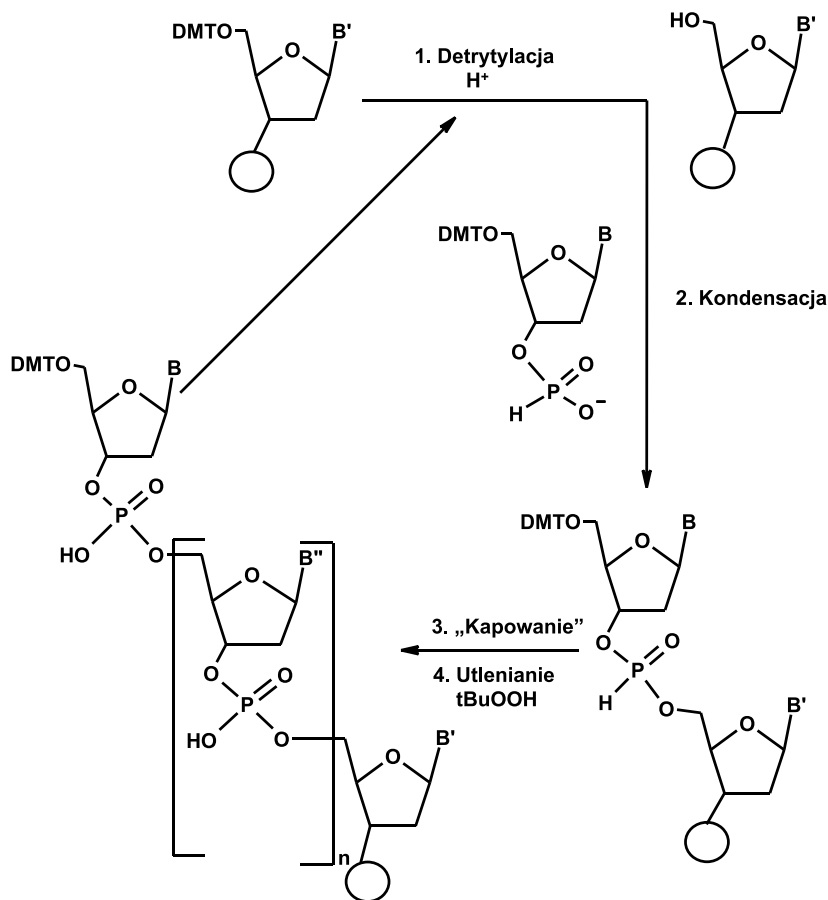


Rysunek 4 Synteza monomerów w metodzie H-fosfonianowej [27]
Figure 4. The synthesis of monomers for H-phosphonates approach

Aktywacja monomeru odbywa się za pomocą chlorków kwasowych o dużej zawadzie sterycznej (np. chlorku piwaloiłu, chlorku adamantoiłu), które w reakcji z monomerem tworzą aktywne mieszane bezwodniki fosfonowo-karboxylowe, ulegające podstawieniu nukleofilowemu wyłącznie na atomie fosforu, ze względu na zawadę przestrzenną przy karbonylowym atomie węgla.

Nieprzereagowane grupy 5'-OH łańcucha oligonukleotydu immobilizowanego na złożu są acylowane (kapowane), podobnie jak w metodzie amidofosforynowej, a z wydłużonego o jednostkę nukleotydomową łańcucha oligonukleotydu usuwana jest grupa dimetokstrytylowa.

W przypadku metody H-fosfonianowej etap utleniania lub przyłączenia siarki (selenu) następuje po zakończeniu reakcji wydłużania łańcucha. Zastosowanie łagodnych odczynników utleniających, takich jak hydroksynadtlenek *tert*-butylu, pozwala na wprowadzanie do łańcucha oligonukleotydu również modyfikacji wrażliwych na utlenianie. Wykazano, że w przypadku wariantów tej metody, nie jest konieczne blokowanie grup egzoaminowych zasad nukleinowych [29, 30] (Rys. 5).



Rysunek 5. Synteza oligonukleotydów metodą H-fosfonianową na fazie stałej [24]

Figure 5. The H-phosphonate approach to the oligonucleotides synthesis

Otrzymany oligonukleotyd odcina się od złoza w warunkach zasadowych (stężony roztwór amoniaku). Jeżeli do syntezy użyto monomerów z zablokowanymi grupami egzoaminowymi, na tym etapie następuje równoczesne odblokowanie grup zasadolabilnych [22].

Synteza oligonukleotydów na fazie stałej eliminuje konieczność izolowania i oczyszczenia produktu metodami chromatograficznymi po każdym etapie wydłu-

zenia łańcucha. Pozwala na automatyzację procesu, który wymaga bardzo wysokich wydajności wszystkich etapów oraz krótkich czasów reakcji. Aby spełnić ten wymóg, w reakcji kondensacji stosowane są duże nadmiary monomerów i aktywatorów, a kluczowe dla wysokiej wydajności jest zachowanie warunków bezwodnych.

3. PORÓWNANIE METOD SYNTEZY OLIGONUKLEOTYDÓW

Tabela 1. Porównanie metod wykorzystywanych w syntezie kwasów nukleinowych
Table 1. Comparison methods used in synthesis of nucleic acids

w roztworze	na fazie stałej
<ul style="list-style-type: none"> • stosowana głównie do syntezy krótkich oligonukleotydów oraz oligonukleotydów modyfikowanych • przydatna do syntezy w dużej skali • zdecydowanie pracochłonna; po zakończeniu każdego etapu produkt należy oczyścić metodami chromatograficznymi na żelach krzemionkowych • długi czas syntezy • trudna do automatyzacji • pozwala na zastosowanie prawie stechiometrycznego stosunku reagentów • klasyczne oznaczenie wydajności każdego etapu syntezy 	<ul style="list-style-type: none"> • stosowana do syntezy długich łańcuchów oligonukleotydów, głównie do badań biologicznych • używana do otrzymywania niewielkich ilości oligonukleotydu (skala od nano- do milimoli, w warunkach laboratoryjnych) • mało pracochłonna; oparta na łatwym oddzieleniu produktu od pozostałych reagentów poprzez przemycie złoża rozpuszczalnikiem • krótki czas poszczególnych etapów syntezy • pozwala na wprowadzenie automatyzacji • stwarza wymóg prawie ilościowego przereagowania na wszystkich etapach, co osiąga się za pomocą stosowania dużego nadmiaru reagentów • ocena wydajności każdego cyklu reakcji za pomocą spektroskopii w świetle widzialnym (esej trytylowy)

Dynamiczny rozwój metod syntezy kwasów nukleinowych pozwala na precyzyjne wykorzystanie różnych strategii, w zależności od sekwencji i modyfikacji syntetyzowanego oligonukleotydu.

4. MODYFIKOWANE OLIGONUKLEOTYDY

W zależności od tego, jaki oligonukleotyd planuje się otrzymać, dobiera się najefektywniejszą metodę syntezy biorąc pod uwagę:

- długość syntetyzowanego oligonukleotydu;
- ilość modyfikacji wprowadzonych do oligonukleotydu;
- położenie modyfikacji w łańcuchu;

- typ modyfikacji (wiązanie internukleotydowe, modyfikowana zasada, post-syntetyczne modyfikacje oligomeru, np. wprowadzenie ligandów fluorescencyjnych).

Modyfikacje oligonukleotydów mogą polegać m.in. na wprowadzeniu nietypowej zasady heterocyklicznej w jednym lub kilku miejscach łańcucha, na wprowadzeniu modyfikacji do pierścienia cukrowego np. grupy aminowej w pozycji 3' lub modyfikacji wiązania internukleotydowego.

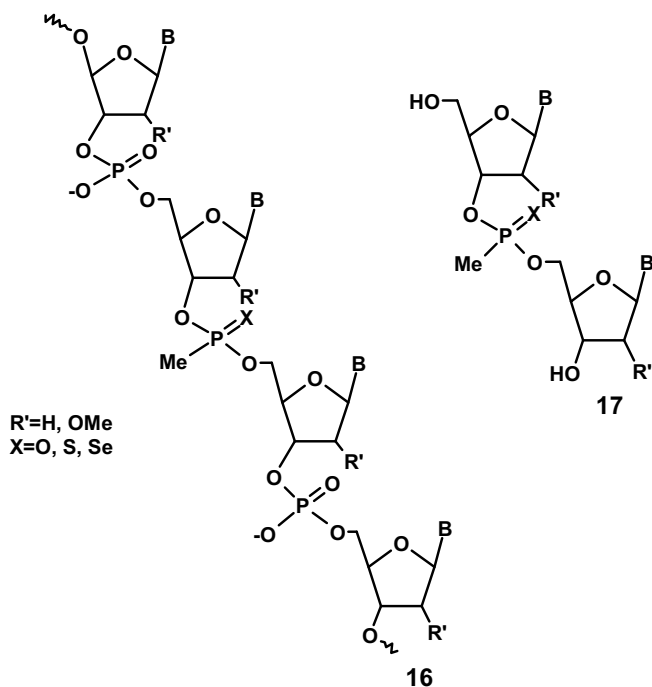
W przypadku modyfikacji zasady heterocyklicznej czy reszty cukrowej, najczęściej przygotowuje się odpowiednio zmodyfikowane monomery i wykorzystuje się je w standardowej metodzie np. amidofosforynowej. W takim przypadku należy wziąć pod uwagę trwałość modyfikowanego monomeru w warunkach syntezy oraz trwałość modyfikacji w warunkach reakcji i pod tym kątem dobierać warunki prowadzenia syntezy lub zastosować odpowiednio dobrane grupy ochronne tak, aby po zakończeniu całej syntezy można je było usunąć bez szkody dla otrzymanego oligonukleotydu.

5. METODA SYNTEZY BLOKOWEJ OLIGONUKLEOTYDÓW CHIMERYCZNYCH

Od lat dziewięćdziesiątych XX w. obserwuje się wzrost zainteresowania chimerycznymi oligonukleotydami. Oligonukleotydy chimeryczne mogą zawierać wbudowane w określonej pozycji dinukleotydy modyfikowane, np. na centrum fosforowym, zawierające różne modyfikacje wiązania internukleotydowego. Stanowią one dogodne narzędzia w biologii molekularnej i strukturalnej [31–34] (Rys. 6).

W przypadku modyfikacji wiązania internukleotydowego pojawia się zasadniczy problem, związany z włączeniem modyfikowanego dinukleotydu do oligonukleotydu, z utworzeniem *P*-chiralnego, modyfikowanego wiązania internukleotydowego.

Jeżeli w syntetyzowanym w sposób niestereospecyficzny oligonukleotydzie znajduje się n modyfikowanych wiązań internukleotydowych, w którym każdy z atomów fosforu będzie stanowił centrum chiralności, to może on wystąpić w skrajnym przypadku w postaci mieszaniny 2^n diastereomerów, które różnią się właściwościami fizykochemicznymi [35]. Stosowane podejścia w syntezie chemicznej stereozdefiniowanych oligonukleotydów o znanej konfiguracji na atomie fosforu wymagają użycia diastereomerycznie czystych substratów, o określonej konfiguracji na każdym centrum chiralnym, a reakcje kondensacji muszą być stereospecyficzne.



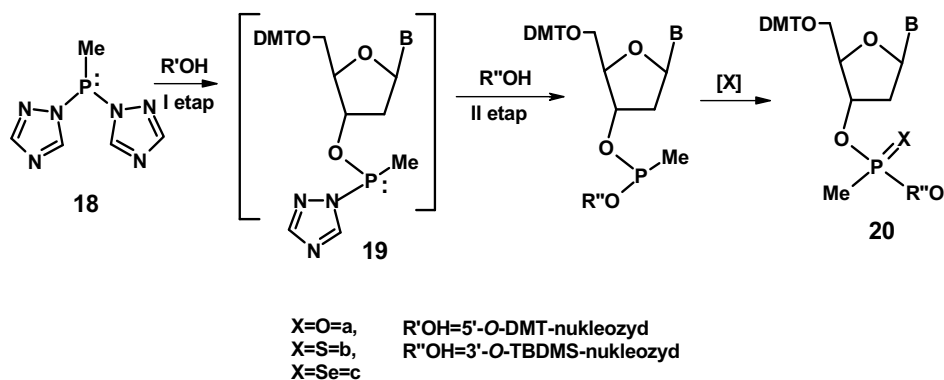
Rysunek 6. Modyfikacja metanofosfonianowa wbudowana w łańcuch chimerycznego oligonukleotydu
 Figure. 6. The methanephosphonate modification incorporated in to oligonucleotide

Jedną z alternatywnych metod syntezy chimerycznych oligonukleotydów o zdefiniowanej konfiguracji na atomie fosforu jest synteza blokowa [23]. Jej podstawą jest synteza dimerów (dinukleotydów), zawierających modyfikowane wiązania internukleotydowe, lub relatywnie krótkich oligonukleotydów w roztworze, a następnie wykorzystanie ich jako reagentów do syntezy dłuższego oligonukleotydu, przy czym *dimeryczne bloki syntetyczne* (ang. *dimeric building blocks*) traktowane są tak jak inne monomery w zautomatyzowanej syntezie na stałym nośniku.

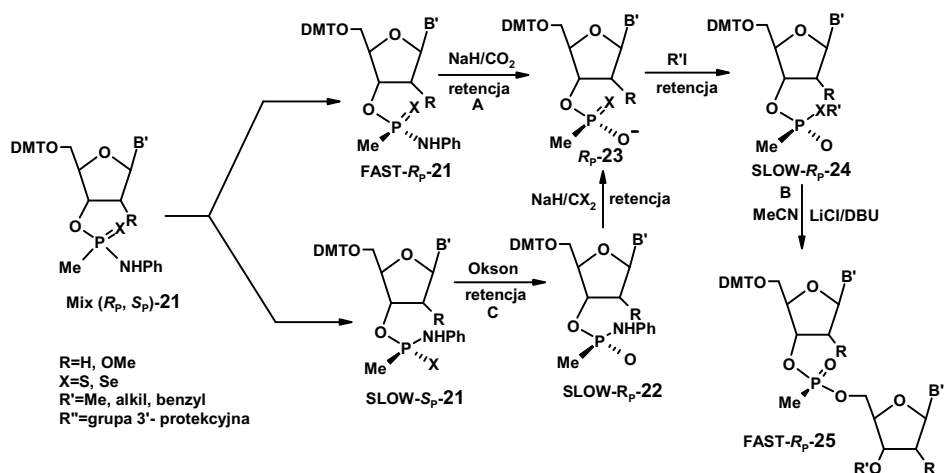
Dimeryczne bloki syntetyczne, można otrzymać stosując niestereospecyficzne reakcje kondensacji dające w efekcie obydwa *P*-diastereoizomery, a następnie rozdzielić je metodami chromatograficznymi, jak w metodzie triazolidowej [36] (Rys. 7).

Można również posłużyć się metodą stereospecyficznej kondensacji prowadzącej do otrzymania pożądanego *P*-diastereoizomeru [23, 37]. Obydwie te metody można jednak stosować do relatywnie krótkich oligonukleotydów.

Stec *et al.* zaproponowali metodę pozwalającą na otrzymanie stereozdefiniowanych Oligo-PMe [37]. Wykorzystali oni rozdzielone na diastereomery, zablokowane 3'-*O*-anilidotio (seleno)metanofosfoniany nukleozydowe (**21**) (Rys. 8).



Rysunek 7. Synteza dinukleozydo (3',5')-metanotio(seleno)fosfonianów metodą triazolidową [34]
 Figure 7. The synthesis of dinucleoside (3',5')-methanethio(seleno)phosphonate *via* triazolidine approach



Rysunek 8 Stereokontrolowana i stereokonwergencyjna synteza R_p -dinukleozydo (3',5')-metanofosfonianów 25 [35]
 Figure 8. Stereocontrolled and stereoconvergent synthesis of R_p -dinucleoside (3',5')-methanophosphonate 25 [35]

W metodzie tej izomer FAST- R_p -21 przeprowadza się na drodze stereospecyficznej reakcji Steca ($PN \rightarrow PO$) [38] w odpowiedni diastereomerycznie czysty 3'-*O*-metanotio(seleno)fosfonian nukleozydowy (R_p -23) (Rys. 8A), który jest alkilowany za pomocą MeI w sposób chemoselektywny (reakcja zachodzi wyłącznie na atomie siarki lub selenu), dając odpowiedni 3'-*O*-(*S*-metylo) metanotiofosfonian nukleozydowy (lub jego analog selenowy) SLOW- R_p -24, który wykorzystywany jest jako monomer do syntezy (3',5')-metanofosfonianu dinukleozydowego FAST- R_p -25 (Rys. 8B).

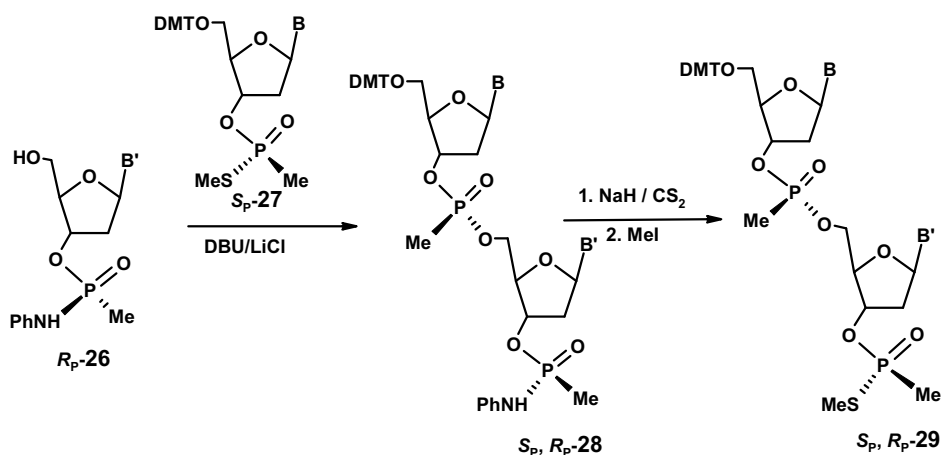
Drugi izomer, 3'-*O*-anilidotio(seleno)metanofosfonian nukleozydowy SLOW- S_p -**21**, utleniany jest w sposób stereospecyficzny, z retencją konfiguracji na atomie fosforu, za pomocą Oksonu [39] (Rys. 8C). Otrzymany w ten sposób 3'-*O*-anilidometanofosfonian nukleozydowy SLOW- R_p -**22** poddawany jest następnie reakcji Steca ($PN \rightarrow PS$, jako odczynnik elektrofilowy wykorzystuje się CS_2) i otrzymuje się odpowiedni 3'-*O*-metanotiofosfonian nukleozydowy R_p -**23**, który po alkiłowaniu za pomocą MeI, tworzy monomer SLOW- R_p -**24**. Autorzy wykazali, że opisaną powyżej procedurę można stosować zarówno do syntezy 2'-deoksynukleotydów, jak i 2'-OMe-rybonukleotydów [37].

Metoda „anilidowa” pozwala na „bezoypadową” syntezę diastereomerycznie czystych (3',5')-metanofosfonianów dinukleozydowych o konfiguracji R_p lub S_p , z wykorzystaniem w każdym przypadku obydwóch rozdzielonych na diastereomery prekursorów anilidowych **21**, co ma istotne znaczenie w przypadku syntezy na dużą skalę [37].

Autorzy pokazali również wariant omawianej metody, w którym diastereomerycznie czysty 3'-*O*-anilidometanofosfonian **21** wykorzystywany był jako prekursor do zawiązania wiązania internukleotydu (Rys. 8) [23]. Jednocześnie grupa 3'-*O*-anilidometanofosfonianowa stanowiła grupę protekcyjną.

Dzięki użyciu silnej zasady organicznej (DBU) oraz dodatku chlorku litu jako aktywatora, w reakcji substytucji nukleofilowej następuje zawiązanie metanofosfonianowego wiązania internukleotydu. W podanych warunkach nie zachodzą reakcje konkurencyjne, w których uczestniczyłaby grupa anilidowa, co potwierdzono metodami NMR [2]. Grupa 3'-*O*-anilidometanofosfonianowa może być przekształcona w sposób chemoselektywny i stereospecyficzny ($PN \rightarrow PS$) w odpowiednią grupę kwasową, którą następnie poddaje się reakcji *S*-alkiłowania, otrzymując w ten sposób substrat do dalszych reakcji wydłużania łańcucha oligonukleotydu.

Wykazano również możliwość syntezy krótszych oligonukleotydów, posiadających wyłącznie modyfikowane wiązania internukleotydu z pożądaną konfiguracją na każdym chiralnym atomie fosforu. Syntetyzuje się wówczas w roztworze dinukleotyd z modyfikowanym wiązaniem internukleotydu, np. (3',5')-metanofosfonian dinukleozydowy, a następnie łączy się go, również w roztworze, z odpowiednim monomerem tak, by powstał trinukleotyd [23]. Metodą tą można również kondensować blokowo ze sobą dwa (3',5')-metanofosfoniany dinukleozydowe, otrzymując w ten sposób tetranukleotyd, który może służyć jako substrat do dalszych reakcji wydłużania łańcucha oligonukleotydu. Taką metodą został zsyntetyzowany (3',5')-metanofosfonian pentanukleozydowy (Rys. 9) [23].



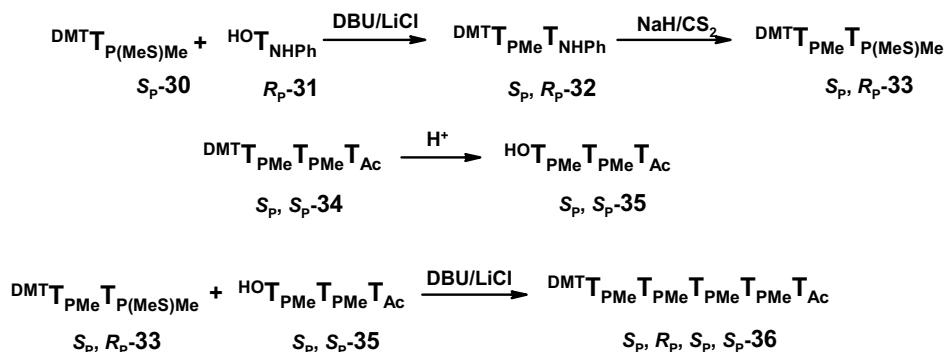
Rysunek 9. Synteza modyfikowanego dinukleotydu o ustalonej konfiguracji na chiralnym atomie fosforu [23]
 Figure. 9. The synthesis of modified dinucleotide with a defined configuration at the chiral phosphorus atom [23]

Dogodnymi substratami do syntezy *dimerycznych bloków syntetycznych*, aczkolwiek rzadko stosowanymi, są $(3',5')$ -H-fosfoniany dinukleozydowe o zdefiniowanej konfiguracji na atomie fosforu. Wykazano, że diastereomery $(3',5')$ -H-fosfonianów dinukleozydowych uzyskane na drodze niestereospecyficznej syntezy metodą H-fosfonianową [40], można rozdzielić i ze względu na ich stosunkowo wysoką reaktywność, wykorzystać do syntezy innych analogów, w tym tiofosforanów, selenofosforanów, metanofosforanów i sfunkcjonalizowanych fosfonianów [41].

Prowadząc reakcję analogicznie jak w metodzie H-fosfonianowej na fazie stałej [42], z użyciem jonowych -H-fosfonianów nukleozydowych jako monomerów, i stosując jako aktywatory chlorki kwasowe (chlorek adamantoilu, chlorek piwaloilu), otrzymuje się odpowiednie $(3',5')$ -H-fosfoniany dinukleozydowe, które w reakcji utleniania lub przyłączenia siarki lub selenu, przeprowadza się w odpowiednie fosforany oraz tiofosforany i selenofosforany [43].

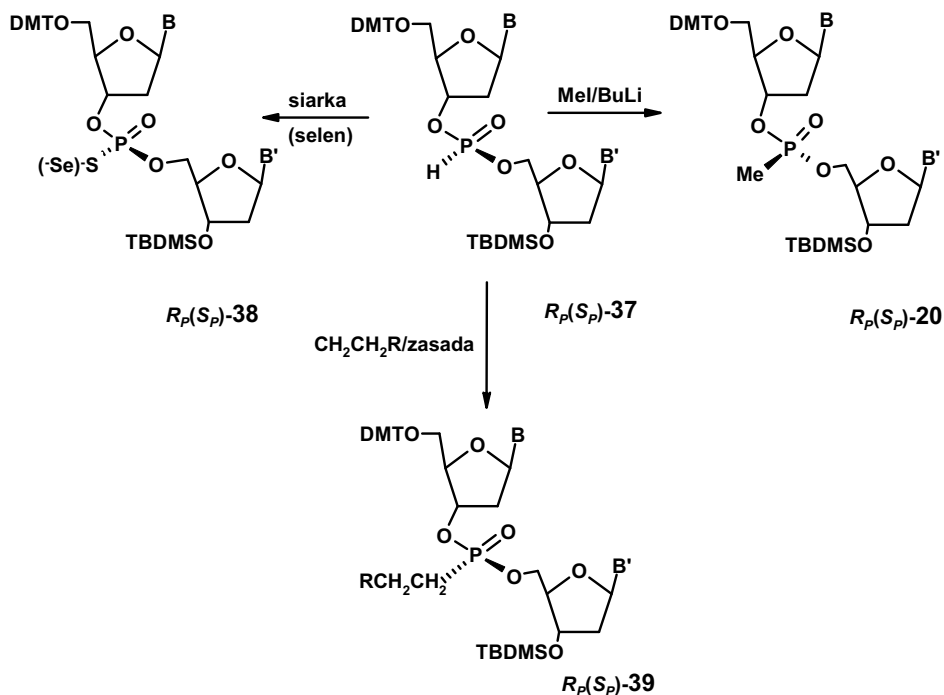
Wykazano, że z rozdzielonych na diastereomery $(3',5')$ -H-fosfonianów dinukleozydowych **37** można otrzymać odpowiednie $(3',5')$ -metanofosfoniany dinukleozydowe **20** w sposób stereospecyficzny [40]. W reakcji alkilowania R_p -($3',5'$)-H-fosfonianu dinukleozydu **37** za pomocą MeI , w obecności butylolitu, otrzymuje się R_p -($3',5'$)-metanofosfonian dinukleozydu **20**, co oznacza, że proces ten przebiega z retencją konfiguracji na atomie fosforu (Rys. 10).

Reakcja przyłączenia siarki i selenu do diastereomerycznie czystych dinukleotydu **37** prowadzi do diastereomerycznie czystych, odpowiednio – tio- i selenofosforanów **38**, i również przebiega z retencją konfiguracji na atomie fosforu [40] (Rys. 11).



Rysunek 10. Syntezy pentanukleozydo (3',5')-metanofosfonianu metodą anilidową [23]

Figure 10. The synthesis of pentanucleoside (3',5')-methanephosphonate [23]

Rysunek 11. Wykorzystanie diastereomerycznie czystych dinukleozydo-(3',5')-H-fosfonianów **37** jako substratów do syntezy diastereomerycznie czystych metanofosfonianów **20** i tiofosforanów **38** [38] oraz funkcjonalizowanych alkilofosfonianów **39** [42]Figure 11. The use of dinucleoside (3',5')-H-phosphonates **37** as universal precursors for the synthesis of diastereomerically pure methanephosphonates **20** and thiophosphonates **38** [38] and alkylphosphonates **39** [42]

Ostatnio, rozdzielone na diastereomery (3',5')-H-fosfoniany dinukleozydowe **37** zastosowano także jako substraty do tworzenia wiązania P-C w reakcji addycji do podwójnego wiązania [44]. Jako związki nienasycone, do badań wyselekcjonowano akrylonitryl i akryloamid, biorąc pod uwagę możliwość dalszego funkcyjowania uzyskanych fosfonianów w oparciu o ligandy propanonitrylowy i propionamidowy w produkcie **39**.

Uzyskane w powyższych reakcjach addycji (3',5')-alkilofosfoniany dinukleozydowe **39** można wykorzystać, po 3'-fosfitylacji, jako 3'-*O*-amidofosforyny, do syntezy oligonukleotydów na fazie stałej, wprowadzając do łańcucha syntetyzowanego określony dinukleotyd w standardowej procedurze amidofosforynowej. W ten sposób uzyskuje się możliwość syntezy oligonukleotydów chimerycznych, posiadających niemodyfikowane oraz modyfikowane wiązania internukleotydydowe zarówno na nośniku stałym, jak i w roztworze.

PODSUMOWANIE

Metoda blokowa jest bardzo dogodnym rozszerzeniem standardowych metod syntezy oligonukleotydów. Istotnym etapem jest synteza odpowiedniego *dimerycznego bloku syntetycznego*, wykorzystywanego jako monomer w syntezie na fazie stałej chimerycznego oligonukleotydu. Wykorzystanie *dimerycznego bloku syntetycznego* zarówno w syntezie na fazie stałej, jak również w roztworze, pozwala na otrzymanie dłuższych łańcuchów oligonukleotydów chimerycznych zawierających jedną lub więcej modyfikacji, także występujących na sąsiadujących wiązaniach internukleotydydowych.

Dostępność wielu metod syntezy oligonukleotydów umożliwia wytworzenie dowolnego fragmentu kwasu nukleinowego zarówno występującego naturalnie, jak i nie mającego swojego odpowiednika w przyrodzie, przy czym otrzymywane ilości wystarczają nie tylko do badań laboratoryjnych, ale i do zastosowań praktycznych.

PODZIĘKOWANIE

Praca wykonana w ramach prac finansowanych z badań własnych UM nr 502 17 961.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] J.M. Berg, L. Stryer, J.L. Tymoczko, *Biochemia*, PWN, 2007, Wyd. 3 zmienione, Warszawa.
- [2] R. Kolodner, *Genes Dev.*, 1996, **10**, 1433.
- [3] L.K. Lee, C.M. Roth, *Curr. Opin. Biotech.*, 2003, **14**, 505.
- [4] D.G. Gorenstein, *Chem. Rev.*, 1994, **94**, 1315.
- [5] W.A.W. Lebedev, E. Wickstrom, *Persp. Drug Disc. Des.*, 1996, **4**, 17.

- [6] A.V. Lebedev, A. Frauendodorf, E.V. Vyazovkina, J.W. Engels, *Tetrahedron*, 1993, **49**, 1043.
- [4] K.V. Thivyanathan *et al.*, *Biochemistry*, 2002, **41**, 827.
- [5] S. Olejniczak, M. Potrzebowski, L.A. Woźniak, *Eur. J. Org. Chem.*, 2004, 1958.
- [6] J.H.P. Chan, S. Lim, W.S.F. Wong, *Clin. Exper. Pharm. Phys.*, 2006, **33**, 533.
- [7] R.G. Blasberg, J.G. Tjuvajev, *J. Clin. Invest.*, 2003, **111**, 1620.
- [8] B. Wilcken, V. Wiley, *Pathology*, 2008, **40**, 104.
- [9] P.S. Miller *Oligonucleoside methylphosphonate: Synthesis and Properties*, [w:] C.A. Stein, A.M. Krieg (eds), John Wiley & Sons, Inc, New York 1998.
- [10] W.J. Stec *Biotechnologia*, 1994, **4**, 5.
- [11] B. Larrouy, C. Błoński, C. Boiziau, M. Stuer, S. Moreau, D. Shire, J.J. Toulme *Gene*, 1992, **121**, 189.
- [12] T.P. Chendrimada, *et al. Nature*, 2007, **447**, 823.
- [13] T.I. Novobrantseva, A. Akinc, A. Borodovsky, A. de Fougerolles, *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.*, 2008, **11**, 217.
- [14] R.K. Leung, P.A. Whittaker, *Pharmacol. Ther.*, 2005, **107**, 222.
- [15] N. Purdie, H.G. Brittain *Analytical Applications of Circular Dichroism*, Elsevier, Amsterdam 1994.
- [16] W.A.W. Lebedev, E. Wickstrom, *Persp. Drug Disc. Des.*, 1996, **4**, 17.
- [17] S. Agrawal, Q. Zhao, *Antisense & Nucleic Acid Drug Dev.*, 1998, **8**, 135.
- [18] C.A. Stein, J.S. Cohen, *Cancer Res.*, 1988, **48**, 2659.
- [19] M. Petersen, J. Wengel, *Trends Biotech.*, 2003, **21**, 74.
- [20] R.R. Deshmukh, *et al.*, *Org. Proc. Res. Dev.*, 2000, **4**, 205.
- [21] J.H.P. Chan, S. Lim, W.S.F. Wong, *Clin. Exper. Pharm. Phys.*, 2006, **33**, 533.
- [22] *Methods in Molecular Biology*, Vol. 26: *Protocols for Oligonucleotide Conjugates*, ed. S. Agrawal Copyright© 1994 Humana Press Inc., Totowa, NJ.
- [23] J. Pyzowski, L.A. Wozniak, W.J. Stec, *Org. Lett.*, 2000, **2**, 771.
- [24] C.B. Reese, *Org. Biomol. Chem.*, 2005, **3**, 3851.
- [25] M.H. Caruthers, *Science*, 1985, **230**, 281.
- [26] J. Ott, F. Eckstein, *Nucl. Acids Res.*, 1984, **12**, 9137.
- [27] P.J. Garegg, I. Lindh, T. Regberg, J. Stawiński, R. Stromberg, C. Henrichson, *Tetrahedron Lett.*, 1986, **27**, 4051.
- [28] J. Stawinski, A. Kraszewski, *Acta Biochimica Polonica*, 1998, **45**, 907.
- [29] T. Wada, Y. Sato, F. Honda, S. Kawahara, M. Sekine, *J. Am. Chem. Soc.*, 1997, **119**, 12710.
- [30] P.P. Kung, R.A. Jones, *Tetrahedron Lett.*, 1992, **33**, 5869.
- [31] K.M. Kosikov, A.A. Gorin, X.-J. Lu, W.K. Olson, G.S. Manning, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, **124**, 4838.
- [32] C.G. Baumann, S.B. Smith, V.A. Bloomfield, C. Bustamante, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, **94**, 6185.
- [33] C.B. Reese, K.H. Richards, *Tetrahedron Lett.*, 1985, **26**, 2245.
- [34] M.A. Reynolds, *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 1996, **24**, 4584.
- [35] M. Bukowiecka-Matusiak, L.A. Woźniak, *Na pograniczu chemii i biologii*, 2006, **15**, 55.
- [36] L.A. Wozniak, M. Bukowiecka-Matusiak, M. Góra, W.J. Stec, *Synlett*, 2006, 1331.
- [37] W.J. Stec, L.A. Wozniak, J. Pyzowski, W. Niewiarowski, *Antisense & Nucleic Acid Drug Dev.*, 1997, **7**, 381.
- [38] W.J. Stec *Acc. Chem. Res.*, 1983, **16**, 411.
- [39] L.A. Wozniak, W.J. Stec, *Tetrahedron Lett.*, 1999, **40**, 2637.
- [40] F. Seela, U. Kretschmer, *J. Org. Chem.*, 1991, **56**, 3861.
- [41] M. Sobkowski, J. Jankowska, A. Kraszewski, J. Stawinski, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 2005, **24**, 1469.

- [42] K.J. Padiya, M.M. Salunkhe, *Bioorg. Med. Chem.*, 2002, **8**, 337.
- [43] M. Bollmark *Doctoral Dissertation* 2001, Department of Organic Chemistry, Arhenius Laboratory, Stockholm University.
- [44] L.A. Wozniak, M. Bukowiecka-Matusiak, I. Burzyńska-Pędziwiatr, W.J. Stec, *Tetrahedron Lett.*, w druku.

Praca wpłynęła do Redakcji 15 grudnia 2008

INSULINONAŚLADOWCZE I PRZECIWCUKRZYCOWE WŁAŚCIWOŚCI ZWIĄZKÓW WANADU

INSULIN-MIMETIC AND ANTI-DIABETIC PROPERTIES OF VANADIUM COMPOUNDS

Bogumiła Kupcewicz^{1,2}, Elżbieta Budzisz^{1,3}

¹ *Katedra i Zakład Chemii Nieorganicznej i Analitycznej,
Wydział Farmaceutyczny Collegium Medicum w Bydgoszczy, UMK w Toruniu
ul. Skłodowskiej Curie 9, 85-094 Bydgoszcz*

² *Zakład Biochemii Środowiska, Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt,
Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy w Bydgoszczy
ul. Mazowiecka 28, 85-084 Bydgoszcz,*

³ *Zakład Chemii Surowców Kosmetycznych, Wydział Farmaceutyczny
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
ul. Muszyńskiego 1, 90-151 Łódź*

Abstract

Wykaz stosowanych skrótów

Wstęp

1. Mechanizm działania wanadu
2. Nieorganiczne związki wanadu
3. Związki kompleksowe wanadu(IV) i wanadu(V) o właściwościach przeciwcukrzycowych; 3.1. Kompleksy z maltosem i jego pochodnymi; 3.2. Pikoliniany; 3.3. β -diketony; 3.4. Kompleksy z flawonoidami; 3.5. Pochodne SALEN-U (salicylidenoiminy); 3.6. Kompleksy z ligandami zawierającymi siarkę; 3.7. Porfiryne kompleksy wanadu; 3.8. Kompleksy z innymi ligandami; 3.9. Związki hipoglikemizujące jako ligandy
4. Nowe formy podania leku (ang. *drug delivery system*)
5. Toksyczność wanadu
6. Sposoby testowania związków wanadu

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane

Dr n. farm. Bogumiła Kupcewicz jest absolwentką Wydziału Mat.-Fiz.-Chem. Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu. Po skończeniu studiów rozpoczęła pracę w Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego w Bydgoszczy, a aktualnie pracuje w Katedrze Chemii Nieorganicznej i Analitycznej CM UMK oraz na Wydziale Hodowli i Biologii Zwierząt UTP w Bydgoszczy. Pracę doktorską obroniła w 2000 r. na Wydziale Farmaceutycznym Akademii Medycznej w Poznaniu. Zajmuje się analizą m.in. mykotoksyn oraz izoflawonów metodami chromatograficznymi oraz wyznaczaniem stałych protonowania ligandów – pochodnych chromonu i stałych kompleksowania kompleksów metali z tymi ligandami.

Dr hab. n. farm. Elżbieta Budzisz studiowała na Wydziale Mat.-Fiz.-Chem. Uniwersytetu Łódzkiego. Po skończeniu studiów podjęła pracę w Instytucie Podstawowych Nauk Chemicznych na Wydziale Farmaceutycznym w Łodzi w zespole prof. dr hab. Krzysztofa Kostki. W 1991 roku obroniła pracę doktorską, a w 2004 roku uzyskała stopień naukowy doktora habilitowanego nauk farmaceutycznych. Od 1 października 2005 roku jest kierownikiem Zakładu Chemii Surowców Kosmetycznych Katedry Kosmetologii na Wydziale Farmaceutycznym w Łodzi oraz kierownikiem Katedry i Zakładu Chemii Nieorganicznej i Analitycznej Collegium Medicum Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Bydgoszczy. Jest współautorką kilkunastu prac dotyczących syntezy i aktywności przeciwnowotworowej pochodnych chromonu, flawonu i kumaryny oraz ich kompleksów z wybranymi metalami. Obecnie zajmuje się syntezą kompleksów metali z pochodnymi chromonu o aktywności przeciwutleniającej.

ABSTRACT

Vanadium is a trace element, which may be beneficial for human and developed as clinically useful metallopharmaceutical. Over the last 20 years a wide range of medicinal aspects of various compounds of vanadium have been investigated and documented [10–21]. Vanadium displays relevant biological actions such as insulin-mimicking or spermicidal [5–7] as well as it shows antitumor activity [3, 4]. This review has focused on vanadium inorganic compounds and organic complexes which have insulin-mimetic and anti-diabetic properties. Vanadium-based therapeutic agents belong to the class of compounds in which active is the metal ion and the ligand plays only an ancillary role – delivers active metal to target tissues what may have important implications for the bioavailability and pharmacokinetic properties of vanadium.

Vanadium salts such as oxovanadium(IV) sulphate (vanadyl sulphate) VOSO_4 or sodium orthovanadate(V) NaVO_3 and some vanadium organic complexes are potent insulin-mimetic compounds for treating both type I and type II in animal model, cell culture systems and human diabetes. Many studies have demonstrated that the oral administration of vanadium compounds normalizes blood glucose levels, stimulates glucose intake into cells and causes inhibition of glikoneogenesis and lypolysis. Vanadyl sulphate and other simple salts are effective but unfortunately have poor uptake through gastrointestinal system and have some toxic effects. Complexation with organic ligands may improve vanadium efficacy and decrease toxic side effects. Since 1990 several vanadium compounds (vanadyl, vanadate and peroxovanadate) with organic ligands have been proposed for this purpose. This review describes vanadyl complexes with ligand such as maltol and its derivatives, picolinate ion, flavonoids, sulphur containing compounds and hypoglycemic drugs (metformine and thiazolidenodiones). In recent years some VO(IV) complexes with maltol – bis(maltolato)oxovanadium (BMOV) and ethylmaltol (BEOV) have been proposed for clinical use in humans. BEOV has in 2000 completed I-st phase of human clinical trials. To asses the insulinomimetic and anti-diabetic activities of vanadium(IV) complexes several in vitro- and in vivo systems have been performed. Hypoglycemic and glucose normalizing activity were investigated in vivo in both type I and II diabetic animal (mice and rats) models. In vitro insulinomimetic activity was examined in isolated rat adipocytes.

Alternatively for improving bioavailability and anti-diabetic efficacy of vanadium several novel drug delivery systems such as chitosan-hydrogel or enteric-coated capluses containing vanadium [55, 56, 60] compounds have been tested.

Keywords: vanadium compounds, diabetes

Słowa kluczowe: związki wanadu, cukrzyca

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

acac	– acetyloacetonian
AUC	– pole powierzchni pod krzywą
BCM-EPR	– monitoring krwioobiegu metodą paramagnetycznego rezonansu elektronowego
BEOV	– bis(etylomaltolo)oksowanad(IV)
BMOV	– bis(maltolo)oksowanad(IV)
CIR	– klirens nerkowy
cym	– metylcysteina
EPR	– paramagnetyczny rezonans elektronowy
ERK1/2	– kinazy regulujące pozakomórkowe przekazywanie sygnału
Hddp	– 1,2-dimetylo-3-hydroksy-4-pirydynon
Hema	– etylomaltol (3-hydroksy-2-etylo-4H-piran-4-on)
Hkoj	– kwas kojowy
Hma	– maltol (3-hydroksy-2-metylo-4H-piran-4-on)
ICP-MS	– spektrometria mas ze wzbudzeniem w plazmie indukcyjnie sprzężonej
mal	– malonian
MAPKs	– kinazy białkowe aktywowane przez mitogeny
metf	– metformina
MTT	– bromek 3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2,5-difenylo-tetrazolowy
NAA	– metoda aktywacji neutronowej
ox	– szczawiany
phen	– fenantrolina
PI3-K	– 3-kinaza fosfatydyloinozytolu
pic	– pikolinian
PTP	– białkowa fosfataza tyrozynowa
sal	– aldehyd salicylowy
STZ	– streptozotocyna
$t_{1/2}$	– biologiczny okres półtrwania
tart	– winian
T_{max}	– maksymalne stężenie we krwi

WSTĘP

Wanad (liczba at. 23, konfiguracja elektronowa $[\text{Ar}]3d^34s^2$) jest metalem przejściowym, występującym na różnych stopniach utlenienia, od -1 do $+5$. W organizmach żywych, w warunkach fizjologicznych, przeważają dwa stopnie utlenienia: $+4$ i $+5$. Na $+4$ stopniu utlenienia wanad występuje w formie jonu wanadylowego VO_2^{2+} , natomiast na $+5$ stopniu utlenienia wanad tworzy wanadany: HVO_4^{2-} , VO_3^- , VO_4^{3-} , H_2VO_4^- [1]. Oprócz wymienionych monomerów, wanadany tworzą dimery (szczególnie $\text{H}_2\text{V}_2\text{O}_7^{2-}$), tetramery ($\text{V}_4\text{O}_{12}^{4-}$), pentamery ($\text{V}_5\text{O}_{15}^{5-}$) oraz dekamery ($\text{V}_{10}\text{O}_{28}^{6-}$), których wzajemny stosunek zależy głównie od pH środowiska wewnątrzkomórkowego [2].

Związki koordynacyjne wanadu, które mogą mieć potencjalne właściwości farmakologiczne, zawierają w cząsteczce wanadany $[\text{V}^{\text{VO}}\text{L}_x]_n$, oksowanady (wanadye) $[\text{V}^{\text{IV}}\text{OL}_z]_n$, a także peroksowanadany $[\text{V}^{\text{VO}}(\text{O}_2)_2(\text{L-L}')^n]^{n-}$, $n = 1, 2, 3$ i $[\text{V}^{\text{VO}}(\text{O}_2)(\text{H}_2\text{O})(\text{L-L}')^n]^{n-}$, $n = 0, 1$.

Medyczne zastosowanie związków wanadu skupia się głównie na ich wykorzystaniu *in vitro* i *in vivo* w leczeniu cukrzycy typu I i II. Poza tym związki wanadu wykazują także właściwości cytotatyczne i cytotoksyczne [3, 4] oraz plemnikobójcze [5–7].

Cukrzyca (łac. *diabetes mellitus*) jest przewlekłą chorobą metaboliczną, charakteryzującą się brakiem lub nieprawidłowym działaniem wytwarzanego przez trzustkę hormonu – insuliny. Wyróżnia się dwa podstawowe typy cukrzycy: cukrzycę typu I (tzw. młodzieńczą, insulinozależną) oraz typu II, insulinoniezależną. Typ I spowodowany jest brakiem w organizmie insuliny, wynikającym z uszkodzenia komórek beta trzustki, i może być skutecznie leczony wyłącznie iniekcjami insuliny [8]. Cukrzycę typu II leczy się odpowiednią dietą i ćwiczeniami fizycznymi oraz stosuje się doustne środki farmakologiczne, obniżające poziom cukru we krwi [9]. Już w końcu XIX wieku związki wanadu były zalecane w stanach niedożywienia, anemii, a także w przypadku gruźlicy i cukrzycy. W roku 1899 zaobserwowano obniżenie wydzielania glukozy z moczem u pacjentów z cukrzycą leczonych wanadanem sodu [10, 11]. Jak stwierdzono przez ostatnie 30 lat badań, związki wanadu mogą zachowywać się w organizmie podobnie jak insulina, w odniesieniu do wybranych fizjologicznych i biochemicznych objawów obu rodzajów cukrzycy.

Dużą zaletą tych związków, w porównaniu z insuliną, jest to, że mogą być podawane doustnie. Zatem celem badań w tym zakresie jest zsyntetyzowanie związków wanadu, które będą wchłaniały się i osiągały tkanki docelowe z odpowiednio wysoką skutecznością. Związki o takich właściwościach powinny posiadać niski ciężar cząsteczkowy, optymalną lipofilowość i brak ładunku w celu łatwego przenikania przez błony biologiczne.

W niniejszej pracy przedstawiono przegląd związków wanadu, wykazujących właściwości insulinonaśladowcze.

1. MECHANIZM DZIAŁANIA WANADU

Działanie wanadu określane jest w piśmiennictwie jako: insulinonaśladowcze (ang. *insulin-mimetic*), insulinopodobne (ang. *insulin-like*), przeciwcukrzycowe (ang. *anti-diabetic*) oraz wzmacniające insulinę (ang. *insulin enhancing*), przy czym ostatnie z wymienionych określeń uznawane jest przez niektórych autorów za mylące i niezalecane. Mechanizm przeciwcukrzycowego i insulinonaśladowczego działania wanadu oraz jego biologiczna rola jest szeroko dyskutowana w pracach [10–21].

Insulina jest hormonem regulatorowym, wytwarzanym przez komórki beta wysypek Langerhansa w trzustce. Insulina wiąże się z podjednostką β receptora insulinowego (IR) na powierzchni komórek tłuszczowych i mięśniowych, aktywując jednocześnie kinazę tyrozyny. Powoduje to autofosforylację reszt tyrozynowych, rozpoczynając transdukcję sygnalizowania insuliny, a tym samym szereg fizjologicznych efektów, jak pobudzenie poboru glukozy przez komórki wątroby, mięśni i adypocyty oraz zahamowanie wątrobowej produkcji glukozy. Wygaszanie działania insuliny następuje w wyniku defosforylacji reszt tyrozynowych pod wpływem białkowej fosfatazy tyrozynowej – PTP (głównie PTP-1B), co prowadzi do unieczynnienia enzymów wchodzących w skład kaskady. Nadmierna aktywność białkowych fosfataz tyrozyny może być jedną z przyczyn insulinooporności postreceptorowej, prowadzącej do hiperглиkemii, a w konsekwencji do m.in. otyłości i cukrzycy. W związku z tym zablokowanie aktywności PTP mogłoby prowadzić do potencjalizacji działania insuliny u osób dotkniętych insulinoopornością oraz zmniejszyć ryzyko wystąpienia związanych z tym powikłań [19]. Sugeruje się, że właśnie taką rolę mogłyby spełniać związki wanadu [20]. Wanad jest potencjalnym niespecyficznym inhibitorem białkowych fosfataz tyrozyny [12, 22], w tym również PTP-1B. Molekularny mechanizm, odpowiedzialny za insulinonaśladowcze właściwości związków wanadu, związany jest z aktywacją wielu składników kaskady przekazywania insulinoowego, do których należą m.in. kinazy białkowe aktywowane przez mitogeny (MAPKs), kinazy regulujące pozakomórkowe przekazywanie sygnału (ERK1/2), 3-kinaza fosfatydyloinozytolu (PI3-K) czy kinaza białkowa B [13, 15, 22].

Wanad może naśladować wiele funkcji metabolicznych insuliny zarówno w warunkach *in vivo*, jak i *in vitro* [23–25]. Sole wanadu aktywują transport heksoz w komórkach tłuszczowych i tkance mięśniowej wpływając pobudzająco na transporter glukozy – białko GLUT4 oraz ograniczają uwalnianie wolnych kwasów tłuszczowych (FFA) [26]. Związki wanadu, powodując uwrażliwienie tkanek na insulinę, mogą poprawiać jej właściwości metaboliczne. Poza tym normalizują wtórne powikłania cukrzycy przez obniżenie poziomu białka w moczu, zapobieganie zmianom histopatologicznym w nerkach oraz kardiomiopatii i retinopatii. Ponadto poprawiają właściwości wydzielnicze trzustki i trzustkowy zapas insuliny.

2. NIEORGANICZNE ZWIĄZKI WANADU

Przeciwcukrzycowe właściwości wanadu zostały po raz pierwszy opisane w 1985 r. przez Heyligera i in. [2]. Autorzy stwierdzili, że podawanie w wodzie pitnej ortowanadanu sodu, w stężeniu 0,8 mg/ml, szczurom z cukrzycą indukowaną streptozocyną (STZ) powoduje wyrównanie poziomu glukozy we krwi [2]. Odkrycie to spowodowało wzrost ilości doświadczeń z wykorzystaniem nieorganicznych związków wanadu, głównie siarczanu oksowanadu(IV) (siarczanu wanadylu) VO_2SO_4 oraz wanadanów sodu Na_3VO_4 i NaVO_3 .

W innych badaniach zaobserwowano hipoglikemizujący efekt siarczanu wanadylu podawanego dootrzewnowo szczurom z STZ-cukrzycą w dawce 9,3 mg/kg m.c. przez 12 dni; efekt ten utrzymywał się jednak tylko do zakończenia podawania leku [24]. Ze względu na stosunkowo słabe wchłanianie tych związków w przewodzie pokarmowym oraz efekty niepożądane (utrata wagi, bóle brzucha, wymioty), zaczęto poszukiwać nowych nieorganicznych i organicznych pochodnych wanadu o lepszych właściwościach fizykochemicznych oraz fizjologicznych.

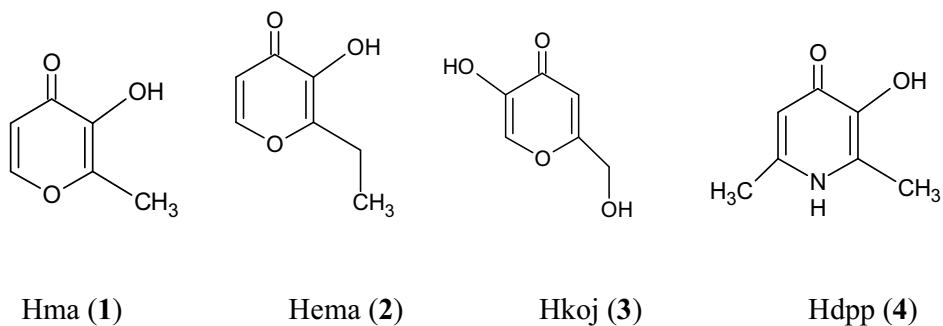
3. ZWIĄZKI KOMPLEKSOWE WANADU(IV) I WANADU(V) O WŁAŚCIWOŚCIACH PRZECIWCUKRZYCOWYCH

Szereg związków wanadu z ligandami organicznymi charakteryzuje się lepszymi właściwościami przeciwcukrzycowymi niż proste sole nieorganiczne zarówno w badaniach *in vitro*, jak i *in vivo*, dzięki lepszej przenikalności do tkanek drogą dyfuzji biernej i podniesieniu skuteczności działania wanadu. Do takich związków należą m.in. kompleksy z maltolem, etylomaltolem czy pikolinianami. Ligandy organiczne stosowane w kompleksach wanadu również obniżają toksyczność wanadu, ograniczając lub likwidując głównie zaburzenia ze strony układu pokarmowego.

3.1. KOMPLEKSY Z MALTOLEM I JEGO POCHODNYMI

Do szeroko przebadanych związków koordynacyjnych wanadu należą kompleksy oksowanadu(IV) z pochodnymi hydroksypiranu i hydroksypyridynonu [26–33]:

- maltol – 3-hydroksy-2-metylo-piran-4-on – Hma (**1**)
- etylomaltol – 3-hydroksy-2-etylo-piran-4-on – Hema (**2**)
- kwas kojowy – (5-hydroksy-2-hydroksymetylo-piran-4-on) – Hkoj (**3**)
- 1,2-dimetylo-3-hydroksy-4-pirydynon – Hdpp (**4**) (Rys. 1).

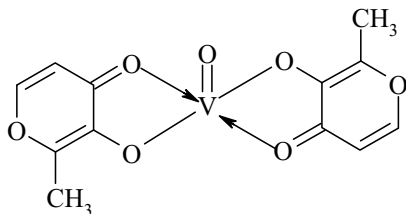


Rysunek 1. Struktura chemiczna maltolu i jego pochodnych
Figure 1. Chemical structure of maltol and its derivatives

We wszystkich kompleksach VO(IV) z tego typu ligandami występuje układ koordynacyjny (ang. *coordination mode*) VO(O₄). Maltol i etylomaltol (stosowane w wielu krajach jako dodatki do żywności) oraz ich pochodne jako ligandy charakteryzują się umiarkowaną wewnętrzną aktywnością biologiczną oraz niską toksycznością. Ponadto maltol tworzy trwałe, obojętne kompleksy z jonami metali posiadające optymalne właściwości hydro- i lipofilowe oraz umiarkowaną zdolność hydrolizy.

Zastosowanie ligandów strukturalnie podobnych do maltolu, a mianowicie kwasu kojowego czy 1,2-dimetylo-3-hydroksy-4-pirydynonu pozwala na uzyskanie kompleksów o innej rozpuszczalności w wodzie, lipofilowości i trwałości hydrolytycznej. Zainteresowanie tymi ligandami wynika też z ich zdolności do łatwej deprotonacji; wartości pK_a dla Hma, Hema i Koj wynoszą odpowiednio 8,38; 8,78 oraz 7,72.

Jednym z szeroko i intensywnie badanych kompleksów wanadu jest bis(maltolato)oksowanad(IV), BMOV (Rys. 2) zawierający kation wanadylu połączony z dwoma anionami maltolu, a także bis(etylomaltolato)oksowanad(IV), BEOV. We wszystkich badaniach na zwierzętach BMOV był 2–3 razy bardziej skuteczny w obniżaniu stężenia glukozy we krwi niż siarczan(VI) wanadylu, ponadto był również lepiej tolerowany.



Rysunek 2. Struktura kompleksu bis(maltolato)oksowanadu(IV), BMVO (5)
Figure 2. The structure of bis(maltolato)oxovanadium(IV), BMOV (5)

Porównanie wyników badań z udziałem ^{48}V -BMOV i $^{48}\text{VOSO}_4$ wykazało podobną biodystrybucję wanadu z obu związków. Po doustnym podaniu ^{48}V -BMOV wanad najdłużej zatrzymywany był w kościach (biologiczny okres półtrwania > 10 dni), następnie w nerkach i w wątrobie. BMOV charakteryzuje się jednak ponad dwukrotnie wyższym czasem eliminacji z kości, w porównaniu z VOSO_4 . Niewątpliwą przewagą BMOV nad siarczanem(VI) wanadyłu było osiągnięcie w większości tkanek ponad 2–3-krotnie większych stężeń ^{48}V po 24 godz., po doustnym podaniu dawki równoważnej 10 μmoli wanadu.

BEOV charakteryzuje się nieco większą odpornością na hydrolizę oraz lipofilnością niż BMOV. W roku 2000 zakończono dla BEOV pierwszą fazę badań klinicznych z udziałem ludzi. Celem tych badań było oszacowanie bezpieczeństwa i tolerancji pojedynczej, wzrastającej doustnej dawki BEOV, badania farmakokinetyczne dla średnich dawek (oznaczenie stężenia wanadu w surowicy krwi, moczu i kale) oraz porównanie dostępności biologicznej BEOV i siarczanu(VI) wanadyłu. Badania przeprowadzono na 40 zdrowych ochotnikach w wieku 18–45 lat [34].

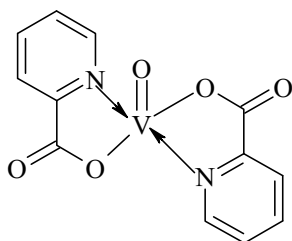
Podczas badań nie zaobserwowano u żadnego z ochotników działań niepożądanych; stan układu pokarmowego, nerek, wątroby oraz parametrów krwi pozostał na fizjologicznie prawidłowym poziomie.

Badania farmakokinetyczne wykazały nieproporcjonalną zależność między dawką a polem powierzchni pod krzywą (AUC) oraz zawartością wanadu (% dawki) w moczu. Z kolei parametry, takie jak czas, po którym występowało maksymalne stężenie we krwi (T_{max}), biologiczny okres półtrwania ($t_{1/2}$) oraz klirens nerkowy, były niezależne od dawki. Wartość T_{max} dla VOSO_4 jest ok. 2-krotnie wyższa niż dla BEOV, co świadczy o znacznie wolniejszym wchłanianiu wanadu ze związku nieorganicznego. Biodostępność BEOV jest ok. 3 razy większa, w porównaniu do siarczanu(VI) wanadyłu. Bardzo negatywny wpływ na dostępność biologiczną BEOV ma obecność pokarmu w żołądku. Stwierdzono, że absorpcja wanadu po doustnym podaniu 75 mg BEOV była 13-krotnie wyższa na czczo niż z żołądka wypełnionego pokarmem. Ten niepożądany efekt można wyeliminować lub ograniczyć podając lek przed posiłkiem [34].

3.2. PIKOLINIANY

Kolejną grupę dwudonorowych ligandów stanowią pikoliniany, które tworzą kompleksy z wanadem na +3, +4 oraz +5 stopniu utlenienia [26–28]. Z jonami V(IV) tworzą kompleksy typu $\text{V}^{\text{IV}}\text{OL}_2$ o układzie koordynacyjnym $\text{VO}(\text{N}_2\text{O}_2)$. Syntezę bis(pirydyno-2-karboksy)-oksowanadu(IV) – $\text{VO}(\text{pic})_2$ (**6**) (Rys. 3) opisano już w 1964 roku [28]. Insulinopodobny efekt działania kompleksów oksowanadu(IV) z pikolinianami zależy od dawki oraz metody podania. Podczas podawania szczerom z indukowaną streptozotocyną cukrzycą zaobserwowano wyrównanie poziomu glukozy we krwi oraz znaczący wzrost poziomu insuliny. W innych badaniach (podawano większe dawki) zanotowano zgodny z przewidywaniami spadek poziomu glu-

kozy we krwi i brak podniesienia stężenia insuliny oraz niepożądane działanie drażniące na układ pokarmowy. Dootrzewnowe podanie $\text{VO}(\text{pic})_2$ w dawkach 10–50 razy mniejszych niż doustnie powodowało obniżenie poziomu glukozy we krwi. Przy wyższych dawkach wanadu towarzyszyło temu podniesienie poziomu bilirubiny.



Rysunek 3. Kompleks wanadu(IV) z pikolinianem – $\text{VO}(\text{pic})_2$ (6)
Figure 3. Vanadium(IV) picolinate complex – $\text{VO}(\text{pic})_2$ (6)

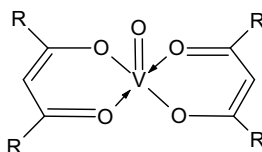
Takino i in. zaproponowali di(5-jodopikoliniano)oxovanad(IV) – $\text{VO}(\text{Ipic})_2$ jako potencjalny związek hipoglikemiczny [35]. Wprowadzenie atomu jodu do liganda (pikolinianu) spowodowało zwiększenie skuteczności obniżania poziomu glukozy we krwi, w porównaniu do $\text{VO}(\text{pic})_2$; stały poziom glukozy utrzymywał się przez 14 dni od momentu podania (dootrzewnowo) ostatniej dawki. Efekt ten spowodowany jest prawdopodobnie wolniejszym wydalaniem wanadu podanego w tej formie. $\text{VO}(\text{Ipic})_2$ wiąże się we krwi z błoną erytrocytów i albuminami.

Dipikolinian oksovanadu(V) – $\text{VO}_2(\text{pic})_2$, a dokładniej jego połączenie z jonem amonowym, podawany doustnie kotom z naturalną cukrzycą, okazał się skuteczny jako środek hipoglikemiczny [27]. Poza tym związek ten nie wykazywał działań niepożądanych, jak wymioty, biegunka czy odwodnienie, oraz nie zaobserwowano hepato- i nefrotoksyczności. Jest to pierwszy organiczny związek wanadu na +5 stopniu utlenienia skuteczny w badaniach na zwierzętach.

Dla trzech pikolinianowych kompleksów wanadu na różnym stopniu utlenienia, a mianowicie $\text{H}[\text{V}(\text{III})(\text{dipic})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, $\text{H}[\text{V}(\text{IV})\text{O}-\text{dipic} \cdot (\text{H}_2\text{O})_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ oraz $\text{NH}_4[\text{V}(\text{V})\text{O}_2-\text{dipic}]$ przeprowadzono badania przenikalności przez błony żołądka z wykorzystaniem linii komórkowej Caco-2. W warunkach *in vitro* Caco-2 tworzy monowarstwę komórek strukturalnie i funkcjonalnie podobnych do ludzkich enterocytów. Badano także cytotoksyczność tych kompleksów w stosunku do komórek nabłonka jelitowego testem oceniającym aktywność metaboliczną komórek (test MTT). Przenikalność kompleksów była niezależna od stężenia związku i nadmiaru liganda w stosunku do metalu. Wszystkie kompleksy wykazywały przenikalność $>10^{-6}$ cm/s i niską kumulację w komórkach ($< 1\%$) w trakcie 60 min inkubacji. Ponadto wszystkie kompleksy charakteryzują się podobną cytotoksycznością w stosunku do komórek Caco-2 [36].

3.3. β -DIKETONY

Bis(2,4pentanodionato-*O,O*)oksovanad(IV) VO(acac)₂ (7) oraz jego analogi – metylowy VO(Me-acac)₂ (8) i etylowy VO(Et-acac)₂ (9) (Rys. 4) były często badane jako związki insulinonaśladowcze [27, 37, 38].



Rysunek 4. Budowa kompleksów wanadu z β -diketonami:

R=H (7), CH₃ (8), C₂H₅ (9) R= OCH₃ (10), OC₂H₅ (11)

Figure 4. The structure of vanadium complexes with β -diketone:

R=H (7), CH₃ (8), C₂H₅ (9) R= OCH₃ (10), OC₂H₅ (11)

W badaniach *in vitro* z wykorzystaniem izolowanych komórek tłuszczowych (adypocytów) VO(acac)₂, przy stężeniach 5–100 μ M, był znacznie bardziej efektywny w stymulowaniu lipogenezy niż siarczan(VI) wanadylu. Kompleksy VO(acac)₂ oraz VO(Et-acac)₂ podawane doustnie w ilości 0,4 mmola przez 8 tygodni wywoływały niewielkie, łagodne obniżenie poziomu glukozy we krwi, jednak istotnie różne od siarczanu(VI) wanadylu podawanego w tej samej dawce. Stosunek dawki podanej do stężenia wanadu we krwi był dla organicznych kompleksów oksowanadu(IV) znacząco niższy niż dla VOSO₄, co oznacza lepsze wchłanianie wanadu ze związków kompleksowych.

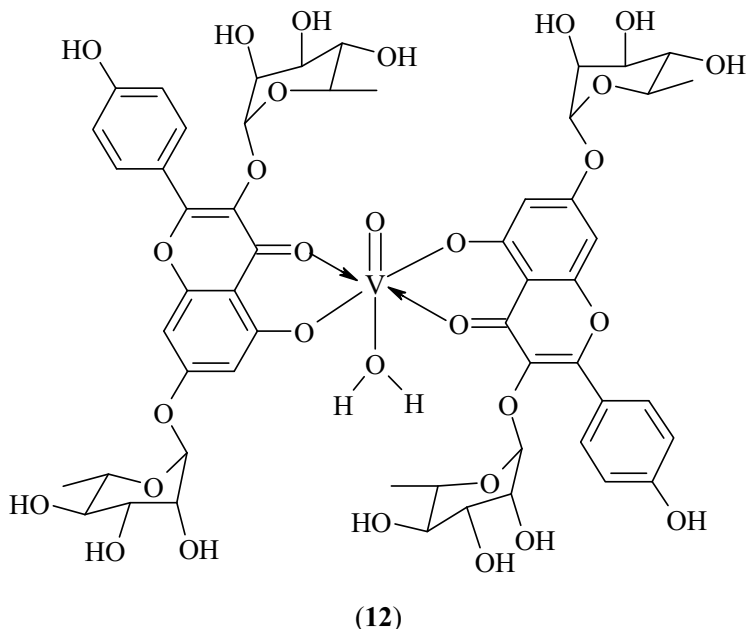
Sheela i in. zaproponowali nowe kompleksy wanadu(IV) z diketonami: bisdimetylomalonian oksowanadu(IV) – VO(dmmal)₂ (10) oraz bisdietylomalonian oksowanadu(IV) – VO(demal)₂ (11) (Rys. 4). Zbadano strukturę tych kompleksów oraz ich właściwości przeciwcukrzycowe. Obydwa kompleksy wykazują skuteczność porównywalną do leku przeciwcukrzycowego glibenklamidu [39].

3.4. KOMPLEKSY Z FLAWONOIDAMI

Niektóre z flawonoidów, jak myricetyna, kempferol czy hesperydyna, wykazują *in vitro* przeciwcukrzycowe działanie [40]. Cazarolli i in. porównali właściwości hipoglikemizujące wolnych pochodnych glikozydowych flawonoidów (kempferol-3,7-*O*-(α -diramnozyd – kempferol-3-neohesperyd) oraz ich kompleksów z wanadem(IV). Kompleksy te charakteryzowały się układem koordynacyjnym typu VO(O4).

Wyraźne obniżenie stężenia glukozy we krwi zaobserwowano dla 0,0294 mmol kompleksu VO(IV) z kempferol-3-neohesperydem (Rys. 5) (17,8%) oraz dla 0,0286 mmol kompleksu z kempferol-3-neohesperydem (56%) trzy godziny po doustnym podaniu szczurom z cukrzycą indukowaną alloxanem. Dla porównania: 0,0146 mmol

siarczaniu(VI) wanadylu powoduje efekt hipoglikemiczny na poziomie 16,8%, a 0,5 IU insuliny obniża poziom glukozy we krwi o 67,5%. Jak widać, kempferolo-3-neohe-sperydozydo-VO(IV) jest ok. dwukrotnie efektywniejszy w obniżaniu stężenia glu-kozy we krwi od wolnego VO(IV) i 3-krotnie od drugiego z badanych kompleksów [41].

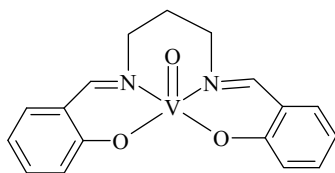


Rysunek 5. Struktura kompleksu VO(IV) z kempferofryną (w fizjologicznym pH)
Figure 5. The structure of VO(IV) with kaempferitrin complex (at physiological pH)

Główną zaletą stosowania kompleksu kempferolo-3-neohe-sperydozydo-VO(IV) jest zdolność jonów wanadu do zwiększenia insulinopodobnych właściwości flawonoidów, a także wydłużenie okresu hipoglikemii porównywalne do endogennej insuliny.

3.5. POCHODNE SALEN-U (SALICYLIDENOIMINY)

Jako potencjalne związki o insulinopodobnych właściwościach zaproponowa-no również kompleksy wanadu (IV) z salicylidenoinimą (Rys. 6) – dianionową czte-rondonorową zasadą Schiffa i jej pochodnymi [28, 42]. Kompleksy te charakteryzują się układem koordynacyjnym typu VO(N₂O₂). VOSALEN podawany doustnie w dawce 7,5 mmol·kg⁻¹·d⁻¹ (przez 30 dni) szczurom z cukrzycą indukowaną aloksanem skutecznie obniżał stężenie glukozy we krwi, aczkolwiek zaobserwowano występo-wanie hipoglikemii. Poza tym, po zaprzestaniu dawkowania, stężenie glukozy wzra-stało bardzo szybko do poziomu sprzed leczenia [43].



(13)

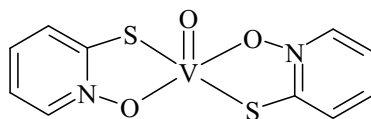
Rysunek 6. Struktura kompleksu SALEN-u z jonami wanadu(IV)
 Figure 6. The structure of SALEN with vanadium(IV) ions

W pracy [44] opisano syntezę i charakterystykę strukturalną oraz właściwości przeciwcukrzycowe kompleksu – $[N,N'$ -1,3-propylo-bis(salicyladimino)] oksowanadu(IV). Związek ten podawano w różnych dawkach szczurom STZ dożołądkowo, raz dziennie, przez 2 tygodnie. Po upływie czasu dawkowania stwierdzono obniżenie stężenia glukozy we krwi. Autorzy sugerują, że badany kompleks może zwiększać klirens glukozy i poprawiać tolerancję glukozy u szczurów z cukrzycą (wywołaną STZ).

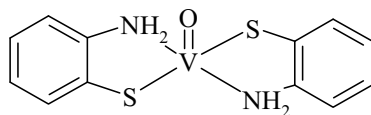
3.6. KOMPLEKSY Z LIGANDAMI ZAWIERAJĄCYMI SIARKĘ

Sakurai i in. [45, 46] zsyntetyzowali kompleksy oksowanadu(IV) z ligandami zawierającymi siarkę i ocenili ich insulinonaśladowczą aktywność w warunkach *in vitro* i *in vivo* (na szczurach STZ). Najskuteczniejszym spośród sześciu kompleksów o układzie koordynacyjnym $VO(S_4)$ okazał się bis(pirolidino-*N*-karboditiolato)oksovanad(IV) $[VO(pcd)_2]$. Z kolei bis(1-oksy-2-pirydynotiolato)oksovanad(IV) $[VO(opt)_2]$ (Rys. 7) z układem koordynacyjnym $VO(S_2O_2)$ wykazuje silne właściwości insulinonaśladowcze *in vitro* oraz normalizuje (po podaniu doustnym i dootrzewnowym) poziom glukozy we krwi u szczurów z indukowaną STZ cukrzycą. Z kolei u myszy ob/ob (model zwierzęcy cukrzycy typu II) w trakcie 15-dniowego okresu podawania kompleksu stwierdzono obniżenie poziomu glukozy, insuliny i triglicerydów we krwi.

Inny, obiecujący pod względem właściwości insulinonaśladowych, kompleks oksowanadu(IV) z ligandem siarkowym to VO-(*o*-aminotiofenolan)₂ $(VO(tioan)_2)$ z układem koordynacyjnym $VO(S_2N_2)$ (Rys. 7) [47].



(14)



(15)

Rysunek 7. Budowa chemiczna kompleksów oksowanadu(IV):

a) bis(1-oksy-2-pirydynotiolato)oksowanad(IV), b) VO(IV)-(o-aminotiofenolan)₂

Figure 7. Chemical structure of oxovanadium(IV) complexes:

a) bis(1-oxy-2-piridynothiolato)oxovanadium(IV), b) VO(IV)-(o-aminothiofenolate)₂

3.7. PORFIRYNOWE KOMPLEKSY WANADU

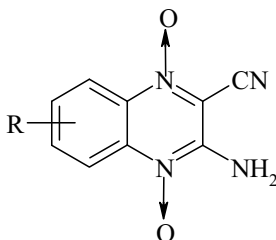
Do związków o potencjalnych właściwościach insulinonaśladowczych należą także kompleksy jonów oksowanadu(IV) z porfirynami. Sakurai i in. [48] stwierdzili, że kompleksu *mezo*-tetrakis(1-metylpirydino-4-yl)porfiryny (tmpp) z VO(IV) wykazuje insulinopodobną aktywność, jeśli podawana jest szczurom STZ jednocześnie z askorbinianem sodu. Najprawdopodobniej jest to wynikiem synergistycznego działania kompleksu i askorbinianu sodu. Działanie *in vitro* VO(IV)tmpp oceniono na podstawie wartości stężenia (IC₅₀) powodującego 50% zahamowanie uwalniania wolnych kwasów tłuszczowych (FFA) z izolowanych szczurzych adypocytów. Kompleks VO(tmpp), podany samodzielnie lub też w połączeniu z askorbinianem sodu (IC₅₀ ok. 3,38 mmol), okazał się 3-krotnie mniej aktywny niż VOSO₄ (IC₅₀ ok. 1,00 mmol) i aż 10-krotnie niż VOSO₄ + askorbinian sodu (IC₅₀ ok. 0,34 mmol).

Silną aktywność insulinonaśladowczą zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo* wykazuje kompleks *mezo*-tetrakis(4-sulfofenylo)porfiryny (tspp) z jonami VO(IV) [49, 50]. VO(tspp) skutecznie obniżał, po podaniu doustnym, poziom glukozy we krwi zarówno w modelu zwierzęcym cukrzycy typu 1 (myszy z cukrzycą indukowaną streptozocyną), jak i typu 2 (myszy KKA^y). Stwierdzono także, że VO(tspp) wykazuje insulinonaśladowcze właściwości dzięki zdolności pobudzenia receptora insulinowego (IR β) w adypocytach i fosforylacji pierwszego substratu receptora insulinowego (IRS1) i kinazy białkowej B. Ponadto kompleks stymuluje przemieszczenie transportera glukozy GLUT4 z cytozolu do błony komórkowej.

3.8. KOMPLEKSY Z INNYMI LIGANDAMI

Na początku lat 90. zaproponowano kompleksy wanadyłu z metylocysteiną $\text{VO}(\text{cym})_2$, szczawianami $\text{VO}(\text{ox})_2$, aldehydem salicylowym $\text{VO}(\text{sal})_2$, malonianem $\text{VO}(\text{mal})_2$ oraz dwurdzeniowy kompleks z jonami winianowymi $(\text{VO})_2(\text{tart})_2$, które wykazywały wysoką skuteczność w normalizacji hiperglikemii u szczurów z cukrzycą indukowaną streptozotocyną (STZ) [28].

Z kolei Noblia i in. zsyntetyzowali i scharakteryzowali strukturalnie trzy nowe kompleksy – pochodne chinoksaliny (Rys. 8) [51]. Do oceny właściwości przeciwcukrzycowych *in vitro* zastosowano test zahamowania lipolizy, w którym oznaczano stopień zahamowania uwalniania wolnych kwasów tłuszczowych z adypocytów poddanych działaniu adrenaliny. Wszystkie trzy kompleksy wykazywały właściwości hamujące lipolizę. Na podstawie wartości IC_{50} stwierdzono, że kompleksy $\text{VO}(\text{L}_2)_2$ i $\text{VO}(\text{L}_1)_2$ mają jednak silniejsze właściwości hamujące niż $\text{VO}(\text{L}_3)_2$ oraz bis(metylopikolinianu) oksowanadu(IV) użyty jako wzorzec (odnośnik).



Rysunek 8. Budowa ligandów – pochodnych chinoksaliny L1 – R = H (3-amino-chinoksalino-2-nitrylo N^1, N^4 ditlenek) (16), L2 – R = Br (3-amino-6(7)-bromochinoksalino-2-nitrylo N^1, N^4 ditlenek) (17), L3 – R = CH_3 (3-amino-6(7)-metylochinksalino-2-nitrylo N^1, N^4 ditlenek) (18)

Figure 8. The ligands structure – derivatives of quinoxaline, L1 – R = H (3-amino-quinoxaline-2-carbonitrile/ N^1, N^4 -dioxide) (16); L2 – R = Br, (3-amino-6(7)-bromoquinoxaline-2-carbonitrile/ N^1, N^4 -dioxide) (17); L3 – R = CH_3 (3-amino-6(7)-methylquinoxaline-2-carbonitrile/ N^1, N^4 -dioxide) (18)

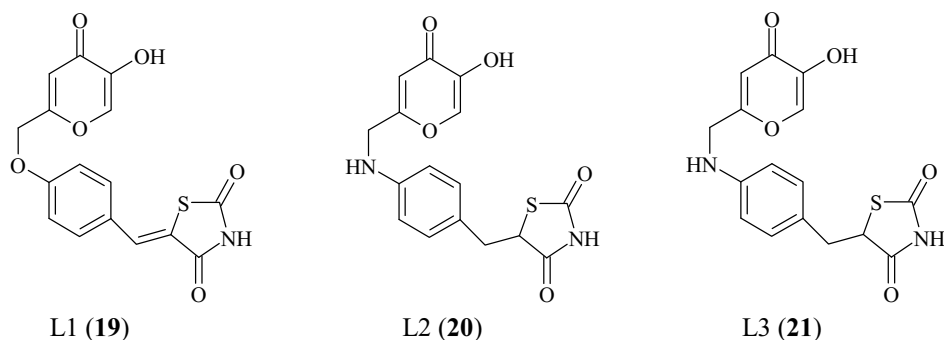
W pracy [52] przedstawiono wyniki badań nad przeciwcukrzycowymi właściwościami połączeń wanadu(V) z witaminą B_{12} . W pierwszym etapie zsyntetyzowano pochodną witaminy B_{12} – alkilokobalaminę (3-(3-hydroksy-2-metylo-1*H*-pirydino-4-on)-propylokobalaminę). Następnie, w wyniku reakcji alkilokobalaminę z meta-wanadanem sodu (NaVO_3) otrzymano dwa kompleksy zawierające jedną lub dwie cząsteczki liganda: $\text{VO}_2(\text{OH}(\text{H}))_2\text{L}$ oraz VO_2L_2 , gdzie L oznacza alkilokobalaminę. Do oceny właściwości hipoglikemizujących otrzymanych związków wykorzystano szczury z cukrzycą typu 1 wywołaną streptozotocyną. Po 7 dniach od dootrzewnowej iniekcji streptozotocyny szczury podzielono na 4 grupy i podano dożylnie wodę (grupa kontrolna), alkilokobalaminę (grupa 2), roztwór wodny NaVO_3 grupie trzeciej oraz grupie 4-ej równomolową mieszaninę NaVO_3 i pochodnej witaminy B_{12} . Pod wpływem mieszaniny NaVO_3 -alkilokobalaminę poziom glukozy we krwi stopniowo obni-

zał się do prawie 50%, po 7 dniach od podania, a po 21 dniach wzrósł do ok. 75%. Skuteczność obniżania poziomu glukozy we krwi była statystycznie istotnie wyższa w porównaniu do samego NaVO_3 , natomiast podanie samej pochodnej witaminy B_{12} nie powoduje zmiany stężenia glukozy.

3.9. ZWIĄZKI HIPOGLIKEMIZUJĄCE JAKO LIGANDY

Podjęto również próby zastosowania istniejących na rynku leków hipoglikemizujących jako ligandów w kompleksach z jonami wanadu, oczekując addytywnego lub synergistycznego efektu. Woo i in. badali kompleksy VO(IV) z metforminą – pochodną biguanidu, lekiem przeciwcukrzycowym o wielokierunkowym działaniu. W Polsce jest to obecnie jedyny przedstawiciel tej grupy leków. Metformina hamuje glukoneogenezę i glikogenolizę w wątrobie, zmniejsza wchłanianie glukozy z jelita natomiast zwiększa jej wykorzystanie w mięśniach. $\text{VO}(\text{metf})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ wykazuje skuteczność obniżania poziomu glukozy we krwi, podobną jak BMOV i BEOV, natomiast efekt utrzymuje się krócej w przypadku kompleksów z maltolem i etylomaltolem [53].

Dużą grupę badanych kompleksów stanowią kompleksy wanadu z pochodnymi tiazolidynodionu [53, 54]. Tiazolidynodiony (TZDs) stosowane są w leczeniu cukrzycy typu II od 1997 roku. TZDs łączą się, głównie w tkance tłuszczowej, z jądrowym receptorem aktywowanym przez proliferatory peroksymów $\text{PPAR}\gamma$, wpływając na metabolizm lipidów i aktywność insuliny.



Rysunek 9. Ligandy zawierające w strukturze tiazolidynodion:

- 5-[4-(hydroksy-4-okso-4H-piran-2-ylmetoksy)benzylideno]-tiazolidyno-2,4-dion (**19**),
 5-[4-[(hydroksy-4-okso-4H-piran-2-ylmetylo)amino]benzyl]-tiazolidyno-2,4-dion (**20**),
 5-[4-[(5-hydroksy-1-metylo-4-okso-1,4-dihydro-pirydino-2-ylmetylo)amino]benzyl]tiazolidyno-2,4-dion (**21**)

Figure 9. Ligands containing thiazolidinodione:

- 5-[4-(hydroxy-4-oxo-4H-pyran-2-ylmethoksy)benzylidene]-thiazolidine-2,4-dione (**19**),
 5-[4-[(hydroxy-4-oxo-4H-pyran-2-ylmethyl)amino]benzyl]-thiazolidine-2,4-dione (**20**),
 5-[4-[(5-hydroxy-1-methyl-4-oxo-1,4-dihydro-pyridin-2-ylmethyl)amino]benzyl]thiazolidine-2,4-dione (**21**)

Storr i in. [54] zsyntetyzowali kompleksy wanadu(IV) z pochodnymi tiazolidynodionu jako ligandami (Rys. 9). Badania z udziałem szczurów z cukrzycą indukowaną STZ przeprowadzono dla samych ligandów, ich kompleksów z oksowanadem(IV) oraz BMVO (jako substancji referencyjnej). Najskuteczniejszym w obniżaniu poziomu glukozy we krwi był ligand (**19**) (ok. 49% po 24 godz.) oraz jego kompleks z jonami wanadylu – VO(L1)₂ (ok. 57%, po 24 godz.). Jak widać, w przypadku kompleksu VO(L1)₂ uzyskano pożądaną efekt synergistyczny. Dla porównania, BMVO po takim samym czasie od podania obniża stężenie glukozy we krwi o ok. 57%.

4. NOWE FORMY PODANIA LEKU (ANG. *DRUG DELIVERY SYSTEM*)

Siarczan wanadylu VOSO₄ był testowany zarówno u pacjentów z cukrzycą typu I, jak i typu II. W przypadku obu rodzajów cukrzycy stwierdzono u pacjentów wzrost wrażliwości tkanek wątroby i mięśni na insulinę. Wadą tego związku jako leku jest jego niska dostępność biologiczna oraz objawy niepożądane, występujące przy większych dawkach. W celu zwiększenia efektywności działania wanadu i bezpieczeństwa pacjentów, Fugono i in. [55] zaproponowali zastosowanie siarczanu wanadylu w formie powlekanych dojelitowych kapsułek (ang. *enteric-coated capsules*, ECC). Badania wykazały, że stały VOSO₄ podawany w formie ECC wykazuje dwukrotnie wyższą dostępność biologiczną niż wodny roztwór siarczanu wanadylu, co pozwala na stosowanie dwukrotnie mniejszych dawek i osiągnięcie takiego samego poziomu leku we krwi. Lek podany w postaci dojelitowych kapsułek przechodzi przez żołądek nie wywołując działania drażniącego. Zastosowanie związków wanadu w postaci ECC opisano także w pracy [56].

W celu zwiększenia absorpcji leku, przetestowano także *in vitro* na izolowanych szczurzych adypocytach oraz *in vivo* na myszach z cukrzycą typu 1, kompleks VOSO₄ z wielkocząsteczkowym kwasem poli(γ -glutaminowym) [57]. Zaobserwowano znacząco większą aktywność kompleksu, w porównaniu do samego siarczanu wanadylu. Inne metody polegają na jednoczesnym podaniu soli wanadu i dodatkowej substancji np. hydrofobowych nośników, głównie monohydroksamianów [34, 58] lub rozpuszczalnego w wodzie Tironu (kwasu 4,5-dihydroksy-1,3-benzenosulfonowego) [34]. Monohydroksamiany stosowano jako nośnik dla siarczanu wanadylu, natomiast Tiron podawano z metawanadanem sodu.

Z kolei kompleks peroksowanadu z 1,10-fenantroliną próbowano podawać szczurom przezskórną (w formie plastrów). Wzrost stężenia wanadu we krwi był zauważalny, natomiast obniżenie poziomu glukozy było niewielkie.

Edel i in. zaproponowali podawanie ortowanadanu sodu jako zawiesiny w wyciągu z czarnej herbaty. Główną zaletą tej formy podania leku, w porównaniu do konwencjonalnej zawiesiny w wodzie, było znaczące ograniczenie objawów niepożądanych [59]. Badania przeprowadzono na szczurach z cukrzycą indukowaną streptozotocyną (STZ); po 4 dniach od dożylniej iniekcji STZ dwóm grupom szczurów

podano doustnie 40 mg ortowanadanu sodu jako zawiesiny w wodzie destylowanej, jako zawiesiny w wyciągu z czarnej herbaty, a grupie trzeciej podano sam wyciąg z herbaty. Następnie mierzono stężenie wanadu we krwi i różnych tkankach w przeciągu 24 godz. od rozpoczęcia eksperymentu. W tkankach zwierząt, którym podano wodną zawiesinę związku wanadu, stwierdzono podobne lub wyższe stężenia wanadu, w porównaniu do zwierząt, które otrzymały zawiesinę w herbacie. W obu przypadkach stężenie wanadu było najwyższe w kościach i malało w szeregu kości > nerki > wątroba > trzustka > płuca > serce > mięśnie > mózg. Obniżenie stopnia kumulacji wanadu w tkankach, dzięki zastosowaniu zawiesiny w wyciągu z czarnej herbaty, może ograniczać jego toksyczność przy przewlekłym leczeniu cukrzycy.

Jednym ze sposobów kontroli uwalniania wanadu w organizmie i zwiększenia jego dostępności biologicznej jest zastosowanie adsorpcyjnego kompleksu wanadu z chitosanem (CS) lub dodatkowo – wbudowanie kompleksu V-CS w strukturę hydrożelu chitosanu [60].

5. TOKSYCZNOŚĆ WANADU

Związki wanadu o właściwościach przeciwcukrzycowych powodują w większych dawkach i przy dłuższym stosowaniu objawy niepożądane. Badania na zwierzętach wykazują, że na toksyczność związków wanadu wpływa szereg czynników, jak forma organiczna czy nieorganiczna związku, stopień utlenienia wanadu, droga i czas ekspozycji oraz dawka [61]. Do najczęściej występujących objawów niepożądanych u zwierząt należą zaburzenia ze strony układu pokarmowego, biegunka, odwodnienie, utrata przyrostu wagi. Większość z tych objawów można było zneutralizować przez podanie w wodzie pitnej NaCl lub przez stopniowe zwiększanie dawki wanadu. Podczas stosowania związków wanadu (soli nieorganicznych) u ludzi przez okres 2-4 tygodni występowały także wymioty, wzdęcia, nudności [62].

Goldfine i in. przeprowadzili badania z udziałem ludzi chorych na cukrzycę typu II, podając jednej grupie *placebo*, a trzem pozostałym siarczany wandyliu w dawkach 75 mg, 150 mg i 300 mg dziennie (w trzech podzielonych dawkach) przez 6 tygodni. U pacjentów przyjmujących najmniejszą dawkę nie zanotowano żadnych objawów niepożądanych, natomiast wraz ze wzrostem dawki nasiliły się skurcze i dyskomfort w układzie pokarmowym [63].

W badaniach, w których stosowano zarówno sole nieorganiczne, jak i kompleksy wanadu z organicznymi ligandami, zaobserwowano, że podawanie szczurom związków organicznych nie wywoływało żadnych efektów ubocznych ze strony układu pokarmowego.

Poza niekorzystnymi objawami w układzie pokarmowym, udokumentowano szereg innych efektów toksycznych m.in. hepatotoksyczność, nefrotoksyczność oraz teratogenność [61].

6. SPOSOBY TESTOWANIA ZWIĄZKÓW WANADU

W przeciągu ostatnich 20 lat przeprowadzono badania wielu związków kompleksowych wanadu, szczególnie oksowanadu(IV), w celu oceny ich właściwości przeciwcukrzycowych. Wykorzystywane są przede wszystkim *in vivo* modele zwierzęce ze sztucznie indukowaną (streptozotocyną, aloksanem i in.) cukrzycą typu I i II, na których testuje się zdolność związków wanadu do skutecznego obniżania stężenia glukozy we krwi. W badaniach związków o właściwościach przeciwcukrzycowych stosuje się także gryzonie (szczury) z genetycznie uwarunkowaną otyłością i cukrzycą – szczury typu *Zucker fatty* (ZF) oraz *Zucker diabetic fatty* (ZDF). Typ ZF charakteryzuje się hiperinsulinemią, ale prawidłowym poziomem glukozy we krwi, natomiast u szczurów ZDF występuje hipoinsulinemia i hiperglikemia (model cukrzycy typu II) [63, 64].

W wielu laboratoriach stosowane są także modele zwierzęce z genetycznie indukowaną cukrzycą typu II – insulinooporne gryzonie, a mianowicie myszy ob/ob [65] i db/db (charakteryzujące się odpowiednio hiperglikemią i hiperinsulinemią) oraz szczury BB (z tendencją do tycia) i fa/fa (ze zmniejszoną odpowiedzią na insulinę na poziomie receptorowym).

Do oceny właściwości insulinopodobnych stosuje się również *in vitro* izolowane szczurze adypocyty. Testuje się wówczas wpływ badanego związku na efektywność uwalniania wolnych kwasów tłuszczowych z adypocytów [14, 66–68].

Do badania farmakokinetyki wanadu wykorzystuje się *in vivo* monitoring krwioobiegu metodą paramagnetycznego rezonansu elektronowego (BCM-EPR), oraz elektronowego rezonansu jądrowego (BCM-ESR) z udziałem kompleksów wanadu znakowanych izotopem ^{48}V [33, 34, 69], a także monitoring stężenia metalu we krwi z użyciem neutronowej analizy aktywacyjnej (NAA) oraz spektrometrii mas ze wzbudzeniem w plazmie indukcyjnie sprzężonej ICP-MS. Uzupełnienie badań nad właściwościami związków kompleksowych wanadu stanowią badania równowag w roztworze, badania spektroskopowe oraz analiza rentgenograficzna kompleksów stałych.

Aktywność wielu związków wanadu testowana jest przez pomiar wzrostu aktywności metabolicznej mitochondriów wywołanej przez zwiększone zużycie glukozy w mysich fibroblastach pozbawionych insuliny. Aktywność kompleksów wanadu stanowi ok. 30–70% aktywności insuliny. Związki VO(IV) wykazują nieco wyższą aktywność niż kompleksy wanadanów(V), ale zarówno jedno, jak i drugie kompleksy posiadają znaczącą aktywność biologiczną w zakresie stężeń 1–10 μmola . Przy wyższych stężeniach mogą wystąpić objawy toksyczne; nieco silniejsze dla kompleksów VO(IV), w porównaniu do związków wanadu(V) [26, 34].

PODSUMOWANIE

Z roku na rok obserwuje się wzrost liczby zachorowań na cukrzycę, szczególnie u osób w coraz młodszym wieku. WHO szacuje, że w 2030 roku liczba chorych na cukrzycę wyniesie ok. 366 milionów na całym świecie [70]. Powoduje to poszukiwanie skutecznych i nietoksycznych doustnych środków farmakologicznych regulujących poziom glukozy we krwi, czy też zwiększających wrażliwość tkanek na insulinę mogących stanowić alternatywę dla codziennych iniekcji insuliny. Takie nadzieje wiąże się m.in. z wanadem i jego związkami, głównie kompleksami z ligandami organicznymi.

Aktywność antyproliferacyjna i cytotoksyczna niektórych kompleksów wanadu sugeruje, że związki te mogłyby być wykorzystane również w chemioterapii nowotworów.

PODZIĘKOWANIE

Praca wykonana w ramach realizacji badań statutowych Katedry Chemii Nieorganicznej i Analitycznej CM UMK na rok 2008/2009 oraz projektu nr 503-3066-2 finansowanego przez Uniwersytet Medyczny w Łodzi.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] D. Rehder, *Inorg. Chem. Commun.*, 2003, **6**, 604.
- [2] A.Goc, *Central Eur. J. Biol.*, 2006, **1**, 314.
- [3] B. Desoize, *Anticancer Rev.*, 2004, **24(3a)**, 1529.
- [4] M.M. Harding, G. Mokhsi, *Curr. Med. Chem.*, 2000, **7**, 1289.
- [5] O.J. D'Cruz, F.M. Uckun, *Adv. Reprod.*, 1998, **1**, 102.
- [6] O.J. D'Cruz, P. Ghosh, F.M. Uckun, *Biol. Reprod.*, 1998, **58**, 1515.
- [7] G.B. Less, N.W. Ockwig, P.G. Rasmussen, *Inorg. Chem.*, 2006, **45**, 7105.
- [8] E. Otto-Buczowska, P. Jarosz-Chobot, K. Tucholski, *Pol. J. Endocrin.*, 2008, **59**, 246.
- [9] A. Czech, J. Tatoń, *Przew. Lek.*, 2004, **4**, 63.
- [10] Y. Shechter, I. Goldwasser, M. Mironchik, M. Fridkin, D. Gefel, *Coord. Chem. Rev.*, 2003, **237**, 3.
- [11] H. Sakurai, *Biomed. Res. Trace Elements*, 2007, **18**, 241.
- [12] D.C. Crans, J.J. Smee, E. Gaidamauskas, L. Yang, *Chem. Rev.*, 2004, **104**, 849.
- [13] S. Garcia-Vincente, F. Yraola, L. Marti, E. Gonzalez-Munoz, M.J. Garcia-Barrado, C. Canto, A. Abella, S. Bour, R. Artuch, C. Sierra, N. Brandi, C. Carpena, J. Moratinos, M. Camps, M. Palacin, X. Testar, A. Guma, F. Albericio, M. Royo, A. Mian, A. Zorzano, *Diabetes*, 2007, **56**, 486.
- [14] K. Kawabe, Y. Yoshikawa, Y. Adachi, H. Sakurai, *Life Sci.*, 2006, **78**, 2860.
- [15] M. Hiromura, H. Sakurai, *Chem. Biodiversity*, 2008, **5**, 1615.
- [16] D.A. Roess, S.M.L. Smith, P. Winter, J. Zhou, P. Dou, B. Baruah, A.M. Trujillo, N.E. Levinger, X. Yang, B.G. Barisas, D.C. Crans, *Chem. Biodiversity*, 2008, **5**, 1558.
- [17] E.J. Baran, *J. Inorg. Biochem.*, 2000, **80**, 1.

- [18] D.C. Crans, M. Mahroof-Tahir, M.D. Johnson, P.C. Wilkins, L. Yang, K. Robbins, A. Johnson, J.A. Alfano, M.E. Godzala, L.T. Austin, G.R. Willsky, *Inorg. Chim. Acta*, 2003, **356**, 365.
- [19] A. Bodała, M. Wdowczyk, R. Adamiec, *Postepy Hig. Med. Dosw. (online)*, 2005, **59**, 203.
- [20] K.G. Peters, M.G. Davis, B.W. Howard, M. Pokross, V. Rastogi, C. Diven, K.D. Greis, K.D. Eby-Wilkens, M. Maier, A. Evdokimov, S. Soper, F. Genbauffé, *J. Inorg. Biochem.*, 2003, **96**, 321.
- [21] A.B. Goldfine, M.E. Patti, L. Zuberi, B.J. Goldstein, R. LeBlanc, E.J. Landaker, Z.Y. Jiang, G.R. Willsky, C.R. Kahn, *Metabolism*, 2000, **49**, 400.
- [22] M.Z. Mehdi, S.K. Pandey, J.F. Theberge, A.K. Srivastava, *Cell. Biochem. Biophys.*, 2006, **44**, 73.
- [23] I. Goldwasser, D. Gefel, E. Gershonov, M. Fridkin, Y. Shechter, *J. Inorg. Biochem.*, 2000, **80**, 21.
- [24] M.C. Cam, R.W. Brownsey, J.H. McNeill, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 2000, **78**, 829.
- [25] A.K. Srivastava, M.Z. Mehdi, *Diabetic Med.*, 2005, **22**, 2.
- [26] T. Kiss, T. Jakusch, D. Hollender, A. Dörnyei, E.A. Enyedy, J.C. Pessoa, H. Sakurai, Sanz-Medel, *Coord. Chem. Rev.*, 2007.
- [27] D.C. Crans, *J. Inorg. Biochem.*, 2000, **80**, 123.
- [28] K.H. Thompson, C. Orvig, *Coord. Chem. Rev.*, 2001, **219-221**, 1033.
- [29] K.G. Peters, M.G. Davis, B.W. Howard, M. Pokross, V. Rastogi, C. Diven, K.D. Greis, E. Eby-Wilkens, M. Maier, A. Evdokimov, S. Soper, F. Genbauffé, *J. Inorg. Biochem.*, 2003, **96**, 321.
- [30] K.H. Thompson, J. Chiles, V.G. Yuen, J. Tse, J.H. McNeill, C. Orvig, *J. Inorg. Biochem.*, 2004, **98**, 683.
- [31] H. Yasui, A. Tamura, T. Takino, H. Sakurai, *J. Inorg. Biochem.*, 2001, **91**, 327.
- [32] K.H. Thompson, B.D. Liboiron, Y. Sun, K.D.D. Bellman, I. A. Setyawati, B.O. Patrick, V. Karunaratne, G. Rawji, J. Wheeler, K. Sutton, S. Bhanot, C. Cassidy, J.H. McNeill, V.G. Yuen, C. Orvig, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2003, **8**, 66.
- [33] K.H. Thompson, B.D. Liboiron, Y. Sun, K.D.D. Bellman, I.A. Setyawati, B.O. Patrick, V. Karunaratne, G. Rawji, J. Wheeler, K. Sutton, S. Bhanot, C. Cassidy, J.H. McNeill, V.G. Yuen, C.J. Orvig, *Biol. Inorg. Chem.*, 2003, **8**, 66.
- [34] K.H. Thompson, C. Orvig, *J. Inorg. Biochem.*, 2006, **100**, 1925.
- [35] T. Takino, H. Yasui, A. Yoshitake, Y. Hamajima, R. Matsuhita, J. Takada, H. Sakurai, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2001, **6**, 133.
- [36] A. Saeed, A.I. Anvarhusein, A. Saqib, A.R. Al-Arfaj, *Polyhedron*, 2006, **25**, 1633.
- [37] R.C. Maurya, S. Rajput, *J. Mol. Struct.*, 2007, **833**, 133.
- [38] Y. Zhang, X. Yang, K. Wang, D.C. Crans, *J. Inorg. Biochem.*, 2006, **100**, 80.
- [39] A. Sheela, S.M. Roopan, R. Vijayaraghavan, *Eur. J. Med. Chem.*, 2008, **43**, 2206.
- [40] K.C. Ong, H.E. Khoo, *Life Sci.*, 2000, **67**, 1695.
- [41] L.H. Cazarolli, L. Zanatta, A.P. Jorge, E. Sousa, H. Horst, V.M. Woehl, M.G. Pizzolatti, B. Szpoganicz, F.R.M.B. Silva, *Chemico-Biological Interactions*, 2006, **163**, 177.
- [42] X. Mingjin, X. Guangjun, L. Ling, L. Weiping, N. Yanfen, Y. Shiping, *Eur. J. Med. Chem.*, 2007, **42**, 817.
- [43] N. Durai, G. Saminathan, *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 1997, **22**, 31.
- [44] M. Xie, G. Xu, L. Li, W. Liu, Y. Niu, S. Yan, *Eur. J. Med. Chem.*, 2007, **42**, 817.
- [45] H. Sakurai, Y. Kojima, Y. Yoshikawa, K. Kawabe, H. Yasui, *Coord. Chem. Rev.*, 2002, **226**, 187.
- [46] H. Sakurai, H. Sano, T. Takino, H. Yasui, *J. Inorg. Biochem.*, 2000, **80**, 99.
- [47] D. Rehder, J.C. Pessoa, C.F.G.C. Geraldes, M.M.C.A. Castro, T. Kabanos, T. Kiss, B. Meier, G. Micera, L. Pettersson, M. Rangel, A. Salifoglou, I. Turel, D. Wang, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2002, **7**, 384.
- [48] H. Sakurai, T. Inohara, Y. Adachi, K. Kawabe, H. Yasui, *J. Takada, Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2004, **14**, 1093.

- [49] T. K. Saha, Y. Yoshikawa, H. Yasui, H. Sakurai, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 2006, **79**, 1191.
- [50] W. Basuki, M. Hiromura, H. Sakurai, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 2007, **80**, 1605.
- [51] P. Noblia, Marisol Vieites, M.H. Torre, A.J. Costa-Filho, H. Cerecetto, M. Gonzalez, M.L. Lavaggi, Y. Adachi, H. Sakurai, D. Gambino, *J. Inorg. Biochem.*, 2006, **100**, 281.
- [52] R. Mukherjee, E.G. Donnay, M.A. Radomski, C. Miller, D.A. Redfern, A. Gericke, D.S. Damron, N.E. Brasch, *Chem. Comm.*, 2008, 3783.
- [53] L.C.Y. Woo, V.G. Yuen, K.H. Thompson, J.H. McNeill, C. Orvig, *J. Inorg. Biochem.*, 1999, **76**, 251.
- [54] T. Storr, D. Mitchell, P. Buglyo, K.H. Thompson, V.G. Yuen, J.H. McNeill, C. Orvig, *Bioconjugate Chem.*, 2003, **14**, 212.
- [55] J. Fugono, H. Yasui, H. Sakurai, *J. Pharm. Pharmacol.*, 2002, **54**, 611.
- [56] H. Sakurai, J. Fugono, H. Yasui, *Mini Rev. Chem. Med.*, 2004, **4**, 41.
- [57] S. Karmaker, T.K. Saha, Y. Yoshikawa, H. Yasui, H. Sakurai, *J. Inorg. Biochem.*, 2006, **100**, 1535.
- [58] I. Goldwasser, J. Li, E. Gershonov, M. Armoni, E. Karnieli, M. Fridkin, Y. Shechter, *J. Biol. Chem.*, 1999, **274**, 26617.
- [59] A.L. Edel, M. Kopilas, T.A. Clark, F. Aguilar, P.K. Ganguly, C.E. Heyliger, G.N. Pierce, *Metab. Clin. Exp.*, 2006, **55**, 263.
- [60] K. Kofuji, C.J. Qian, Y. Murata, S. Kawashima, *J. Inorg. Biochem.*, 2005, **99**, 1329.
- [61] J.L. Domingo, *Biol. Trace Elem. Res.*, 2002, **88**, 97.
- [62] A.K. Srivastava, *Mol. Cell. Biochem.*, 2000, **206**, 177.
- [63] K.M. Wasana, V. Risovica, V.G. Yuen, J.H. McNeill, *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 2006, **19**, 251.
- [64] J. Wang, V.G. Yuen, J.H. McNeill, *Metabolism*, 2001, **50**, 667.
- [65] S.M. Brichard, C.J. Bailey, J.C. Henquin, *Diabetes*, 1990, **39**, 1326.
- [66] Y. Adachi, H. Sakurai, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, 2004, **52**, 428. (Abstract)
- [67] R. Shukla, R.R. Bhonde, *Biometals*, 2008, **21**, 205.
- [68] W. Basuki, M. Hiromura, Y. Adachi, K. Tayama, M. Hattori, H. Sakurai, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2006, **349**, 1163.
- [69] H. Yasui, A. Tamura, T. Takino, H. Sakurai, *J. Inorg. Biochem.*, 2002, **91**, 327.
- [70] S. Wild, G. Roglic, A. Green, R. Sicree, H. King, *Diabetes Care*, 2004, **27**, 1047.

Praca wpłynęła do Redakcji 15 grudnia 2008

**POCHODNE AKRYDYNY/AKRYDONU
– SYNTEZA, AKTYWNOŚĆ BIOLOGICZNA
I ZASTOSOWANIE KLINICZNE**

**ACRIDINE/ACRIDONE DERIVATIVES
– SYNTHESIS, BIOLOGICAL ACTIVITY
AND CLINICAL APPLICATION**

**Krystyna Dzierzbicka, Aleksandra Kawzowicz,
Agnieszka Koc, Magdalena Kukowska-Kaszuba**

*Katedra Chemii Organicznej, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska,
ul. G. Narutowicza 11/12, 80-952 Gdańsk*

Abstract

Wykaz stosowanych skrótów

Wprowadzenie

1. Metody syntez pochodnych akrydyny/akrydonu
2. Pochodne akrydyny o aktywności przeciwbakteryjnej i przeciw pasożytniczej
3. Akrydony jako leki przeciwwirusowe
4. Choroba Alzheimera
5. Pochodne akrydyny o aktywności przeciwnowotworowej
 - 5.1. Inhibitory topoizomerazy (topo)
 - 5.2. Inhibitory telomerazy
 - 5.3. Inhibitory kinaz białkowych
 - 5.4. Nitroakrydyny i inne hipoksja-selektywne związki
 - 5.5. Inhibitory P-glikoproteiny (P-gP)
 - 5.6. Kompleksy platyny z pochodnymi akrydyny
 - 5.7. Alkylująco-interkalujące związki akrydyny
 - 5.8. Bis-akrydyny/akrydony
6. Alkaloidy akrydynowe i ich pochodne

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane



Dr hab. inż. Krystyna Dzierzbicka w roku 1985 ukończyła studia na Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej w specjalności Chemia i Technologia Organiczna. W tym samym roku podjęła pracę w Katedrze Chemii Organicznej PG, gdzie pracuje do chwili obecnej. W 1994 roku obroniła pracę doktorską, a w 2005 r. otrzymała tytuł doktora habilitowanego nauk chemicznych. Jest współautorem kilkunastu prac dotyczących syntezy i projektowania koniugatów muramyllopeptydów i desmuramyllopeptydów ze związkami o stwierdzonej lub domniemanej aktywności biologicznej, pochodnych akrydyny, akrydonu, batracyliny, antrachinonów czy tuftsyny. Obecnie zajmuje się syntezą inhibitorów angiogenezy oraz związków immunosupresyjnych.



Mgr inż. Aleksandra Kawzowicz w roku 2008 ukończyła studia na Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej na kierunku Biotechnologia o specjalności Biotechnologia Leków. W październiku rozpoczęła Studia Doktoranckie na Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej w Katedrze Chemii Organicznej pod kierunkiem dr hab. inż. Krystyny Dzierzbickiej.



Mgr inż. Agnieszka Koc w roku 2008 ukończyła studia na Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej na kierunku Technologia Chemiczna o specjalności Technologia Organiczna.



Mgr inż. Magdalena Kukowska-Kaszuba – urodziła się w 1981 roku w Gdańsku. W latach 2000–2005 studiowała Biotechnologię na Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej. W 2005 roku uzyskała tytuł magistra inżyniera, na kierunku Biotechnologia o specjalności Biotechnologia Leków. Pracę dyplomową wykonała w Katedrze Chemii Organicznej Politechniki Gdańskiej. Obecnie jest na Studiach Doktoranckich na Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej w Katedrze Chemii Organicznej, gdzie kontynuuje pracę nad syntezą związków o potencjalnej aktywności przeciwnowotworowej pod kierunkiem dr hab. inż. Krystyny Dzierzbickiej.

ABSTRACT

Nowadays the battle with tumor diseases and bacterial infections is an important test for the scientists. Therefore a lot of attention is focused on obtaining novel, more effective, selectively acting and less toxic drugs. Because of that reason, compounds with wide range of action like acridines/acridones are of great interest for scientists. This study contains synthesis and biological activity of acridine/acridone derivatives which are used in medicine as an antitumor agents and those which are at clinical trials. Among the synthetic methods there are modifications of Ullmann synthesis [2, 3, 9]. Lately Belmont et al. [11, 12] described a new methodology for the synthesis of 1,3,7-trisubstituted acridines, 1-amino-acridine and tetrahydro-cyclopenta[c]acridine-2,5-diones (Scheme 5). The starting materials are commercially available quinolines. Among acridine/acridone group there are compounds with different molecular targets, e.g. topoisomerase inhibitors [1, 19–33], telomerase inhibitors [1, 34], protein-kinases inhibitors [36–40], P-glycoproteine inhibitors [56, 57, 76], conjugates with metals [1] and hypoxia-selective derivatives [2, 41–55]. This paper also describes compounds useful in Alzheimer disease [5, 16], antibacterial [2, 5], antiparasites [4, 5] and antiviral infections [5, 13, 14].

Keywords: acridine/acridone derivatives, biological activity, synthesis, clinical application

Słowa kluczowe: pochodne akrydyny/akrydonu, aktywność biologiczna, synteza, zastosowanie kliniczne

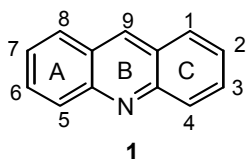
WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

AIDS	– zespół nabytego niedoboru odporności
CDK	– kinazy cyklozależne
DMF	– <i>N,N</i> -dimetyloformamid
DMP	– odczynnik Dess-Martina dostępny komercyjnie
DMSO	– dimetylosulfotlenek
DNA	– kwas deoksyrybonukleinowy
HIV	– ludzki wirus niedoboru odporności
MS	– sita molekularne
NMO	– <i>N</i> -tlenek <i>N</i> -metylomorfoliny
PPE	– ester kwasu polifosforowego
RNA	– kwas rybonukleinowy
TBS	– <i>t</i> -butylodimetylosilil
TBSOTf	– trifluorometanosulfonian <i>t</i> -butylodimetylosililu
THP	– tetrahydropiranyl
TMS	– trimetylosilil
TPAP	– nadrutenian tetrapropyloamoniowy

WPROWADZENIE

Walka z chorobami nowotworowymi i zakażeniami bakteryjnymi jest jednym z głównych celów stawianych środowiskom naukowym. Dlatego też sporo uwagi poświęca się otrzymaniu nowych, skutecznych, selektywnie działających i mniej toksycznych leków. Dużym zainteresowaniem naukowców cieszą się analogi akrydyny/akrydonu, związki o szerokim spektrum aktywności biologicznej.

Akrydyna **1** (Rys. 1) jest związkiem heteropolicyklicznym. Jej struktura chemiczna wywodzi się z trójpierścieniowego związku aromatycznego, będącego analogiem antracenu zawierającego atom azotu w pierścieniu B.



Rysunek 1. Struktura akrydyny
Figure 1. Acridine structure

Już w XIX wieku pochodne akrydyny stosowane były jako pigmenty i barwniki, ale dopiero po I wojnie światowej odkryto ich właściwości lecznicze. Początkowo wykorzystywano je jako leki przeciwbakteryjne oraz przeciw pasożytnicze (np. w leczeniu malarii czy leiszmaniozy), a dopiero w latach 70. XX w. odkryto ich właściwości przeciwnowotworowe [1].

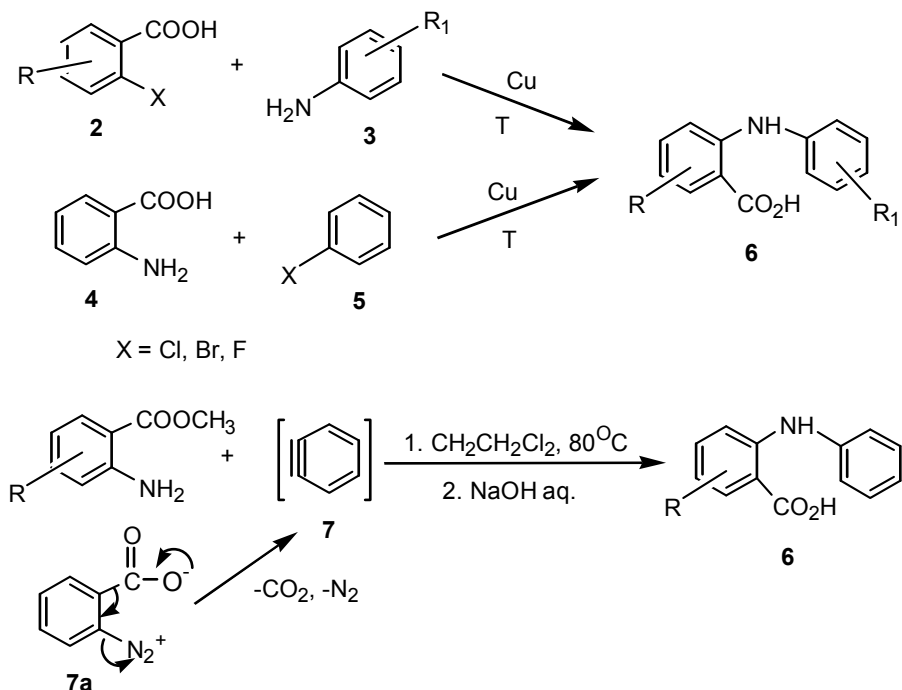
Mimo iż do tej pory zsyntetyzowano na świecie cały szereg analogów w tej grupie związków [1–8], to nadal poszukuje się nowych, bardziej aktywnych i o lepszych właściwościach farmakologicznych pochodnych. W artykule przedstawiono metody syntez i aktywność biologiczną najciekawszych z dotychczas otrzymanych pochodnych akrydyny/akrydonu.

1. METODY SYNTEZ POCHODNYCH AKRYDYNY/AKRYDONU

W literaturze opisano kilka różnorodnych metod syntezy pochodnych akrydyny/akrydonu [2, 3]. Większość z nich polega na otrzymaniu w pierwszej kolejności prekursora pierścieni akrydynowych – kwasu *N*-fenyloantranilowego **6** (Schemat 1). Najstarszą i najbardziej popularną metodą jego otrzymywania jest reakcja Ullmanna-Jourdana przebiegająca pomiędzy pochodną kwasu *o*-halogenobenzoesowego **2** a pochodną aniliny **3** bądź kwasem antranilowym **4** i pochodnymi halogenobenzenu **5**, w obecności pyłu miedzi jako katalizatora [2, 9].

W celu udoskonalenia metody Ullmanna wprowadzono katalizatory palladowe i skandowe. Aminacja Buchwalda-Hartwiga wykorzystuje katalizator palladowy wytwarzany *in situ* w obecności toluenu, w temperaturze 95°C [10]. Reakcja bie-

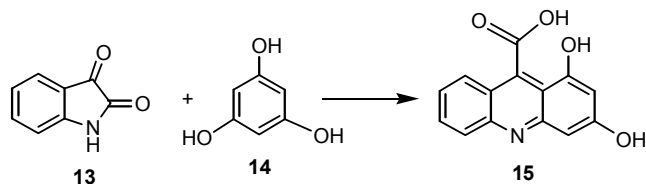
gnie pomiędzy estrem kwasu *o*-jodobenzoowego a pochodnymi aniliny. Inną drogą otrzymywania kwasu **6** jest termochemiczne wygenerowanie benzynu **7** z soli benzenodiazoniowej-2-karboksylanu **7a**, zwykle w dichloroetaninie w 80°C [3b], a następnie saponifikacja powstałego estru (Schemat 1) [2, 3a].



Schemat 1. Synteza kwasu *N*-fenyloantranilowego **6** [2, 3, 9]
 Scheme 1. Synthesis of *N*-phenylantranilic acids **6** [2, 3, 9]

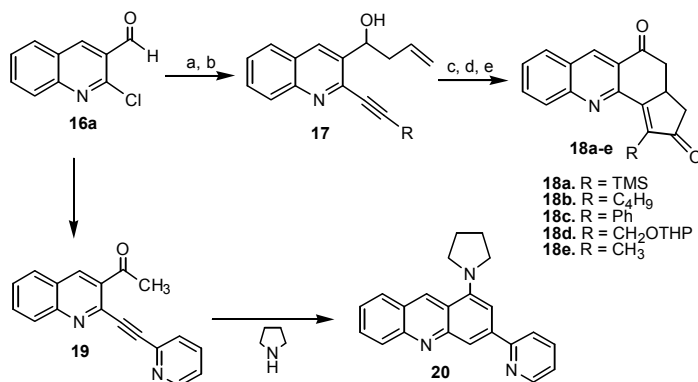
Cyklizacja kwasu *N*-fenyloantranilowego **6** może przebiegać w dwóch kierunkach, dając pochodne akrydyny lub akrydonu (Schemat 2). Dodanie POCl₃ prowadzi do otrzymania 9-chloroakrydyny **8**, produktów, które są niestabilne, więc zaleca się szybkie przeprowadzenie dalszych etapów syntezy. W celu otrzymania pochodnych akrydonu **9**, wymagane jest użycie silnego kwasu lub związku dehydratującego. Kwas siarkowy może być stosowany, jeśli w cząsteczce nie ma obecnych grup wrażliwych na jego działanie. W takich przypadkach lepszym odczynnikiem są estry kwasu polifosforowego w środowisku chloroformu. Otrzymany akrydon w wyniku redukcji, a następnie utlenienia można przekształcić w pochodną akrydyny [2].

Do syntezy pochodnych 1,3-dihydroksi-9-karboksyakrydyny **15** wykorzystuje się zmodyfikowaną metodę syntezy chinoliny Pfiztingera (Schemat 4) [2], polegającą na wielogodzinnym ogrzewaniu reagentów **13** i **14** w roztworze wodorotlenku sodu.



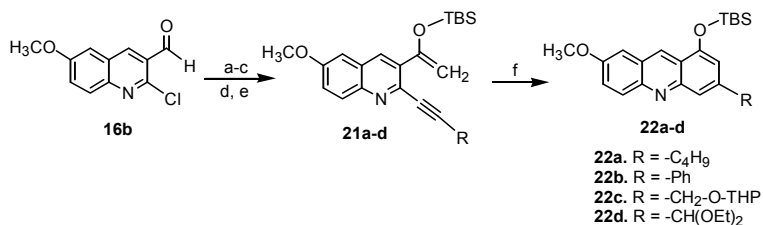
Schemat 4. Metoda Pfiztingera [2]

Scheme 4. Pfitzinger method [2]



18a. R = TMS
18b. R = C₄H₉
18c. R = Ph
18d. R = CH₂OTHP
18e. R = CH₃

- a. 1-alkin, PdCl₂(PPh₃)₂, Cul, Et₃N, DMF, temp. pok.
 b. AllylMgBr, THF, -78 °C
 c. **17**, Co₂(CO)₈, CH₂Cl₂, temp. pok., 2 h; NMO, temp. pok.
 d. DMP, CH₂Cl₂, temp. pok.
 e. **17a** (R = TMS), Co₂(CO)₈ (karbonylek kobaltu jest reagentem reakcji), CH₂Cl₂, temp. pok., 2 h; NMO, temp. pk.; TPAP i MS



22a. R = -C₄H₉
22b. R = -Ph
22c. R = -CH₂-O-THP
22d. R = -CH(OEt)₂

- a. MeMgBr, THF, 40°C; b. MnO₂, toluen, 80°C; c. NaI, CH₃CN, HCl 4N, reflux; d. TBSOTf, Et₃N, CH₂Cl₂;
 e. 1-alkin, PdCl₂(PPh₃)₂, Cul, Et₃N, toluen, temp. pok.; f. 10 mol % [Rh(CO)₂Cl₂], toluen, 120°C.

Schemat 5. Synteza pochodnych tetrahydrocyklopenta[*c*]akrydyny **18**, 1-aminoakrydyny **20** i 1,3,7-trójpodstawionych akrydyny **22** [11, 12]

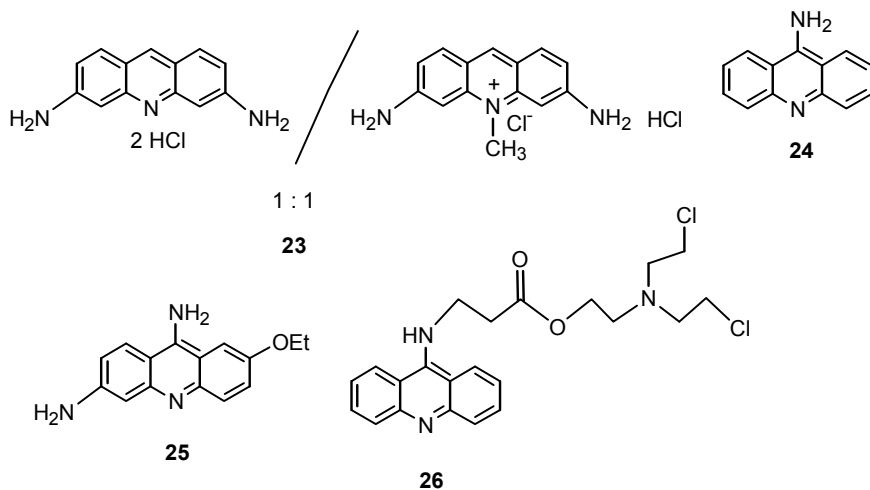
Scheme 5. Synthesis of tetrahydrocyclopenta[*c*]acridine **18**, 1-aminoacridine **20** and 1,3,7-trisubstituted acridine **22** [11, 12]

Przedstawione powyżej metody wymagają stosowania drastycznych warunków reakcji i nie mogą być użyte do otrzymywania pochodnych akrydyny zawierających grupy wrażliwe na wysoką temperaturę i/lub działanie silnych kwasów. To spowodowało poszukiwanie alternatywnych dróg otrzymywania związków akrydynowych. Przykładem są prace Belmonta i in. [11, 12], którzy do syntezy tetrahydrocyklopenta[*c*]akrydyn **18**, 1-aminoakrydyn **20** i 1,3,7-trójpodstawionych akrydyn **22** wykozystali pochodne chinoliny **16a,b** (Schemat 5).

2. POCHODNE AKRYDYNY O AKTYWNOŚCI PRZECIWBAKTERYJNEJ I PRZECIWPASOŻYTNICZEJ

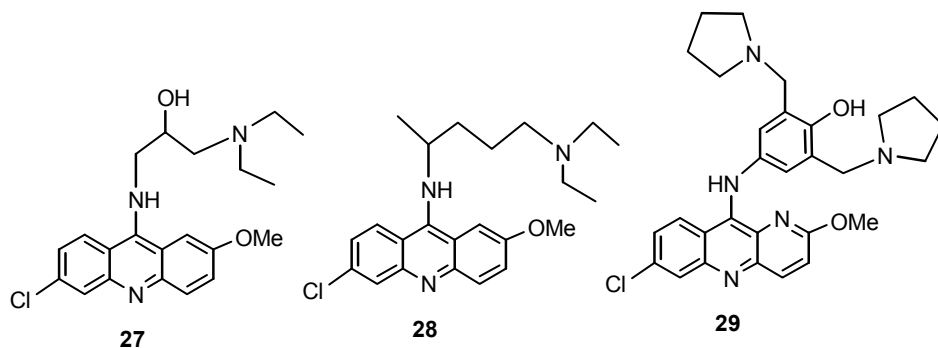
Pierwsze kliniczne zastosowania akrydyn skierowane były przeciwko zakażeniom bakteryjnym. Z czasem przestano się nimi interesować z powodu odkrycia bardziej skutecznych i mniej toksycznych leków. Wzrost oporności wielolekowej wśród szczepów bakterii spowodował ponowne zainteresowanie związkami akrydyny, wśród których aktywność przeciwbakteryjną wykazuje akryflawina **23**, będąca mieszaniną proflawiny i euflawiny (w stosunku 1:1) (Rys. 2). W latach 40. XX w. zastąpione zostały one 9-aminoakrydyną **24** oraz etakrydyną (rivanol) **25** (Rys. 2). Wszystkie wyżej wymienione związki są stosowane w medycynie do dziś [5].

Zdolność akrydyn do wiązania się z DNA wykorzystana została do inaktywacji genomów patogenów wirusowych i bakteryjnych obecnych w cytoplazmie i czerwonych krwinkach preparatów używanych do testów klinicznych oraz transfuzji. Do takich związków należy S-303 **26** (Rys. 2), zawierający fragment cząsteczki ipeptytu azotowego. Występujące tu wiązanie estrowe ulega szybkiej hydrolizie, zapewniając krótki okres półtrwania związku [4].



Rysunek 2. Pochodne akrydyny o aktywności przeciwbakteryjnej
Figure 2. Antibacterial acridine derivatives

W zwalczaniu infekcji spowodowanych przez pierwotniaki typu: malaria, trypanosomia i leiszmanioza, szczególnie użyteczne okazały się pochodne 6-chloro-2-metoksy-9-aminoakrydyny, takie jak: akranił **27**, chinakryna (mepakryna) **28** i pyronakrydyna **29**. Zaczęto je stosować w latach 40. XX wieku i do dziś są obecne w klinikach (Rys. 3) [5].



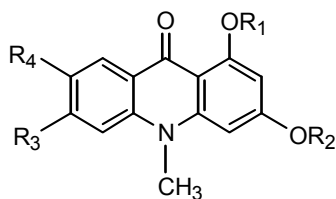
Rysunek 3. Pochodne akrydyny o aktywności przeciw pasożytniczej
Figure 3. Antiprotozoal acridine derivatives

3. AKRYDONY JAKO LEKI PRZECIWWIRUSOWE

Wiele naturalnych i syntetycznych pochodnych akrydonu jest aktywnych przeciwko takim wirusom, jak: HIV, wirus opryszczki zwykłej (HSV), wirus coxackie typu B1, adenowirus typu 6, wirus cytomegalii (HCMV), wirus Epstein-Barr (EBV) [13].

Otrzymano też połączenia akrydyn z aminoglikozydowymi antybiotykami, np. neomycyną B, które dały oczekiwane rezultaty w badaniach przeciwko AIDS i wirusowi HIV [14].

W 2006 roku [15] pojawiły się nowe pochodne akrydonu **30a–j** (Rys. 4), aktywne w stosunku do wirusa biegunki bydła i błon śluzowych (BVDV). BVDV powoduje poważne straty w hodowli bydła. Uważa się, że wirus ten jest surogatem wirusa zapalenia wątroby typu C (HCV). Najbardziej aktywna pochodna **30j** jest zdolna nie tylko do ochrony komórki przed cytopatologiczną działalnością wirusów (tak jak inne analogi), ale także hamuje replikację HCV.

**30a-j**

30a. R₁ = CH₃; R₂ = CH₃; R₃ = Cl; R₄ = NO₂

30b. R₁ = CH₃; R₂ = CH₃; R₃ = Cl; R₄ = NH₂

30c. R₁ = H; R₂ = CH₃; R₃ = Cl; R₄ = NO₂

30d. R₁ = H; R₂ = CH₃; R₃ = Cl; R₄ = NH₂

30e. R₁ = H; R₂ = H; R₃ = Cl; R₄ = NH₂

30f. R₁ = CH₃; R₂ = CH₃; R₃ = -N-N; R₄ = NO₂

30g. R₁ = CH₃; R₂ = CH₃; R₃ = -N-N; R₄ = NH₂

30h. R₁ = H; R₂ = CH₃; R₃ = -N-N; R₄ = NO₂

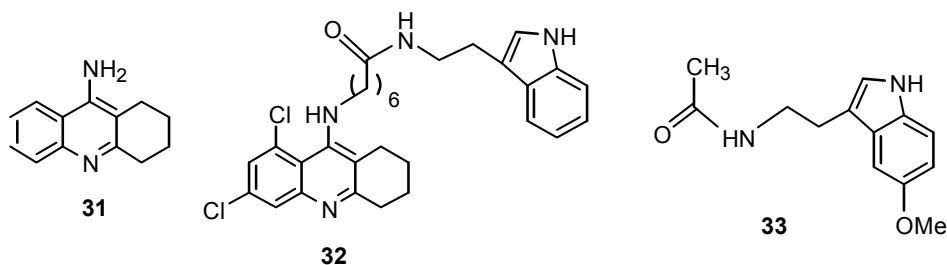
30i. R₁ = H; R₂ = CH₃; R₃ = -N-N; R₄ = NH₂

30j. R₁ = H; R₂ = H; R₃ = -N-N; R₄ = NH₂

Rysunek 4. Pochodne akrydyny o aktywności przeciwwirusowej
Figure 4. Antiviral acridine derivatives

4. CHOROBA ALZHEIMERA

Alzheimer to choroba dotykająca w większości ludzi starszych. Objawia się postępującym spadkiem zdolności intelektualnych, wywołanym zanikiem komórek nerwowych. Leki stosowane w chorobie Alzheimera to inhibitory cholinesterazy (cholinesteraza – enzym rozkładający acetylocholinę), które zwiększają neurotransmisję w synapsach cholinergicznym w mózgu, a co za tym idzie – zwiększają czynności intelektualne. Takim związkiem jest takryna (1,2,3,4-tetrahydro-9-aminoakrydyna) **31** oraz związek **32**, będący hybrydą takryny **31** i melatoniny **33** (Rys. 5), posiadający 8000-krotnie lepsze działanie jako inhibitor cholinesterazy niż takryna [5, 16].



Rysunek 5. Pochodne akrydyny stosowane w leczeniu choroby Alzheimer'a
Figure 5. Acridine derivatives used in treatment of Alzheimer's disease

5. POCHODNE AKRYDINY O AKTYWNOŚCI PRZECIWNOWOTWOROWEJ

Wielkość i kształt cząsteczki, ułożenie pierścieni oraz zdolności akceptorowo/donorowe atomu azotu to właściwości pochodnych akrydyny, pozwalające na ich wiązanie się do kwasów nukleinowych DNA i RNA, a zatem na wykorzystanie ich jako potencjalnych związków przeciwnowotworowych [17]. Użyteczność akrydyn jako chemoterapeutyków wynika z ich biologicznej stabilności, zdolności do efektywnego wiązania się do DNA oraz do zaburzenia jego funkcji w komórkach.

Mechanizm interkalacji do DNA polega na wpasowaniu się heterocyklicznego, trójpierścieniowego, płaskiego układu pomiędzy pary zasad w dwuniciowej strukturze DNA. Biologiczną konsekwencją interkalacji jest zakłócenie prawidłowego funkcjonowania DNA w komórkach.

Zdolność akrydyn do interkalacji do DNA jest warunkiem podstawowym do posiadania przez nie aktywności przeciwnowotworowej, a siła i kinetyka wiązania akrydyna-DNA różnicują jakość oddziaływań pochodnych akrydynowych z kwasami nukleinowymi. Badania wielu pochodnych wykazały, że istnieje duża zależność pomiędzy siłą powyższego wiązania oraz czasem trwania tego połączenia, a aktywnością biologiczną związków badanych [4, 18].

Pochodne akrydynowe uniemożliwiają prawidłowe funkcjonowanie komórek nowotworowych, również poprzez zaburzenie działania istotnych dla DNA enzymów: topoizomerazy, telomerazy oraz cyklinozależnych kinaz.

5.1. INHIBITORY TOPOIZOMERAZY (TOPO)

Topoizomerazy DNA są grupą homodimerycznych enzymów związanych z replikacją DNA, transkrypcją, rekombinacją i kondensacją chromatyny. Działają one poprzez wprowadzenie „pęknięć” w jedno- i dwuniciowym DNA i tworzą z DNA, tzw. „kompleksy rozszczepiające”. Inhibitory topoizomerazy to związki stabilizujące połączenia enzym-DNA: następuje uformowanie nowego potrójnego kompleksu

inhibitor-enzym-DNA. Kompleksy enzym-DNA są obecne w małym stężeniu również w zdrowych komórkach. Leczenie inhibitorami topoizomeraz powoduje znaczny ich wzrost. Powstają „przerwy” w niciach DNA, których obecność stymuluje wiele procesów metabolicznych komórki i ostatecznie prowadzi do jej „śmierci”. Główną wadą inhibitorów topoizomeraz jest ich mutagenność, która może uodpornić topoizomerazę na leki lub doprowadzić do wtórnego nowotworu [1].

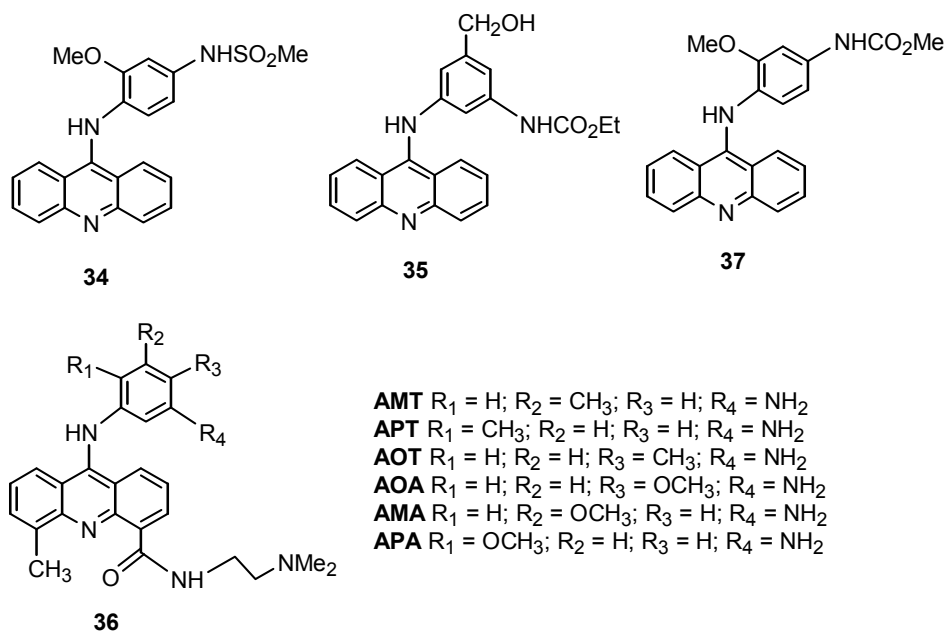
Amsakryna (*m*-AMSA) **34** (Rys. 6), otrzymana przez zespół Denny’*a* [19, 20], jest pierwszym syntetycznym lekiem z grupy inhibitorów topoizomerazy wykazującym skuteczność kliniczną. Stosowana od 1976 roku w leczeniu białaczki, jest pierwszym lekiem, któremu udowodniono oddziaływanie z kompleksem topo II-DNA. Badania SERS (spektroskopia ramanowska ze wzmocnieniem powierzchniowym) [21] wykazały, że amsakryna ma zdolność do specyficznego oddziaływania z enzymem, niezależnie od tworzenia się kompleksu „rozszczipiającego”. To oddziaływanie zawdzięcza łańcuchowi bocznemu, który wpływa na jej właściwości inhibitoryjne [22]. Metabolizm amsakryny może pociągać za sobą produkcję wolnych rodników, co skutkuje m.in. uszkodzeniem DNA, nie tylko w komórkach rakowych, ale również w zdrowych tkankach. W wyniku jej biooksydacji powstaje reaktywna chinonodiimina, która reaguje z wewnątrzkomórkowymi nukleofilami [23].

Otrzymano wiele pochodnych *m*-AMSA o silniejszych właściwościach przeciwnowotworowych i pozbawionych wielu szkodliwych efektów ubocznych [2].

Su i in. [24] zsyntetyzowali serię związków zawierających podstawniki w części anilinowej, w pozycji *meta* względem grupy 9-amino. Najważniejszym związkiem z tej grupy jest pochodna 5'-hydroksymetyloanilinowa (AHMA) **35** (Rys. 6). Położenie grup aminowych w pozycji *meta* zapobiega powstawaniu chinonodiiminowego półproduktu. AHMA jest inhibitorem topo II, wykazującym większą skuteczność w leczeniu białaczki i guzów litych u gryzoni niż *m*-AMSA; posiada także dłuższy okres półtrwania w ludzkim osoczu.

W 2003 roku zespół Su [25] opisał syntezę dalszych analogów AHMA **36** (Rys. 6), które wykazują większą cytotoxycyzość *in vitro* niż AHMA. Ponadto, w badaniach *in vivo* na myszach, zawierających ludzkie komórki raka piersi MX-1, były one bardziej aktywne i mniej toksyczne niż AHMA. Otrzymano też związki, które zamiast grupy metylowej zawierają grupę metoksyłową w pozycji *orto*, *meta* i *para*, w stosunku do grupy aminowej, dając kolejno: AOA, AMA, APA (Rys. 6), z których pochodna AOA wykazywała najwyższą cytotoxycyzość [26].

AMCA **37** (Rys. 6) jest pochodną amsakryny, która powstała w wyniku podstawienia grupy sulfonoamidowej grupą karbaminianową. Związek ten jest inhibitorem topo II. Wykazuje on dużą toksycyzość w stosunku do komórek nieproliferujących oraz zdolność do pokonania bariery błonowej opornych na inne leki linii komórkowych [1].

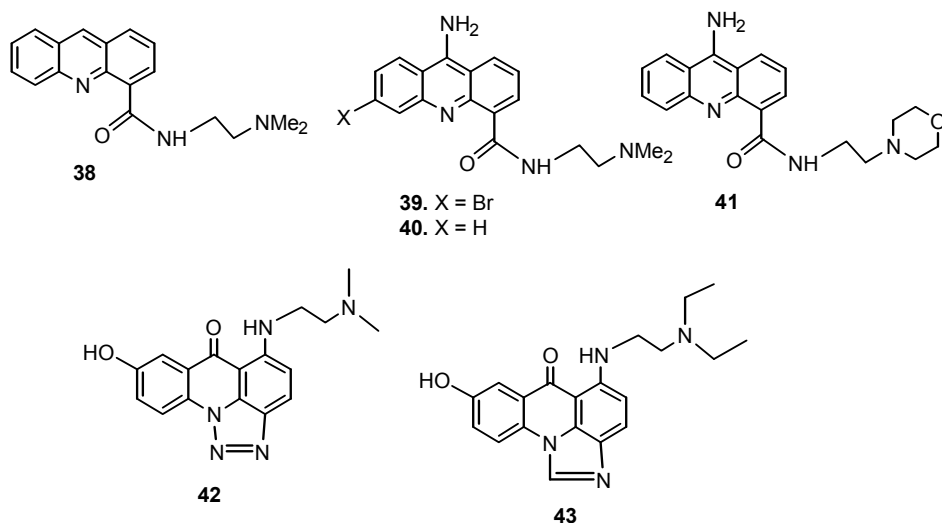


Rysunek 6. Pochodne akrydyny – inhibitory topoizomerazy
 Figure 6. Acridine derivatives – topoisomerase inhibitors

Inną grupą pochodnych akrydyny, będących inhibitorami topoizomerazy, są 4-karboksyamidoakrydyny. DACA **38** (Rys. 7), otrzymana w 1987 roku, jest jednym z nielicznych związków, które działają blokująco na dwa enzymy (topo I i II) [27]. W celu poznania tej niezwykłej właściwości DACA, kompleksy DACA oraz jej pochodnych **39-41** z oligonukleotydami DNA scharakteryzowano za pomocą analizy rentgenostrukturalnej. Z badań wynika, że cząsteczka akrydyny interkaluje między parę zasad d(CG)₂, grupa NMe₂H⁺ 4-karboksy-amidu tworzy w większym rowku wiązania wodorowe z atomem N7 guaniny (to samo dzieje się z grupą NH⁺ morfoliny). Brak aktywności morfolino-9-amino-DACA prawdopodobnie spowodowana jest obecnością grupy morfolinowej, która przez swoje „gabaryty” przeszkadza w tworzeniu stabilnego kompleksu rozszczepialnego [28, 29].

Triazoloakrydon (C-1305) **42** (Rys. 7), zsyntetyzowany na Politechnice Gdańskiej, jest inhibitorem topo II. Mimo że mechanizm działania nadal jest w fazie badań wiadomo, że związek ten wykazuje silniejsze właściwości inhibitujące topo II *in vitro* niż amsakryna **34** (Rys. 6). C-1305 oddziałując z DNA komórek nowotworowych, powoduje zahamowanie cyklu komórkowego w fazie G₂, po czym następuje śmierć komórki. Udowodniono, że triazoloakrydon wywołuje zmiany strukturalne w sekwencjach DNA zawierających tryplety guaniny. To strukturalne zakłócenie, specyficzne dla C-1305, może wyjaśniać cytotoksyczność i efekt przeciwnowotworowy tego związku [30, 31].

W 1990 roku [32] zsyntetyzowano również na Politechnice Gdańskiej imidazoakrydon C-1311 **43** (Rys. 7), który wszedł do badań klinicznych. Tak jak triazoloakrydon, hamuje on cykl komórkowy w fazie G_2 w komórkach rakowych. Mechanizm molekularny wskazuje na interkalację z parami zasad DNA i tworzenie kompleksu stabilizującego topo II-DNA. Obecność grupy 8-OH w imidazoakrydonie może tłumaczyć przeciwnowotworową aktywność tego typu związków, ponieważ jest on dużo wrażliwszy na procesy utleniające niż związek zawierający grupę 8-OMe (która jest mniej aktywna biologicznie). Można zatem wnioskować, że aktywacja pierścienia heterocyklicznego jest konieczna dla wykazania wysokiej aktywności przeciwnowotworowej imidazoakrydonu [33].



Rysunek 7. DACA **38** i jej pochodne **39–41**, triazoloakrydon **42** oraz imidazoakrydon **43**
 Figure 7. DACA **38** and its derivatives **39–41**, triazoloacridone **42** and imidazoacridinone **43**

5.2. INHIBITORY TELOMERAZY

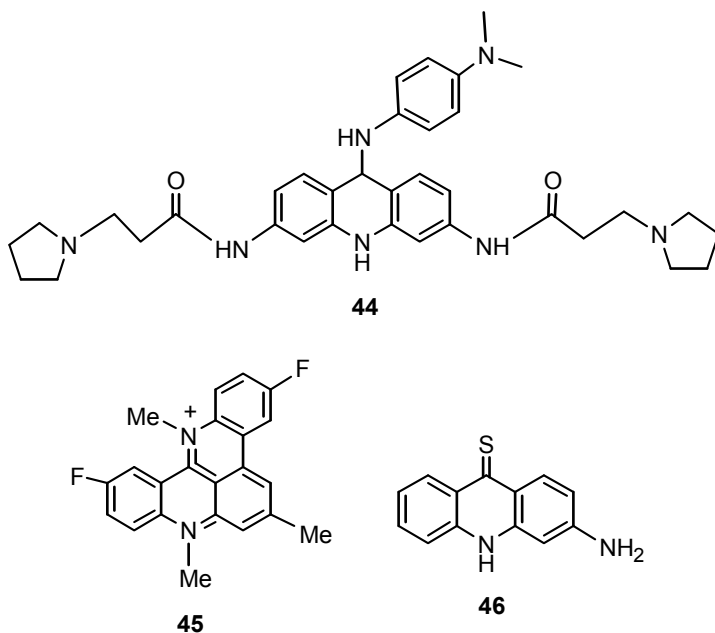
Telomery to jednoniciowe zakończenia chromosomów o powtarzającej się sekwencji TTAGGG. Ich długość związana jest z długością życia komórki. Telomery skracają się podczas każdego kolejnego podziału komórki, a ich całkowita utrata indukuje mechanizm apoptozy. W komórkach nowotworowych proces skracania telomerów zaburzony jest poprzez enzym telomerazę, nieaktywną w większości zdrowych komórek. Enzym wydłuża 3'-końce telomerowego DNA, zapobiegając w ten sposób skracaniu telomerów i – w efekcie – nadając komórce „nieśmiertelność” [34].

Ludzkie telomery to bogate w guaninę sekwencje, które mogą formować czte-niciowe wewnątrzmolekularne struktury, zwane G-kwadrupleksami lub G-4.

Te G-kwadrupleksy hamują aktywność telomerazy *in vitro*, dlatego też rozpatruje się je jako cel molekularny w projektowaniu leków przeciwnowotworowych. Stabilizacja G-4 w telomerycznym DNA przez małe molekuly może wpływać ujemnie na aktywność telomerazy i ostatecznie prowadzić do śmierci komórki. Pochodne akrydyny są jednymi z nielicznych związków wielopierścieniowych, które stabilizują G-kwadrupleksy [1].

Najbardziej obiecującą grupą są pochodne 3,6,9-triaminoakrydynowe, zsyntetyzowane przez Neidle'a i in. [35, 36]. Związek o nazwie BRACO 19 **44** (Rys. 8) wykazuje aktywność wobec telomerazy w stężeniu 0,1 mM, a działając nim na komórki raka piersi, posiadające krótkie telomery, znacznie zmniejszono liczbę komórek nowotworowych po 15 dniach kuracji [1].

Pięciopierścieniowe sole chinolino[4,3,2-*kl*]akrydyny stanowią grupę inhibitorów telomerazy, których przedstawicielem jest difluorowy analog RHPS4 **45** (Rys. 8). Związek ten jest rozpuszczalny w wodzie, stabilny przy pH 5–9 i efektywnie transportowany do komórek nowotworowych. RHPS4 rozpatruje się także jako podstawową strukturę dla dalszego opracowywania nowych inhibitorów telomerazy [1].



Rysunek 8. Pochodne akrydyny – inhibitory telomerazy i kinaz białkowych
Figure 8. Acridine derivatives – telomerase and protein-kinase inhibitors

5.3. INHIBITORY KINAZ BIAŁKOWYCH

Komórki rakowe różnią się od normalnych komórek m.in. sposobem komunikowania się ze swoimi sąsiadami, z powodu oddalenia w ich sieci sygnalizacyjnej. Kinazy białkowe, przede wszystkim tyrozynowe i serynowo/treoninowe (CDK), są mediatorami w szlakach sygnałowych sterujących każdą z faz cyklu komórkowego. Mutacje w ich ekspresji lub funkcjonowaniu prowadzą do nowotworów. Dlatego też inhibitory kinaz białkowych stały się celem dla zaprojektowania nowych leków przeciwnowotworowych [37, 38].

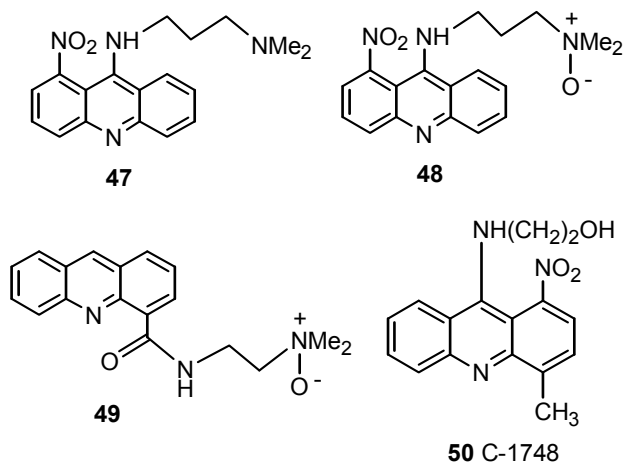
Skutecznymi inhibitorami kinaz okazały się tioakrydony. Należący do tej grupy 3-ATA **46** (Rys. 8), jest selektywnym inhibitorem CDK4. Atenuuje on indukowaną przez kwas kainowy apoptozę w neuronach oraz może zapobiegać indukowanej doksorubicyną śmierci neuronowej komórki [39–41].

5.4. NITROAKRYDYNY I INNE HIPOKSJA-SELEKTYWNE ZWIĄZKI

Z powodu wadliwego unaczynienia guzów nowotworowych, komórki nowotworowe cechuje niedobór tlenu. Komórki takie, mogą być celem dla substancji normalnie nietoksycznych, ulegających transformacji do postaci czynnej w środowisku beztlenowym. Takimi substancjami są związki aromatyczne zawierające grupę nitrową, które są aktywowane w wyniku redukcji grupy NO₂ [42–45].

Do tej rodziny należy między innymi nitrakryna (Ledakrin, C-283) **47** (Rys. 9), która została zsyntetyzowana na Politechnice Gdańskiej przez zespół Ledóchowskiego w latach 70. XX wieku [46a]. Aktywność związku oraz jego cytotoksyczność znacząco uzależniona jest od obecności grupy NO₂. Nitrakryna tworzy wiązania kowalencyjne z DNA i innymi makromolekułami, przez co daje połączenia krzyżowe z DNA, DNA-białko oraz przerwy w pojedynczych niciach DNA. Produkty jej metabolicznej aktywacji w warunkach *in vitro* zostały szczegółowo opisane [46b]. Ledakrin skuteczny jest w leczeniu nowotworów jajnika, którym towarzyszą wysięki, nie wykazuje natomiast działania przeciwbiałaczkowego. Ze względu na swoje niekorzystne działania uboczne i toksyczne, został wycofany z klinik.

Pośród innych hipoksja-selektywnych związków na uwagę zasługują te zawierające *N*-tlenek, np. *N*-tlenkowe pochodne nitrakryny **48** i DACA **49** (Rys. 9). Są one selektywnie bioaktywowane w niedotlenionych komórkach nowotworowych, w wyniku redukcji enzymatycznej grupy *N*-tlenkowej w warunkach beztlenowych, w jedno- lub dwu-elektronowym procesie. *N*-Utlenianie cząsteczki ledakrinu czy DACA, w której trzeciorzędowa grupa aminowa jest przekształcana w *N*-tlenek, maskuje ładunek kationowy łańcucha bocznego, tworząc prolek o słabszym powinowactwie do DNA, mniejszej toksyczności aniżeli odpowiednie aminy (ledakrin i DACA), lepszych właściwościach transportowych w układzie naczyniowym oraz wykazujący znaczny wzrost cytotoksyczności w warunkach beztlenowych [1].



Rysunek 9. Nitracryna **47**, *N*-tlenki nitracryny **48** i DACA-NO **49** oraz C-1748 **50**
 Figure 9. Nitracrine **47**, *N*-oxide nitracrine **48** and DACA-NO **49** or C-1748 **50**

Ze względu na dość wysoką toksyczność ledakrynu, poszukiwano nowych pochodnych 1-nitroakrydyny. Okazało się, że wprowadzenie podstawnika metylowego lub metoksyowego w pozycji 4 pierścienia akrydyny sprawia, że grupa nitrowa staje się mniej podatna na redukcję, co istotnie obniża toksyczność związków i zwiększa ich aktywność przeciwnowotworową, w porównaniu z niepodstawionymi pochodnymi 1-nitroakrydyny. Związek C-1748 **50** (Rys. 9) wykazuje wysoką aktywność przeciwko komórkom raka prostaty i znajduje się w zaawansowanych badaniach *in vivo* [47].

Pirazoloakrydyna (PZA) **51** (Rys. 10) posiada większą selektywność w stosunku do linii komórkowych litych nowotworów, niż do linii komórkowych białaczki, oraz wysoką cytotoksyczność ukierunkowaną na niedotlenione komórki. Związek ten wykazuje aktywność przeciwko opornym na wiele leków liniom komórkowym nerwiaka [48, 49]. PZA aktualnie przechodzi I i II fazę testów klinicznych, w połączeniu z karboplatiną, na pacjentach z litymi nowotworami opornymi na inne leki i cisplatiną u pacjentów z nawracającymi glejakami. Synergizm PZA z lekami przeciwnowotworowymi, takimi jak: doksorubicyna, etopozyd, topotekan powoduje dużą cytotoksyczność w opornych na leczenie komórkach nowotworowych SW-620 i SW620/AD300 [50, 51].

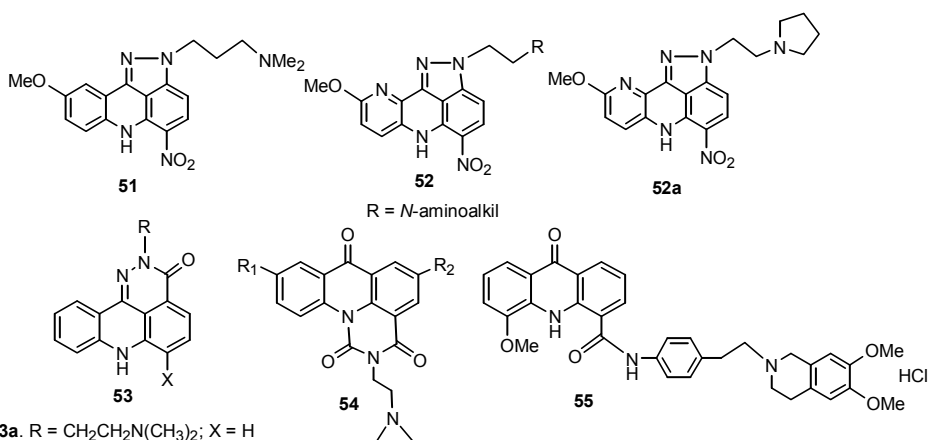
Antonini i in. [52] otrzymali pochodne 10-aza-PZA **52** (Rys. 10), które tak jak PZA wiążą DNA oraz posiadają redukującą się grupę nitrową. Pochodna **52a** ponadto wykazuje aktywność przeciwko linii komórkowej gruczolakoraka prostaty, powodując fragmentację DNA i śmierć komórki.

Bazując na strukturze PZA, zaprojektowano związki, w których pierścień pirazolowy został zastąpiony pierścieniem pirymidynowym. Antonini i in. [53] zsyntetyzowali kilka nowych struktur pirymidoakrydyny. Wszystkie otrzymane związki są aktywne na liniach komórkowych opornych na działanie wielu leków. Modyfikacja

pierścienia pirymidyny prowadzi do powstania pochodnej o aktywności cytotoksycznej porównywalnej z cisplatyną przeciwko sześciu liniom komórkowym, w tym ludzkiego raka okrężnicy (HT29) i raka jajnika [54].

Pirydazyloakrydyna **53** (Rys. 10), pochodna niezawierająca grupy nitrowej, jest bardziej aktywna niż doksorubicyna i mitoksantron, w stosunku do linii komórkowych opornych na leki np. L1210 (komórki mysiej białaczki limfocytowej), K562 (ludzka białaczka erytrocytowa), K562/DX, HL-60 (ludzka białaczka promielocytowa), HL-60/VINC i HL-60/DX [55].

Opierając się na strukturze amonafidu (inhibitor topo II), otrzymano pochodne pirymidoakrydyny **54** (Rys. 10), których biologiczna aktywność przeciw mysiej białaczce P388 jest porównywalna z dobrze znanymi lekami przeciwnowotworowymi (etopozydem i amonafidem) [56].



- 53a.** R = CH₂CH₂N(CH₃)₂; X = H
53b. R = CH₂CH₂CH₂N(CH₃)₂; X = H
53c. R = CH₂CH₂N(CH₂CH₃)₂; X = H
53d. R = CH₂CH₂-c-N(CH₂)₄O; X = H
53e. R = CH₂CH₂-c-N(CH₂)₅; X = H
53f. R = CH₂CH₂CH₂N(CH₃)₂; X = Cl

Rysunek 10. PZA **51** i jej pochodne **52**, pirydazyloakrydyny **53**, pirymidoakrydyny **54** oraz inhibitor P-glikoproteiny GF 120918 **55**

Figure 10. PZA **51** and its derivatives **52**, pyridazinoacridine **53**, pyrimidoacridine **54** and P-glycoprotein inhibitor GF 120918 **55**

5.5. INHIBITORY P-GLIKOPROTEINY (P-gP)

Słabe działanie leków cytostatycznych spowodowane jest między innymi opornością wielolekową (MDR). Znanych jest kilka mechanizmów wykształcania oporności komórek nowotworowych. Największe znaczenie wśród tych mechanizmów ma występowanie w błonie plazmatycznej komórek rakowych specjalnych białek transporterowych, które kosztem energii zgromadzonej w ATP przeciwstawiają się wniknięciu stosowanych leków [57].

Zbadano wpływ modulatorów MDR1 na chemioterapię (cisplatyną i doksorubicyną) czterech linii komórkowych (trzy linie hepatoblastomy HB i jedna linia raka wątrobowokomórkowego HCC). Wśród testowanych modulatorów związek GF 120918 (GG 918, elakridar) **55** (Rys. 10) okazał się najlepszym inhibitorem P-gP w terapii linii komórkowej HCC. Okazało się, że pochodna ta podnosi stężenie docetakselu w mózgu o 59% bez większego wpływu na organizm, co daje podstawy do dalszych badań klinicznych [57, 58].

5.6. KOMPLEKSY PLATYNY Z POCHODNYMI AKRYDYNY

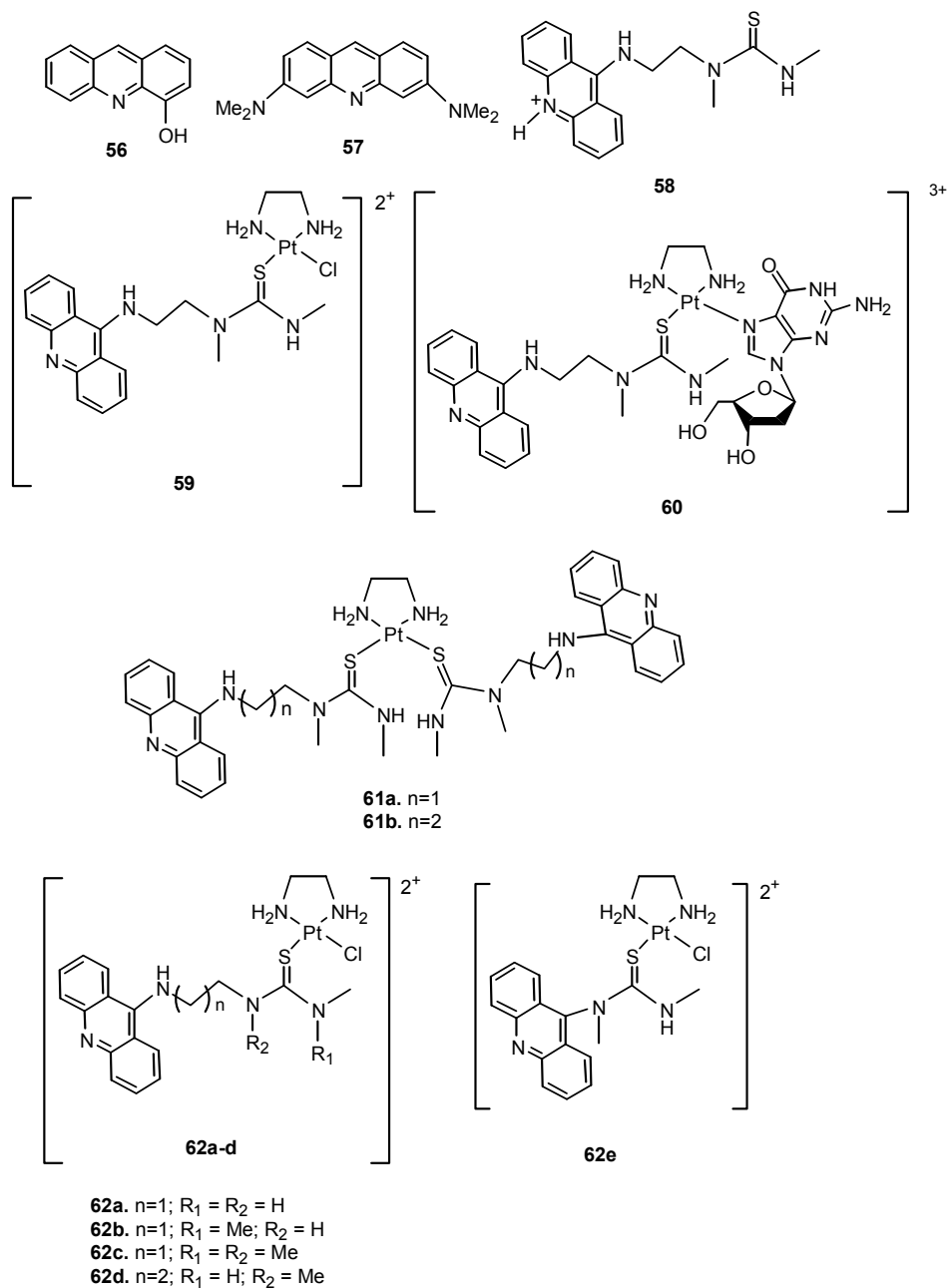
Leki zawierające platynę są od lat 60. XX w. powszechnie stosowane jako leki przeciwnowotworowe. Cisplatyna została zatwierdzona do stosowania przez FDA (Agencja ds. Żywności i Leków) w 1978 roku. Od tego czasu stopień wyleczenia osób z szybko zdiagnozowanym nowotworem jąder był wyższy niż 90%. Cisplatyna jest zdolna do tworzenia różnych typów usieciowania DNA (ang. *cross-links*) poprzez wiązanie do pozycji N7 guaniny i adeniny, co powoduje zahamowanie replikacji DNA. Wadą związków platyny jest ich toksyczność. Reagują one z wieloma biomolekułami, szczególnie z zawierającymi reszty metioninowe i cysteinowe (powoduje to zatrucie nerek). Można ominąć ten problem przyłączając platynę do odpowiedniego nośnika [2].

Otrzymano i scharakteryzowano nowe kompleksy metali przejściowych tj. Ni(II), Pt(II), Pd(II) ze związkami akrydyny [4-hydroksyakrydyna **56**, oranż akrydyny **57** (Rys. 11)]. Analiza rentgenostrukturalna kompleksu Ni(II) z 4-hydroksyakrydynam wykazała połączenie dwóch cząsteczek akrydyny z niklem poprzez atomy tlenu i azotu (podobna struktura możliwa jest dla platyny) [2].

Zespół Bierbacha [2] opisał w 2001 roku nowy typ sprzężenia między akrydynam a platyną, polegający na chelatowaniu platyny poprzez tiomocznik przyłączony do cząsteczki akrydyny ACRAMTU **58** (Rys. 11). Nowy kompleks nazwano PT-ACRAMTU **59** (Rys. 11). PT-ACRAMTU wykazuje większą cytotoksyczność niż ACRAMTU w stosunku do linii komórkowych białaczki HL-60, związek ten posiada także zwiększoną cytotoksyczność, w porównaniu z cisplatyną w komórkach glejaka SNB19 i U87MG.

Modyfikacje struktury PT-ACRAMTU przyczyniły się do powstania nowych pochodnych. Reakcja PT-ACRAMTU z 2'-dezoksyguanozyną (dGuo) zaowocowała związkiem $[\text{Pt}(\text{en})(\text{ACRAMTU})(\text{dGuo})]^{3+}$ **60** (Rys. 11). Oddziaływanie z przypadkową sekwencją DNA powoduje powstanie monofunkcyjnych adduktów guaniny (80%) i adeniny (20%), które łamią paradygmat unikalnego wiązania cisplatyny do guaniny w pozycji N7 [2].

Kompleksy di(akrydyna)platyna (II) **61a** i **61b** (Rys. 11), silnie oddziałują z DNA, prawdopodobnie przez di-interkalację. Przeprowadzone badania pokazały, że związki platyny z bisakrydynami wykazują aktywność w stosunku do komórek glejaka SNB19 i normalnych komórek mózgu (astrocytów szczurów) [2].



Rysunek 11. Kompleksy platyny z pochodnymi akrydyny
Figure 11. Acridine-platinum complexes

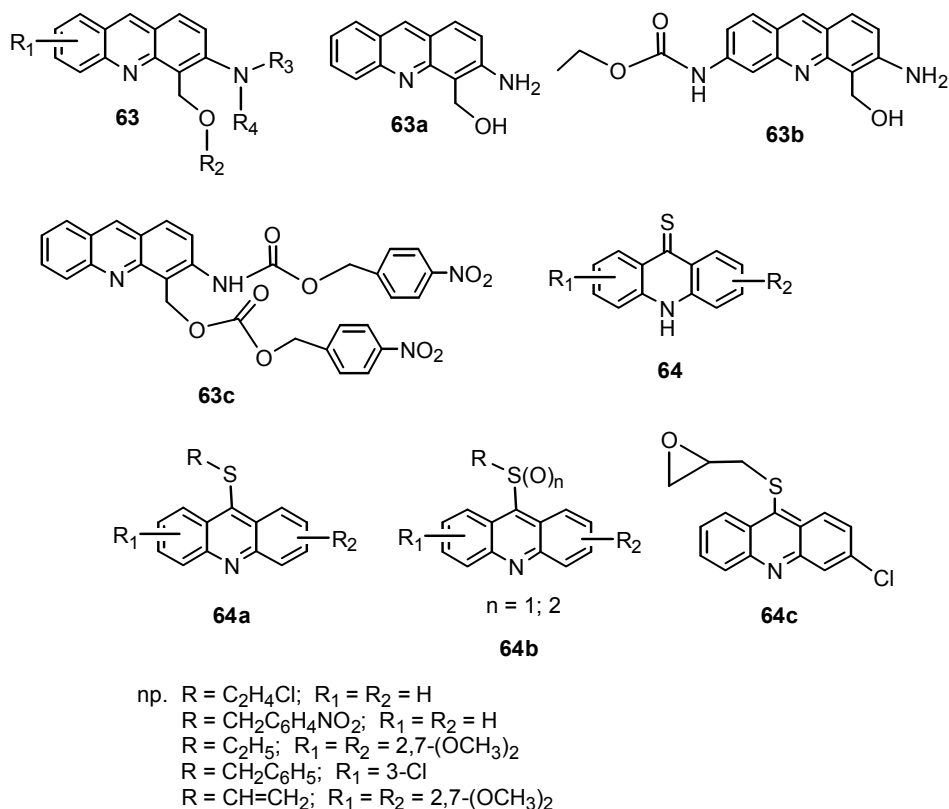
Przy kompleksowaniu z zastosowaniem PtCl₂(en), uzyskano trzy nowe koniugaty platyny **62a–c** (Rys. 11). Związek **62a**, ze względu na swoją niestabilność,

został wykluczony z dalszych badań. Cytotoksyczność dla pochodnych **62b** i **62c** oraz PT ACRAMTU została zbadana na liniach komórkowych nowotworów jajnika (A2780, A2780/CP), płuc (NCI-H460) i okrężnicy (RKO). Związki **62b** i **62c** wykazały aktywność zbliżoną do cisplatyny. Pochodna **62d** z dodatkową grupą metylenową przy tiomoczniku cechuje się podobną aktywnością co PT-ACRAMTU. Związek **62e** z tiomocznikiem przyłączonym do węgla C9 rdzenia akrydyny nie wykazuje aktywności w testowanych liniach komórkowych [2].

5.7. ALKILUJĄCO-INTERKALUJĄCE ZWIĄZKI AKRYDYNY

Pochodne aminoakrydyny

Demeunynck i in. [59] zsyntetyzowali dwadzieścia pochodnych aminoakrydyny, 3-amino- i 3-alkiloamino-4-hydroksymetyloakrydyny **63** (Rys. 12) posiadających różnorodne podstawniki w pierścieniu. Wiele z tych związków wykazuje aktywność cytotoksyczną przeciwko liniom komórkowym białaczki mysiej L1210, ludzkiego nowotworu płuc A549 oraz nowotworu okrężnicy HT29. Związki te reagują z DNA poprzez interkalację. Niektóre z nich mogą wiązać się kowalencyjnie z makromolekułami poprzez wewnątrzcząsteczkową katalizę kwasowo-zasadową. W odróżnieniu od innych analogów przeciwnowotworowych akrydyny, takich jak DACA czy *m*-AMSA, pochodne te nie są inhibitorami topoizomerazy. Najbardziej cytotoksyczne związki **63a** i **63b** są aktywne w nanomolarnym stężeniu i posiadają inny mechanizm działania. Pochodna **63b** jest rozprowadzana równomiernie w komórce zarówno w cytoplazmie, jak i w jądrze, podczas gdy pochodna **63a** jest zlokalizowana głównie w ziarnistościach cytoplazmatycznych, co w tym wypadku wydaje się, że jądrowe DNA nie jest celem. Związek **63a** przekształca się w prolek **63c** poprzez zastąpienie grupy 3-aminowej oraz dodatkowo grupy 4-hydroksymetylenowej, cząsteczką karbaminianu nitrobenzylu [60].



Rysunek 12. Pochodne aminoakrydyny **63** oraz pochodne zawierające siarkę **64**
 Figure 12. Aminoacridine derivatives **63** and derivatives containing sulfur **64**

Pochodne akrydyny zawierające siarkę

Otrzymano siarkowe pochodne 9-akrydyny **64** i **64a,b** (Rys. 12) zawierające różne grupy funkcyjne w łańcuchach bocznych, a ich aktywność została oceniona w ramach programu Narodowego Instytutu Raka (NCI, Bethesda, USA). Badania prowadzono na 60 liniach ludzkich komórek nowotworowych. Związki, które w łańcuchu bocznym zawierały iperyt siarkowy, siarczek epoksydowy i sulfotlenek, były najbardziej aktywne. Ponadto związek **64c** wykazał aktywność w 41 z 60 linii komórkowych [61].

Pochodne 9-anilinoakrydyny

Pośród znanych leków przeciwnowotworowych znajduje się iperyt azotowy $N(CH_2CH_2Cl)_3$, będący analogiem iperytu siarkowego, chemicznego trującego środka

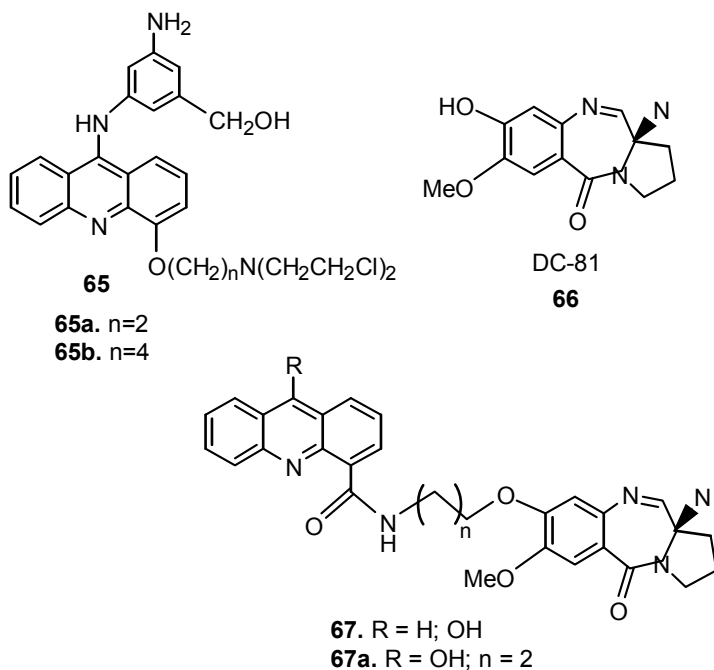
bojowego. Był on pierwszym preparatem zastosowanym do leczenia zmian nowotworowych już w latach 40. XX wieku. Do niedawna stosowano go jeszcze w leczeniu ziarnicy złośliwej. Stał się związkiem macierzystym dla grupy cytostatyków o właściwościach alkilujących, np. cyklofosfamidu czy ifosfamidu. Zsyntetyzowano wiele pochodnych, w których fragment iperytu azotowego został przyłączony do węgla C4 pierścienia akrydyny poprzez grupę *O*-etylową, *O*-propylową lub *O*-butylową. Związki te wykazały cytotoksyczność przeciwko białaczce oraz wielu litym nowotworom *in vitro*. Wiele z tych pochodnych sieciuje DNA bardziej niż inhibitory topo II. Analogi **65a** i **65b** (Rys. 13) okazały się aktywne przeciwnowotworowo w badaniach na myszach, którym przeszczepiono komórki ludzkiego raka piersi MX-1 [62].

Bioaktywne kompleksy akrydyny

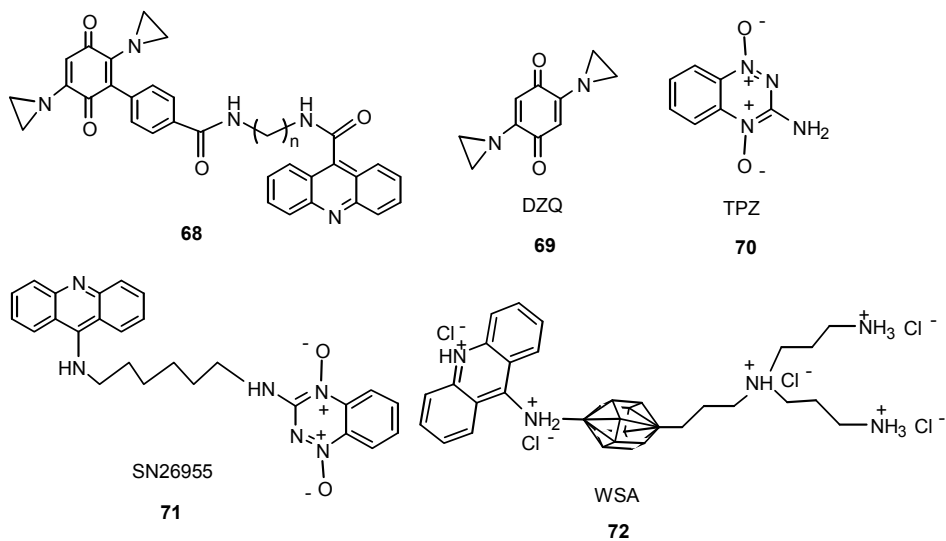
DC-81 **66** (Rys. 13) należy do rodziny pirolo[2,1-*c*][1,4]benzodiazepin, która jest grupą antybiotyków otrzymywanych z bakterii *Streptomyces*, potencjalnie oddziałujących z DNA. Ich interakcja z DNA jest dobrze udokumentowana i unikalna, ponieważ łączą się one z mniejszym rowkiem DNA, tworząc kowalencyjne wiązanie aminowe z grupą N2-aminową guaniny. Hybrydy pirolobenzodiazepinowe **67** (Rys. 13) związku DC-81, przyłączone do węgla C4 pierścienia akrydyny/akrydonu poprzez grupę amidową, wykazują zdolność wiązania DNA oraz biologiczną aktywność. Związek **67a** jest aktywny w stosunku do linii komórkowych raka płuc NCI-H23, czerniaka M14 i UACC-62 oraz nerek A498 [63].

Pochodne **68** otrzymane w wyniku połączenia 2,5-diazyrydylo-benzochinonu (DZQ) **69** (Rys. 14) z 9-karbonyloakrydyną, poprzez grupę polimetylenową ($n = 2-6$), są przykładem kompleksów akrydyny z innymi związkami przeciwnowotworowymi. Ich aktywność została przebadana na kilkunastu liniach komórkowych różnych typów nowotworów, m.in. przewlekłej białaczki szpikowej K562, raka płuc H596 i H460 oraz raka okrężnicy BE i HT29 [64].

W celu udoskonalenia działania przeciwnowotworowego tirapazaminy (TPZ) **70** (Rys. 14), związek ten połączono z 9-aminoakrydyną za pomocą grupy alkilowej. Otrzymano pochodną SN26955 **71** (Rys. 14), która jest związkiem silniej działającym niż TPZ [65].



Rysunek 13. 9-Anilinoakrydyny **65** i bioaktywne kompleksy akrydyny **66**, **67**
 Figure 13. 9-Anilinoacridines **65** and bioactive acridine-conjugate **66**, **67**



Rysunek 14. Struktury **68**, **DZQ** **69**, **TPZ** **70** i **SN26955** **71** oraz borowane akrydyny rozpuszczalne w wodzie (WSA) **72**

Figure 14. Structures **68**, **DZQ** **69**, **TPZ** **70** and water-soluble boronated acridines (WSA) **72**

Borowane akrydyny rozpuszczalne w wodzie (WSA)

WSA **72** (Rys. 14) to związki znaczone, stosowane w terapii borowo-neutronowej (BNCT) (atomy ^{10}B są napromieniowane neutronami termicznymi, co powoduje formowanie się cząstek rozszczepieniowych, toksycznych dla komórek). Związki te są dostarczane do komórek nowotworowych za pomocą stabilizowanych glikolem polietylenowym liposomów epidermalnego czynnika wzrostu (EFG). Ponieważ receptory EFG są nadmiernie wyraziste w wielu komórkach rakowych, czynnik ten stosowany jest jako środek wykrywający nowotwory. WSA jest transportowana głównie do cytoplazmy i posiada długą retencję w komórce (po 48 godzinach zawiera 80% boru) [66].

5.8. BIS-AKRYDINY/AKRYDONY

Diimidzoakrydony

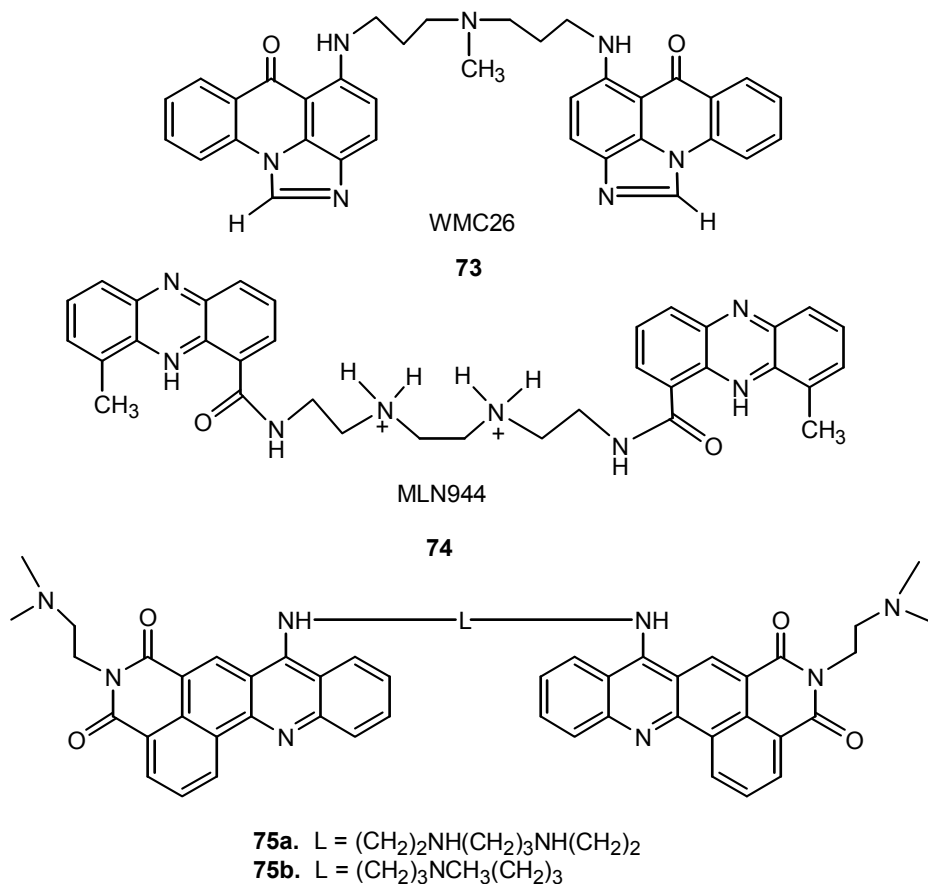
Przeciwnowotworowe diimidzoakrydony (WMC26) **73** (Rys. 15) są dwufunkcyjnymi związkami wiążącymi DNA, które wykazują aktywność cytotoksyczną *in vitro* i *in vivo*, w stosunku do komórek raka okrężnicy. Badania mikroskopem współogniskowym, wykorzystujące fluorescencje chromoforu WMC26, określiły lokalizację tego bisakrydonu w cytoplazmie w przestrzeni okołojądrowej. Stąd przypuszczenia, że celem tych związków jest cytoplazmatyczne DNA. Nieodwracalne magazynowanie się WMC26 powoduje stopniową wakuolizację cytoplazmy i śmierć komórki [67].

Difenazon

Difenazon (MLN944) **74** (Rys. 15) posiada wysoką aktywność przeciwnowotworową *in vitro* i *in vivo* w stosunku do wielu ludzkich i mysich nowotworów. Mechanizm działania tego związku polega na hamowaniu transkrypcji DNA, w przeciwieństwie do jego monomerycznej pochodnej DACA, która jest inhibitorem topozomerazy [68].

Pochodne izochinolino[4,5-*bc*]akrydyny

Spśród zsyntetyzowanych izochinolino[4,5-*bc*]akrydyn, pochodna **75a** (Rys. 15) wykazuje najwyższą aktywność *in vitro* przeciw komórkom raka płuc (A549). Natomiast pochodna **75b** jest aktywna w stosunku do mysiej białaczki (P388) [69].

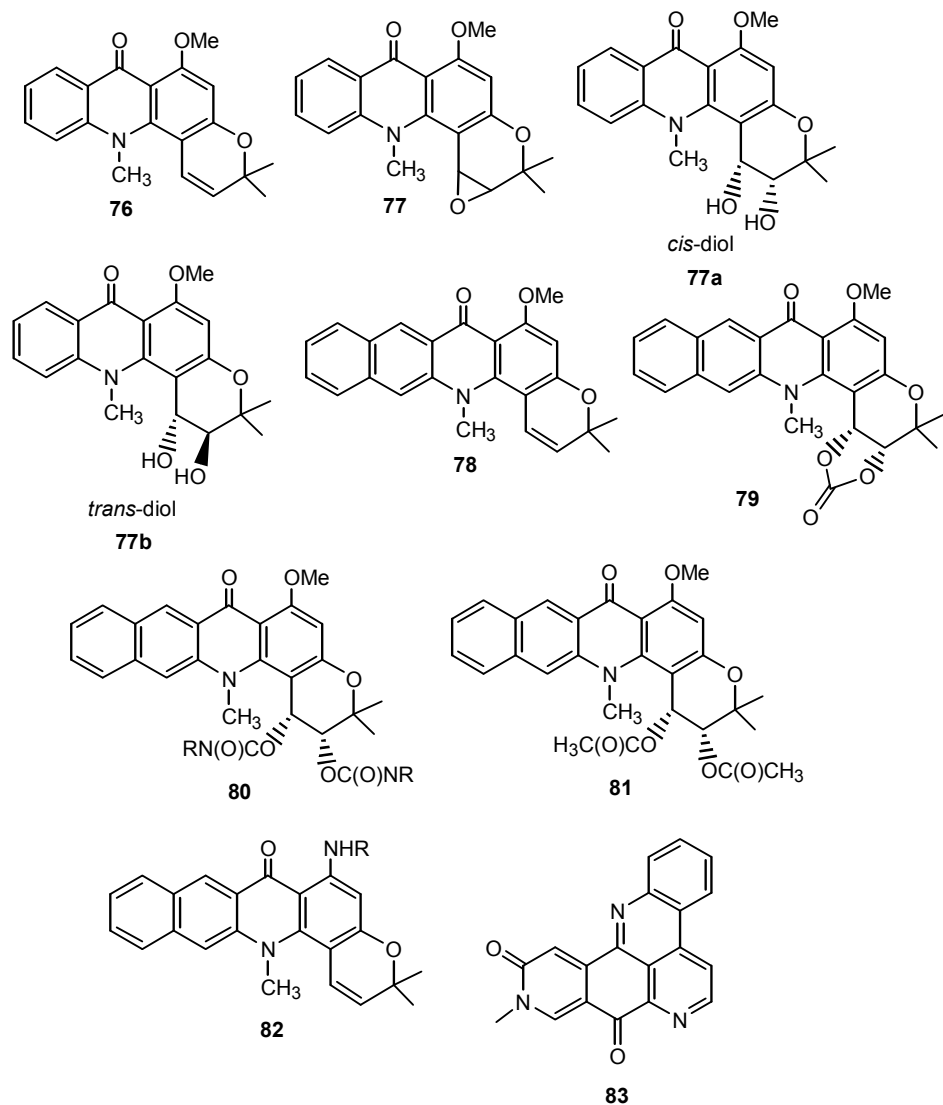


Rysunek 15. Diimidazoakrydony **73**, difenazon **74** i pochodne izochinolino[4,5-*bc*]akrydyny **75**
 Figure 15. Diimidazoacridone **73**, diphenazon **74** and isoquinolino[4,5-*bc*]acridine derivatives **75**

6. ALKALOIDY AKRYDYNOWE I ICH POCHODNE

Akronycyna **76** (Rys. 16) jest naturalnym alkaloidem akrydynowym, wyizolowanym z australijskiego drzewa *Acronychia baueri* (*Rutaceae*) w 1948 roku [70]. Związek ten wykazuje znaczną aktywność przeciwko wielu guzom litym. Jednakże podczas badań klinicznych nie otrzymano zadowalających rezultatów. Związane to było między innymi ze słabą rozpuszczalnością leku w wodzie. Zależność struktura-aktywność pochodnych akronycyny pokazała, że dla zachowania aktywności biologicznej konieczna jest obecność 1,2-podwójnego wiązania zlokalizowanego w pierścieniu dimetylochromenu. Epoksydacja tego wiązania powoduje powstanie niestabilnego epoksydu **77** (Rys. 16), który jest postrzegany jako aktywny metabolit akronycyny *in vivo* i jest odpowiedzialny za wiązanie kowalencyjne z nukleofilowymi czynnikami w komórkach nowotworowych. Te obserwacje doprowadziły do

powstania szeregu bardziej aktywnych diestrowych pochodnych *cis*- i *trans*-1,2-dihydroksy-1,2-dihydroakronycyny **77a,b** [70–72]. Izolacja epoksydu akronycyny z drzewa *Sarcomelicope sp* zapoczątkowała syntezę serii związków o zwiększonej aktywności *in vivo*, w porównaniu z akronycyną. Tillequin i in. [73] zsyntetyzowali szereg 1,2-diestrowych pochodnych akronycyny (Rys. 16), reagujących z nukleofilami w pozycji 1, a badania aktywności potwierdziły słusność założenia.



Rysunek 16. Akronycyna **76** i jej pochodne oraz alkaloidy pirydoakrydynowe **83**

Figure 16. Acronycine **76** and its derivatives or pyridoacridine alkaloids **83**

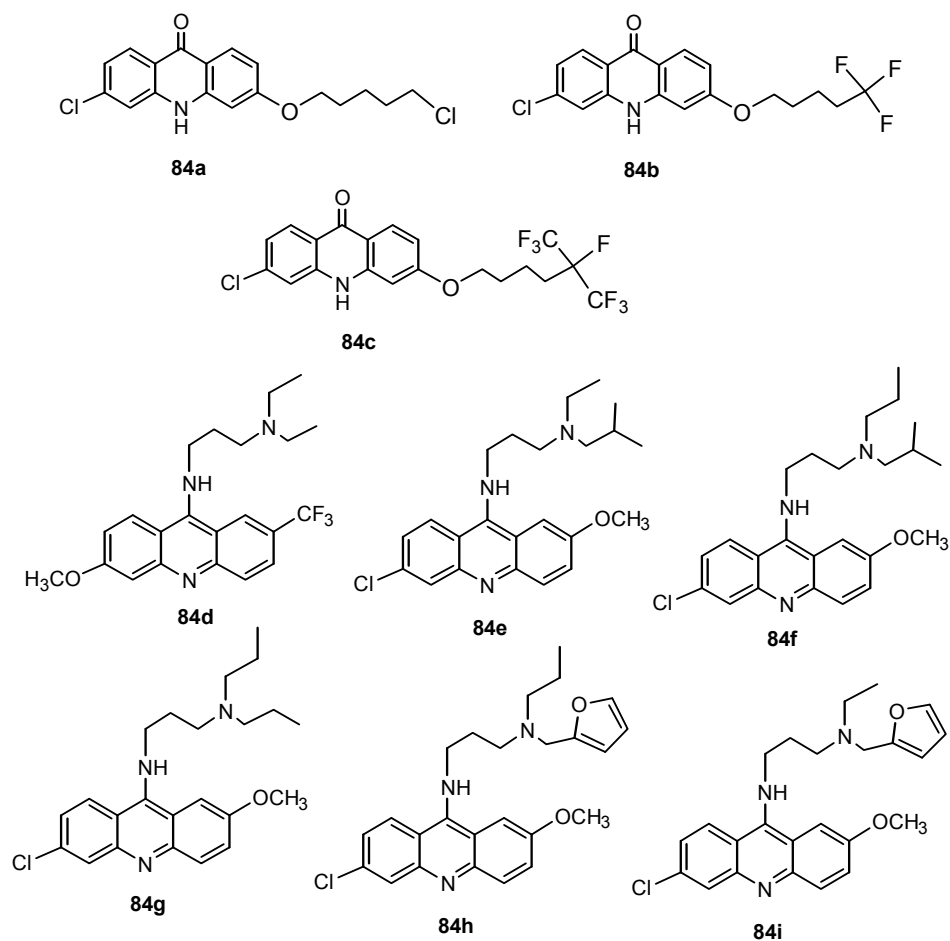
Spośród benzo[*b*]akronocyn szczególnie interesujący wydaje się S23906-1 **81** (Rys. 16), który okazał się wyjątkowo skuteczny wobec komórek białaczki P-388 i nowotworu okrężnicy. Dawka 6,25 mg/kg w 96% hamowała rozwój nowotworu, a 2 z 7 badanych myszy po 43 dniach były zdrowe [74]. Związek ten trafił do badań przedklinicznych.

Z organizmów morskich wyizolowana została rodzina alkaloidów pirydoakrydynowych. Związki te charakteryzuje wyrazista barwa, a ich struktura oparta jest o 11*H*-pirydo[4,3,2-*mn*]akrydynę lub 8*H*-pirydo[4,3,2-*mn*]akrydon. Przykładem jest amfimedyna **83** (Rys. 16), otrzymana z gąbki pacyficznej *Amphimedon sp.* [75].

Dzięki swojej planarnej budowie, pirydoakrydyny zdolne są do interkalacji do DNA. Poza tym ich aromatyczna struktura pozwala na oddziaływanie z enzymami, np. z topoizomerami: ascydemina, displamina, cystodytyna J. Chociaż mechanizm działania tych alkaloidów nie został do końca poznany, ich silna aktywność biologiczna czyni je interesującymi związkami dla naukowców poszukujących cząsteczek o działaniu przeciwnowotworowym.

PODSUMOWANIE

Akrydyny/akrydony stanowią grupę związków o bardzo szerokim spektrum aktywności biologicznej, stosowanych jako leki przeciwbakteryjne, przeciw pasożytnicze, przeciwmalaryczne, anty-HIV oraz przeciwnowotworowe. Obecnie dużym zainteresowaniem cieszą się aminokwasowe i peptydowe analogi akrydyny/akrydonu, które mogą znaleźć zastosowanie w leczeniu chorób opartych na terapii genowej oraz w nowoczesnych metodach diagnostycznych (np. jako fluorescencyjne markery w diagnostyce nowotworowej) [8]. Aktywność przeciwnowotworowa tej grupy związków skierowana jest nie tylko na hamowanie topoizomerazy, enzymu uczestniczącego w prawidłowym procesie replikacji DNA, ale również telomerazy czy kinaz białkowych. Zsyntetyzowano wiele analogów przeciwdziałających oporności wielolekowej (MDR), która powoduje utratę aktywności przeciwnowotworowej większości stosowanych leków o różnej budowie i różnych mechanizmach działania. Należą do nich imidazoakrydony, triazoloakrydony, piryridoakrydyny, pyrazoloakrydony oraz pirydazynoakrydony [76]. Duże nadzieje wiąże się z zastosowaniem pochodnych akrydyny **84a–h** (Rys. 17) w leczeniu malarii [77, 78], tropikalnej choroby pasożytniczej, na którą co roku zachorowuje wiele milionów osób, a umiera 1–3 mln, głównie dzieci poniżej 5 roku życia z Afryki.



Rysunek 17. Pochodne akrydyny o aktywności przeciwmalarycznej [77, 78]

Figure 17. Antimalarial acridine derivatives [77, 78]

Walka z chorobami nowotworowymi oraz zakażeniami bakteryjnymi stanowi poważny problem dla wielu dyscyplin współczesnej nauki. Jest ona żmudna i długotrwała. Synteza nowych analogów akrydyny/akrydonu może przybliżyć nas do otrzymania skutecznych leków pozbawionych szkodliwych działań ubocznych, w tym również oporności wielolekowej.

PODZIĘKOWANIE

Praca powstała w ramach realizacji projektu badawczego N N405 064134 finansowanego przez MNiSzW.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] M. Demeunynck, *Exp. Op. Therap. Patents*, 2004, **14**, 55.
- [2] P. Belmont, J. Bosson, T. Godet, M. Tiano, *Anti-Cancer Med. Chem.*, 2007, **7**, 139.
- [3] a) J. Sebestik, J. Hlavacek, I. Stibor, *Curr. Protein Pept. Sci.*, 2007, **8**, 471.
b) F.M. Logullo, A.H. Seitz, L. Friedman, *Organic Syntheses, Col.*, 1973, **5**, 54.
- [4] W.A. Denny, *Curr. Med. Chem.*, 2002, **9**, 1655.
- [5] M. Demeunynck, F. Charmantray, A. Martelli, *Curr. Pharm. Design*, 2001, **7**, 1703.
- [6] R. Martinez, I. Chacon-Garcia, *Curr. Med. Chem.*, 2005, **12**, 127.
- [7] L. Kelland, *Eur. J. Cancer*, 2005, **41**, 971.
- [8] M. Kukowska-Kaszuba, K. Dzierzbicka, *Curr. Med. Chem.*, 2007, **14**, 3079.
- [9] A. Albert, *The Acridines*, Edward Arnold Publishers, Ltd.: 2nd ed. London, 1966.
- [10] M.A. Ali, S.L. Buchwald, *J. Org. Chem.*, 2000, **66**, 2560.
- [11] P. Belmont, J-Ch. Andrez, Ch.S.M Allan, *Tetrahedron Lett.*, 2004, **45**, 2783.
- [12] A. Patin, P. Belmont, *Synthesis-Stuttgart*, 2005, **14**, 2400.
- [13] O. Tabarrini, G. Manfroni, A. Fravolini, *J. Med. Chem.*, 2006, **49**, 2621.
- [14] S.R. Kirk, N.W. Luedtke, Y. Tor, *J. Am. Chem. Soc.* 2000, **122**, 980.
- [15] R. Nishio, S. Wessely, M. Sugiura, S. Kobayashi, *J. Comb. Chem.*, 2006, **8**, 459.
- [16] M.I. Rodriguez-Franco, M.I. Fernandez-Bachiller, C. Perez, B. Hernandez-Ledesema, B. Bartolome, *J. Med. Chem.*, 2006, **49**, 459.
- [17] A. Szymanska, W. Wiczl, L. Lankiewicz, *Chem. Heterocycl. Comp.*, 2000, **7**, 801.
- [18] W.A. Denny, *Anti-Cancer Drug Design*, 1989, **4**, 241.
- [19] W.A. Denny, *Med. Chem. Rev.*, 2004, **1**, 257.
- [20] G.J. Finlay, G.J. Atwell, B.C. Baguley, *Oncology Res.*, 1999, **11**, 249.
- [21] I. Chourpa, M. J. Manfait, *Raman Spect.*, 1995, **26**, 813.
- [22] I. Chourpa, H. Morjani, J.-F. Riou, M. J. Manfait, *FEBS Letters*, 1996, **397**, 61.
- [23] J. Blasiak, E. Gloc, J. Drzewoski, K. Woznak, M. Zadrozny, T. Skorski, T. Pertynski, *Mutat. Res.*, 2003, **535**, 25.
- [24] T.L. Su, T.C. Chou, J.Y. Kim, J.T. Huang, G. Ciszewska, W.Y. Ren, G.M. Otter, F.M. Sirotnak, *J. Chem.*, 1995, **38**, 3226.
- [25] J.Y. Chang, C.F. Lin, W.Y. Pan, V. Bacherikov, T.C. Chou, C.H. Chen H. Dong, S.Y. Cheng, T.J. Tasi, Y.W. Lin, K.T. Chen, L.T. Chen, T.L. Su, *Bioorg. Med. Chem.*, 2003, **1**, 4959.
- [26] V.A. Bacherikov, J.Y. Chang, Y.W. Lin, C.H. Chen, W.Y. Pan, H. Dong, R.Z. Lee, T.C. Chou, T.L. Su, *Bioorg. Med. Chem.*, 2005, **13**, 6513.
- [27] W.A. Denny, B.C. Baguley, *Curr. Top. Med. Chem.*, 2003, **3**, 339.
- [28] A.K. Todd, A. Adams, J.H. Thorpe, W.A. Denny, C.J. Cardin, *J. Chem.*, 1999, **42**, 536.
- [29] A. Adams, J.M. Guss, W.A. Denny, L.P.G. Wakelin, *Nucleic Acids Res.*, 2002, **30**, 719.
- [30] J. Wesierska-Gadek, D. Schloffer, M. Gueorguieva, M. Uhl, A. Skladanowski, *Cancer Res.*, 2004, **64**, 4487.
- [31] K. Lemke, M. Wojciechowski, W. Laine, C. Bailly, P. Colson, M. Baginski, K. Larsen Annette, A. Skladanowski, *Nucleic Acids Res.*, 2005, **33**, 6034.
- [32] M.W. Cholody, S. Martelli, J. Lukowicz, J. Konopa, *J. Med. Chem.*, 1990, **33**, 49.
- [33] Z. Mazerska, P. Sowinski, J. Konopa, *Biochem. Pharmacol.*, 2003, **66**, 1727.
- [34] J.M. Berg, J.L. Tymoczenko, L. Stryer, *Biochemia*, PWN, Warszawa 2005.
- [35] R.J. Harrison, S.M. Gowan, L.R. Kelland, S. Neidle, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1999, **9**, 2463.
- [36] M.A. Read, A.A. Wood, R.J. Harrison, S.M. Gowan, L.R. Kelland, H.S. Dosanjh, S. Neidle, *J. Med. Chem.*, 1999, **42**, 4538.
- [37] A. Levitzki, *Acc. Chem. Res.*, 2003, **36**, 462.

- [38] J. Dumas, *Expert Opin. Ther. Pat.*, 2001, **11**, 405.
- [39] E. Verdaguier, E.G. Jorda, A. Stranges, A.M. Canudas, A. Jimenez, F.X. Sureda, M. Pallas, A. Camins, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2003, **120**, 599.
- [40] Y. Otsuka, T. Tanaka, D. Uchida, Y. Noguchi, N. Saeki, Y. Saito, I. Tatsuno, *Neurosci. Lett.*, 2004, **365**, 180.
- [41] Y.A. Hannun, R. M. Bell, *Biol. Chem.*, 1988, **263**, 5319.
- [42] W.A. Denny, *Cancer Invest.*, 2004, **22**, 604.
- [43] J.H. Tocher, *Gen. Pharmac.*, 1997, **28**, 485.
- [44] M. Jaffar, K.J. Williams, I.J. Stratford, *Adv. Drug Deliver. Rev.*, 2001, **53**, 217.
- [45] Z. Zhang, K. Tanabe, H. Hatta, S.-I. Nishimoto, *Org. Biomol. Chem.*, 2005, **3**, 1905.
- [46] a) M. Gniazdowski, L. Szmigiero, *Gen. Pharmac.*, 1995, **26**, 473.
b) K. Gorlewska, Z. Mazerska, P. Sowiński, J. Konopa, *Chem. Res. Toxicol.*, 2001, **14**, 1.
- [47] R. Narayanan, P. Tiwari, D. Inoa, B. T. Ashok, *Life Sci.*, 2005, **77**, 2312.
- [48] J.M. Reid, D.L. Walker, J.K. Miller, L.M. Benson, A.J. Tomlinson, S. Naylor, A.L. Blajeski, P.M. LoRusso, M.M. Ames, *Clin. Cancer Res.*, 2004, **10**, 1471.
- [49] N. Keshelava, D. Tsao-Wei, C.P. Reynolds, *Clin. Cancer Res.*, 2003, **9**, 3492.
- [50] E. Galanis, J.C. Buckner, M.J. Maurer, J.M. Reid, M.J. Kuffel, M.M. Ames, B.W. Scheithauer, J.E. Hammack, G. Pupoly, S.A. Kuross, *Invest. New Drug*, 2005, **2**, 495.
- [51] Y. Hu, A. Krishan, W. Nie, K.S. Sridhar, L.D. Mayer, M. Bally, *Clin. Cancer Res.*, 2004, **10**, 1160.
- [52] A. Magnano, S. Sparapani, R. Lucciarini, M. Michela, C. Amantini, G. Santoni, I. Antonini, *Bioorg. Med. Chem.*, 2004, **12**, 5941.
- [53] I. Antonini, *Med. Chem. Rev.*, 2004, **1**, 267.
- [54] I. Antonini, P. Polucci, A. Magnano, D. Cacciamani, M. T. Konieczny, J. Paradziej-Lukowicz, S. Martelli, *Bioorg. Med. Chem.*, 2003, **11**, 399.
- [55] B. Stefanska, M.M. Bontemps-Gracz, I. Antonini, S. Martelli, M. Arciemiuik, A. Piwkowska, D. Rogacka, E. Borowski, *Bioorg. Med. Chem.*, 2005, **13**, 1969.
- [56] J. Kamata, T. Okada, Y. Kotake, J. Nijjima, K. Nakamura, T. Uenaka, A. Yamaguchi, K. Tsukahara, T. Nagasu, N. Koyanagi, K. Kitoh, K. Yoshimatsu, H. Yoshino, H. Sugumi, *Chem. Pharm. Bull.*, 2004, **52**, 1071.
- [57] S. Warmann, G. Gohring, B. Teichmann, H. Geerlings, T. Pietsch, J. Fuchs, *Anticancer. Res.*, 2003, **23**, 4607.
- [58] E.M. Kemper, M. Verheij, W. Boogerd, J.H. Beijnen, O. van Tellingen, *Eur. J. Cancer*, 2004, **40**, 1269.
- [59] F. Charmantray, M. Demeunynck, D. Carrez, A. Croisy, A. Lansiaux, C. Bailly, P. Colson, *J. Med. Chem.*, 2003, **46**, 967.
- [60] C. Asche, P. Dumy, D. Carrez, A. Croisy, M. Demeunynck, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2006, **16**, 1990.
- [61] C. Santelli-Rouvier, J.M. Barret, C.M. Farrell, D. Sharples, B.T. Hill, J. Barbe, *Eur. J. Med. Chem.*, 2004, **38**, 1029.
- [62] T.L. Su, Y.W. Lin, T.C. Chou, X. Zhang, V.A. Bacherikov, C.H. Chen, L.F. Liu, T.J. Tsai, *J. Med. Chem.*, 2006, **49**, 3710.
- [63] A. Kamal, O. Srinivas, P. Ramulu, G. Ramesh, P.P. Kumar, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2004, **14**, 4107.
- [64] A.M. Di Francesco, S.P. Mayalarp, S. Kim, J. Butler, M. Lee, *Anticancer Drug*, 2003, **14**, 601.
- [65] Y.M. Delahoussaye, M.P. Hay, W.A. Denny, *Biochem. Pharmacol.*, 2003, **65**, 1807.
- [66] E.B. Kullberg, M. Nestor, L. Gedda, *Pharm. Res.*, 2003, **20**, 229.
- [67] L. Hernandez, W.M. Cholody, E.A. Hudson, J.H. Resau, G. Pauly, C.J. Michejda, *Cancer Res.*, 1995, **55**, 2338.

- [68] J. Dai, C. Punchihewa, P. Mistry, *J. Biol. Chem.*, 2004, **279**, 46096.
- [69] P. Yang, Q. Yang, X. Qian, *Tetrahedron*, 2005, **61**, 11895.
- [70] S. Michael, T. Gaslonde, F. Tillequin, *Eur. J. Med. Chem.*, 2004, **39**, 649.
- [71] F. Tillequin, *Phytochemistry Rev.*, 2003, **1**, 355.
- [72] F. Tillequin, M. Koch, *Ann. Pharm. Fr.*, 2005, **63**, 35.
- [73] N. Guilbaud, S. Leonce, F. Tillequin, *Anticancer Drugs*, 2002, **13**, 445.
- [74] N. Costes, H. Le Deit, S. Michel, F. Tillequin, M. Koch, B. Pfeiffer, P. Renard, S. Leonce, N. Guilbaud, L. Kraus-Berthier, A. Pierre, G. Atassi, *J. Med. Chem.*, 2000, **43**, 2395.
- [75] E. Delfourne, J. Bastide, *Med. Res. Rev.*, 2003, **23**, 234.
- [76] E. Borowski, M.M. Bontemps-Gracz, A. Piwkowska, *Acta Biochim. Polon.*, 2005, **52**, 609.
- [77] R.W. Winter, J.X. Kelly, M.J. Smilkstein, R. Dodean, G.C. Bagby, R.K. Rathbun, J.I. Levin, D. Hinrichs, M.K. Riscoe, *Exp. Parasitol.*, 2006, **114**, 47.
- [78] M.O. Anderson, J. Sherrill, P.B. Madrid, A.P. Liou, J.L. Weisman, J.L. DeRisi, K. Guy, *Bioorg. Med. Chem.*, 2006, **14**, 334.

Praca wpłynęła do Redacji 29 sierpnia 2008

FELIETON NAUKOWY



OKRUCHY IX. MACIEJ

Ignacy Z. Siemion

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



Ignacy Z. Siemion, urodzony w 1932 r., ukończył studia chemiczne na Uniwersytecie Moskiewskim w 1955 r. Doktorat nauk technicznych na Politechnice Wrocławskiej – 1964. Doktor habilitowany nauk chemicznych – 1968. Profesor nadzwyczajny – 1974, profesor zwyczajny – 1981. Był kierownikiem Zakładu Chemii Organicznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego. Własne zainteresowania badawcze: chemia i stereochemia peptydów i białek. Wypromował 23 doktorów chemii, z których trzech się habilitowało. Autor 8 książek, 275 prac oryginalnych i ponad 120 artykułów przeglądowych oraz dotyczących

historii nauki. W latach 1983–1994 Redaktor Naczelny „Wiadomości Chemicznych”. Obecnie opiekun Gabinetu Historii Chemii Wydziału Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego.



W dniu 4 listopada 2008 roku odbyła się w Poznaniu uroczystość odsłonięcia tablicy pamiątkowej, ufundowanej na 90 rocznicę urodzin twórcy Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu, profesora Macieja Wiewiórowskiego, który zmarł 30 marca 2005 roku. Tablicę umieszczono w hallu budynku Instytutu. Uroczystość otworzył i prowadził profesor UAM w Poznaniu, Wiesław Z. Antkowiak. Organizatorzy uroczystości poprosili mnie, bym przy tej okazji opowiedział zebrany o swojej wieloletniej i bliskiej z profesorem Wiewiórowskim przyjaźni. W poniższym tekście starałem się odtworzyć treść swego wystąpienia, w małym tylko stopniu uzupełniając go niewielkimi dodatkami.

Maciej Wiewiórowski urodził się 24 sierpnia 1918 roku w rodzinie o tradycjach wolnościowych. Jego ojciec, z zawodu leśnik (nadleśniczy), był współorganizatorem Powstania Wielkopolskiego. Był odznaczony Krzyżem Walecznych i Krzyżem Virtuti Militari. Padł w 1919 roku w Powstaniu. Maciej pozostał wierny tej tradycji. Jako ochotnik wziął udział w Kampanii Wrześniowej. Przebywając podczas okupacji niemieckiej na terenie Generalnego Gubernatorstwa ukończył podziemną Szkołę Podchorążych i został skierowany do oddziału partyzanckiego „Wilki” na Podhalu. Był tam dowódcą plutonu. Latem 1944 roku oddział wszedł w skład I Pułku Strzelców Podhalańskich AK. Musiało to być ciekawe doświadczenie: Rodowity

Poznaniak na czele plutonu podhalańskich juhasów. Ale podkomendni chyba polubili swego dowódcę. Kiedyś, podczas naszej wspólnej pieszej wędrówki w Karkonoszach, wspominał Maciej, jak mu podkomendni mówili: „Najważniejsze to dobre buty, panie podchorąży. Bo jak óne zacną nóżki w casie marsu....., to nie daj Boże”. Tak się nie mówi do nie lubianych dowódców.

W początkach mojej z Maciejem znajomości moja żona dziwiła się nieco, że tak doskonale się rozumiemy. – Skąd to się bierze – mówiła – przecież profesor nie był chyba partyzantem? – Dlaczego – odparłem – był przecież dowódcą plutonu dywersyjnego na Podhalu. – To już nic nie mów – powiedziała wtedy – to wszystko już zrozumiałe.

Byłem od Macieja przeszło dziesięć lat młodszy. A przecież należeliśmy do tego samego pokolenia: pokolenia wojny. Moje losy tak się ułożyły, że bardzo szybko musiałem wydorosnąć. Z pacholeństwa przejść od razu do dorosłości. W naszej licznej, męskiej rodzinie, starsi bracia tkwili głęboko w wojskowych pracach konspiracyjnych. Rozumiałem ich dobrze i oni mnie rozumieli. I tak już zostało. Łatwo nawiązywałem przyjaźnie ze starszymi od siebie. Znacznie trudniej z młodszymi.



Fot. 2. Tablica poświęcona pamięci profesora Macieja Wiewiórowskiego

Zacznę tu od osobistego wspomnienia. W kwietniu 1943 roku zginął w starciu z patrolem żandarmerii niemieckiej jeden z moich starszych braci. Bardzo przeżyłem tę śmierć. I oto, po kilku latach, jestem w liceum w Lublinie. Idąc ulicą widzę wielki afisz: „Wystawa zoologiczna”. Był to czas kiedy interesowały mnie łusko-skrzydłe. Zaszedłem zobaczyć, czy coś tam z nich mają. Duża, pusta sala. Tylko w jednym kącie, przy stoliku z księgą gości, młody jeszcze człowiek. Dyżurny asystent. Wpisałem się do książki i ruszyłem wzdłuż ściany. Niezadługo on ruszył za mną. – Pan jest Siemion? – pyta. – Tak – odpowiadam. – A może Sławka brat? – Też odpowiadam twierdząco. – Panie, mówi mój nieznajomy – przecież my byliśmy w liceum największymi przyjaciółmi. I zaczęła się bezwładna rozmowa, która szybko przyjęła poufale formy, co nas obydwu nie zdziwiło. W końcu żegnamy się. I wtedy on mówi: Popatrz, Sławek zginął, a my obaj żyjemy. Tylu chłopaków padło. To my obaj, widzisz, tak teraz musimy pracować, żeby w naszej pracy i oni, i Sławek, mogli się zrealizować.

Był to wymóg, więcej, był to nakaz pokolenia wobec tych co przeżyli. Tego nakazu był w pełni świadomy także i Maciej. I kiedy dziś patrzymy na dokonania Macieja, nie sposób nie przyznać, że nakaz ten wypełnił on bodaj w dwójnasób. Największym jego dokonaniem było powołanie do istnienia poznańskiego Instytutu Chemii Bioorganicznej. Podziwiać trzeba konsekwencję, dalekowzroczność i skuteczność działań, jakie w tym celu podjął. Zaczynał od małego zespołu. Ten przekształcił się z biegiem lat w Zakład. Zakład z latami obrastał w podzespoły, wyspecjalizowane laboratoria. Aż wszyscy już wiedzieli, że najwyższa pora przekształcić tę budowę w Instytut. Równocześnie powstawała materialna baza Instytutu. Zaczynał Maciej od opuszczonego baraku i dwóch nieprzystosowanych do przedsięwziętego celu willi. Co jest dzisiaj, wszyscy widzimy. Stworzenie od podstaw Instytutu to przykład realizacji doskonałego, przemyślanego planu, przykład skutecznej pracy.

W pracach tych pomagały Maciejowi trzy cechy dobrego kierownika, którymi dysponował. Pierwszą był dar dobrego doboru współpracowników. Z grona młodych wychowanków Macieja, których do tych prac przysposobił, wyrósł aktualny kolektyw kierowniczy Instytutu. Okazali się doskonale dobrani. Drugą, może ważniejszą cechą Macieja, jako kierownika prac, była rzadka umiejętność pozostawiania młodym współpracownikom swobody dojrzwania, zdobywania własnych doświadczeń i samodzielnej pozycji. Był mistrzem, który patronował samowyzwoleniu wychowanków. Trzecią zaś cechą była Jego odwaga badawcza i organizacyjna. Kiedy przystępował do budowy przyszłego Instytutu, był już uznanym badaczem na polu chemii alkaloidów, a zwłaszcza związków grupy sparteiny. Przecież to właśnie te badania otwały mu drogę do Polskiej Akademii Nauk. Tematykę tę zamknął i wszedł na pole dla siebie zupełnie nowe: na pole chemii kwasów nukleinowych. Trzeba znacznej odwagi, by tak postąpić. Na ogół żałujemy utraty posiadanych już doświadczeń. Chronimy je, zachowując tematykę badań.

Profesor Wiewiórowski był chemikiem-organikiem. Działania badawcze w chemii kwasów nukleinowych ustawił więc na organiczno-chemiczny kierunek, na opanowanie w pierwszym rzędzie metod syntezy fragmentów kwasów deoksyrybonukleinowych i rybonukleinowych. Jego zespół nadspodziewanie szybko opanował tę sztukę, a co więcej, wniósł do niej szereg własnych metod, niektóre z nich zdobyły powszechne uznanie i wzięcie. Sam profesor patronował pracy nad ambitnym dla swojego czasu zadaniem syntezy supermodyfikowanej pętli antykodonowej jednego z transferowych kwasów rybonukleinowych. Wyniki tej pracy stały się centralnym bodaj punktem wniosku o Nagrodę Państwową, którą Maciej wtedy uzyskał.

Muszę tu powiedzieć, że i ja sam, na samym sobie, doznałem w tamtych latach czegoś, co mogę nazwać opiekuńczą odwagą Macieja. Pewne moje uboczne zainteresowania skierowały mnie w stronę chemii kodu genetycznego. Zaczęło się od próby sprawdzenia, jak w tabeli kodu zlokalizowana jest taka cecha kodowanych aminokwasów, jak ich smak: słodki bądź gorzki. Uzyskaliśmy ciekawy, symetryczny obraz kodowania tej cechy. Wyniki te pokazałem po raz pierwszy w Poznaniu, na jakiejś konferencji. Nie wywołały one entuzjazmu, raczej rodzaj niedowierzania. Przypadkowo zaobserwowałem taką scenę: przed naszym plakatem stoi dwóch młodych ludzi i jeden mówi do drugiego: jak też takie rzeczy ludziom przychodzą do głowy! I w tym, co mówili, nie było podziwu, raczej powątpiewanie co do jakości tej głowy.

Maciej okazał mi wtedy skuteczną pomoc. Wsparł nasze poczynania własnym nazwiskiem. Końcowy wynik tego studium opublikowaliśmy razem w Biuletynie Polskiej Akademii Nauk. Było to wtedy dla mnie bardzo pomocne wsparcie. Profesor Barciszewski opowiedział mi po iluś tam latach, że profesor, żartem oczywiście, radził mu, by publikacji tej nauczył się na pamięć. Było to, jak rozumiałem, uznanie dla nowych pomysłów, dla szukania nowych ścieżek. Mnie zaś profesor wtedy mówił: Ty nie masz pojęcia, jak ja lubię takie naukowe spekulacje! W słowie „spekulacje” nie było, rzecz jasna, dezaprobaty, raczej znów uznanie dla jakiejś tam oryginalności pomysłu.

Tematyka ta rozwijała się u nas i dalej. W końcu uzyskaliśmy ciekawy, jak sadzę, wynik. Obraz periodyczności w kodowaniu ważnych cech strukturalnych aminokwasów w kodzie kołowo zamkniętym przez nabór regularnych jednopunktowych mutacji w ich kodonach. Ten obraz też nie mógł spotkać się z powszechną aprobatą. Maciej stworzył nam możliwość publicznej prezentacji tego wyniku. Przedstawialiśmy go kilka razy tutaj, w Poznaniu, a także na plenarnym posiedzeniu III Wydziału PAN, co oczywiście zawdzięczałem Maciejowi. Prezentacje te nie wywołały większej dyskusji, ale zdawałem sobie sprawę z tego, że w kuluarach musiały one być omawiane, i to nie koniecznie w duchu aprobaty. Kiedyś zagadnąłem o to Macieja. – Gdybyś ty wiedział – powiedział wtedy – co też niektórzy ludzie na ten temat plotą. Ale nie będziesz wiedział. Bo ja ci o tym nie powiem. I to był cały Maciej. Wolał, abym dalej spokojnie mógł drażyć te sprawy. Osłonił mnie przed ogniem krytycznych opinii, których sam nie podzielał.

Do bliskich przyjaciół Macieja należał pracujący w Getyndze niemiecki bioorganik, profesor Friedrich Cramer. I on należał do pokolenia wojny, tyle że swoje doświadczenia zbierał po drugiej strony frontu. Pod koniec swojego życia wydał Cramer dwa tomy z lekka zbeletryzowanej autobiografii. Drugi jej tom nosi tytuł: „Wie Hiob leben”. W tym tomie pojawia się postać Macieja. Było to w czasie stanu wojennego. Cramer chciał osobiście przekonać się, jak wygląda w stanie wojennym kondycja psychiczna polskich środowisk naukowych. Jego decyzję wyjazdu do Polski koledzy w Getyndze kwitowali wieloznacznym pukaniem się w czoło. – Czy ty wiesz – mówili – co cię tam może spotkać? A może twoja podróż zakończy się gdzieś za Uralem? Mimo to Cramer pojechał. Był to początek stycznia 1982 roku. Pociąg przyjechał do Poznania z dwugodzinnym opóźnieniem. Było w nim zresztą tylko dwóch podróżnych. Mimo to na poznańskim dworcu czekała na Cramera grupa pracowników Instytutu, z Maciejem na czele. Cramer przedstawia Macieja jako „dżentelmena starej szkoły”. „Jego białe wąsy nad górną wargą – pisze – srebrzył się w świetle jedynej lampy łukowej.” Cramer pytał z niepokojem Macieja, co dalej będzie. Bo przecież sytuacja jest nadal niepewna. A może mimo wszystko Rosjanie wejdą? Co wtedy?” – Wtedy – powiedział mu Maciej – pójdę do lasu. Już raz poszedłem czterdzieści lat temu, przeciwko wam. Pójdę jeszcze raz. Zresztą, muszę ci powiedzieć, że jesteśmy do tego całkowicie już przygotowani. – Wszystko zostało przygotowane. Mniejsza o to, jak dużo było w tej wypowiedzi młodzieńczej zgoła fanfaronady. Ale można sobie wyobrazić, jak ta wypowiedź poraziła Niemca. Spodziewał się nastrojów frustracji i stanu psychicznej depresji. Napotkał spokojne oczekiwanie.

Poznań czymś jeszcze zadziwił wtedy Cramera. Chciał on wystąpić tam z wykładem naukowym. A tu przykrość – według reguł stanu wojennego, wolno zgromadzić w jednym miejscu tylko co najwyżej dziesięciu uczestników jakiegokolwiek zebrania. I wtedy Poznaniacy zorganizowali wykład w kilku radiofonizowanych salach. W każdej sali dziesięciu słuchaczy. Był to znakomity sposób obejścia wymogów wojennego stanu. Nie wiem, czy to Maciej był autorem tego pomysłu. W każdym razie odpowiadał za jego realizację, jako dyrektor Instytutu.

Przez trudne lata osiemdziesiąte przeszedł Instytut bez szwanku. Rozwijał się nawet nadal. W tych przecież latach utworzono pracownie krystalografii biopolimerów i rozpoczęto prace nad patologiami genotypu ludzkiego. Dokonania te dobitnie świadczyły, że Instytut zajął wyraziste miejsce na światowej mapie nauki. Maciej, poczynszy od 1982 roku, przejawiał postawę, można by rzec, koncyliacyjną. Uważał, że najgorzej trwać w klinczu. Szukał możliwości porozumienia. W lutym 1987 roku wystąpił z rodzajem politycznego memoriału do władz. Przysłał mi tekst tego memoriału. Perswadował tam, że w interesie ogółu i samej „władzy” leży, by ta ostatnia podzieliła się swoimi prerogatywami ze społeczeństwem. Żeby uznała wolne związki zawodowe. Żeby w środowisku naukowym postawiła na swoich przedstawicieli dysponujących własnym autorytetem naukowym. Żeby, jednym słowem, posunęła się na zajmowanej ławce, robiąc miejsce dla „reszty społeczeństwa”. Można powiedzieć, że treść memoriału znamionowała pewien polityczny idealizm. Bo, jak dobrze wiemy, żadna władza nie ustępuje miejsca, bez wyraźnej konieczności. Ale, co może zadziwić, dalsze lata przyniosły rozwiązanie dokładnie odtwarzające wyrażone przez Macieja idee. Więc w końcu „na Jego wyszło”?

Powiedzmy sobie tutaj, że postawa Macieja w tamtych latach była typowa dla ludzi pokolenia wojny. Widzieli oni wokół siebie tyle śmierci, tyle zgłiszcz i ruin, że wytworzył się w nich zrozumiały odruch chronienia wszystkiego, co się da. Chronienia tych resztek, co ocalały z pogromu. Chronienia tego, co się dało odbudować. Chronienia wreszcie tego nowego, co się udało zbudować. Bez uwzględnienia tego czynnika nie można zrozumieć postaw i działań ludzi pokolenia wojny w latach poważnych przełomów.

W tych osiemdziesiątych latach po raz kolejny zmienił Maciej kierunek swoich poszukiwań badawczych. Jego wychowankowie, teraz szefowie samodzielnych zespołów, rozwijający własne pomysły badawcze i kształcący własnych uczniów, szli samodzielnymi drogami. Szukał więc Maciej nowego pola działania i znalazł w czymś, co nazwał „inżynierią krystaliczną”. Oponowałem trochę przeciwko tej nazwie. Wydawało mi się, że lepiej by użyć prostego zwrotu: inżynieria kryształów. Ale być może ta „krystaliczność” dodawała pomysłom Macieja pewnego, potrzebnego mu dla całej sprawy, blasku. Chodziło w tych badaniach o określenie preferencji konformacyjnych, jakie wykazują składowe kwasów nukleinowych w siatce krystalicznej ich kryształów. Na tym nowym dla siebie polu uzyskał Maciej istotne wyniki. Pokazał, że w kryształach nukleotydów uprzywilejowane są układy helikalne cząsteczek. Badania te prowadził wspólnie ze swoją Małżonką, Danutą.

Kiedy idziemy własną ścieżką przez życie, wielokrotnie napotykamy na ścieżki innych ludzi, Nasze tropy krzyżują się, a czasami biegną obok siebie. Bywa, i jest to duże szczęście, że nasza ścieżka napotka ścieżkę kogoś niepospolitego. Ja osobiście miałem – w przypadku Macieja – takie szczęście.

Panu Profesorowi Adamowi Kraszewskiemu z Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu dziękuję za materiał ilustracyjny, zamieszczony w tym tekście. Pani doktor Alicji Kluczyk za pomoc w przygotowaniu go do druku.

Praca wpłynęła do Redacji 6 stycznia 2009

KRONIKA



**SEMINARIUM POŚWIĘCONE
100 ROCZNICY URODZIN
PROF. DR HAB. BOGUSŁAWY JEŻOWSKIEJ-TRZEBIATOWSKIEJ
I CHEMII KOORDYNACYJNEJ W POLSCE
WROCŁAW, 20–21 LISTOPADA 2008**

Na Wydziale Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego, w związku z obchodami setnej rocznicy urodzin prof. dr hab. B. Jeżowskiej-Trzebiatowskiej, organizatora i wieloletniego dyrektora Instytutu Chemii, zorganizowano dwudniowe Seminarium. Obchody były także świętem polskiej chemii koordynacyjnej, dziedziny której rozwój w wielkim stopniu jest związany z osobą prof. B. Jeżowskiej-Trzebiatowskiej.



Fot. 1. Uczestnicy Seminarium w audytorium Wydziału Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego

Uroczyste obchody pracownicy Wydziału Chemii, uczniowie i współpracownicy Pani Profesor rozpoczęły 19 listopada złożeniem kwiatów na grobie p.p. Trzebiatowskich na Cmentarzu Komunalnym przy ul. Osobowickiej.



Fot. 2. Dziekan Wydziału Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego prof. Leszek Z. Ciunik podczas prezentacji Wydziału

Dwudniowe Seminarium prowadzili gospodarze Wydziału Chemii: dziekan prof. dr hab. Leszek Z. Ciunik oraz prodziekan ds. naukowych prof. dr hab. Anna Trzeciak. Uczestniczyło w nim ok. 250 chemików i przedstawiciele innych dyscyplin naukowych z całej Polski i z zagranicy, w tym wielu uczniów, współpracowników i przyjaciół prof. B. Jeżowskiej-Trzebiatowskiej. Na uroczystości przybyli m.in.: wiceprezydent Wrocławia Jarosław Obremski, wiceprezes Polskiej Akademii Nauk prof. dr hab. Andrzej Górski, przewodniczący Wydziału III Polskiej Akademii Nauk prof. dr hab. Janusz Jurczak, wiceprzewodniczący Rady Nauki prof. dr hab. Henryk Górecki, przewodniczący Wrocławskiego Oddziału PAN prof. dr hab. Daniel Bem, prorektor UWr prof. dr hab. Adam Jeziński, dziekan Wydziału Matematyki i Informatyki UWr prof. dr hab. Piotr Biler, prodziekan Wydziału Nauk Społecznych UWr prof. dr hab. Maciej Manikowski.

Społeczność chemików wrocławskich reprezentowała liczna delegacja z Politechniki Wrocławskiej z prodziekanem Wydziału Chemii prof. dr hab. Andrzejem Trochimczukiem i byłym rektorem prof. dr hab. Tadeuszem Lutym oraz profesorem z Instytutu Niskich Temperatur i Badań Strukturalnych PAN we Wrocławiu z dyrektorem prof. dr hab. Józefem Sznajdem. Wielu gości przybyło z Uniwersytetu Jagiellońskiego, a wśród nich dziekan Wydziału Chemii prof. dr hab. Grażyna Stochel. Instytut Katalizy i Fizykochemii Powierzchni PAN w Krakowie reprezentowali członkowie PAN – nestor polskiej chemii prof. dr hab. Adam Bielański oraz twórca i wieloletni dyrektor Instytutu prof. dr hab. Jerzy Haber. Gościliśmy także przedstawiciele Instytutu Chemii Organicznej PAN w Warszawie, Wydziału Chemii

Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza, Uniwersytetu im. Mikołaja Kopernika, Uniwersytetu Opolskiego, Politechniki Warszawskiej, Politechniki Rzeszowskiej, Uniwersytetu Humanistyczno-Przyrodniczego im. J. Kochanowskiego w Kielcach.

Gościem specjalnym Seminarium był wybitny chemik nieorganik prof. dr Achim Müller z Uniwersytetu w Bielefeld, dr hc Uniwersytetu Wrocławskiego, wieloletni przyjaciel profesor B. Jeżowskiej-Trzebia-towskiej. W Seminarium wziął także udział prof. Austin Barnes z Uniwersytetu w Sal-ford, redaktor naczelny czasopisma *Journal of Molecular Structure*, odznaczony 15 listopada 2008 roku złotym medalem Uniwersytetu Wrocławskiego.



Fot. 3. Prof. dr Achim Müller z Uniwersytetu w Bielefeld w czasie wykładu

Obecni byli prezesi i dyrektorzy zakładów przemysłowych: Zakładów Azotowych w Kędzierzynie, Zakładów Chemicznych „Złotniki”, FQS Fujitsu Kraków, WOMAREX, EMCCO Group, LeenLife i Kubicz Book Center.

Seminarium rozpoczął wykładem zatytułowanym „Chemia we Wrocławiu – rys historyczny” prof. dr hab. Lucjan Sobczyk, przybliżając uczestnikom pionierskie czasy tworzenia nauki w zrujnowanym wojną Wrocławiu. W czasy współczesne przeniosła nas prezentacja Wydziału Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego przedstawiona przez prof. dr hab. Leszka Ciunika. Natomiast z najnowszymi osiągnięciami można było dokładniej zapoznać się na sesji posterowej, przygotowanej przez doktorantów Wydziału Chemii, na której pokazano 60 plakatów. Uczestnicy spotkania wysłuchali również wykładu specjalnego prof. dr Achima Müllera z Uniwersytetu w Bielefeld zatytułowanego *Porous nanocapsules: coordination chemistry at the surfaces, in the pores and the cavities*, pięknie ilustrującego współczesne możliwości

chemii koordynacyjnej. Pierwszy dzień Seminarium zakończyło spotkanie towarzyskie, na którym wspomniano niezwykłą osobowość profesor Bogusławy Jeżowskiej-Trzebiatowskiej i opowiadano anegdoty z nią związane. Zaproszeni goście znaleźli też odrobinę czasu na wpisanie kilku słów do książki, która pozostanie pamiątką po tym szczególnym spotkaniu.



Fot. 4. Spotkanie towarzyskie w klubie i holu Wydziału Chemii.



Fot. 5. Uczestnicy Seminarium przy księdze pamiątkowej

Drugi dzień Seminarium otworzył prof. dr hab. Henryk Kozłowski prezentacją sylwetki profesor Bogusławy Jeżowskiej-Trzebiatowskiej. Ciepło opowiadał o swojej szefowej, akcentując mało znane, a budzące podziw fakty z Jej życia, zwłaszcza te z czasów wojny (praca dla Armii Krajowej pod pseudonimem Ren, produkowanie małych bomb dymnych i wybuchowych dla AK, ukrywanie Żyda – dr Emila Tasznera, za co została odznaczona medalem „Sprawiedliwy wśród Narodów Świata”). Wystąpienie prof. Kozłowskiego uzupełnił pokaz filmu dokumentalnego TVP z 1985 roku, w którym profesor Trzebiatowska opowiada o wrocławskiej szkole chemii, a także prezentacja zdjęć przedstawiających Panią Profesor w życiu prywatnym i zawodowym przygotowana przez dr Władysława Wrzeszcza. Po tych wzruszających chwilach wspomnień, dziekan Wydziału Chemii wręczył medale upamiętniające 100-lecie narodzin profesor Bogusławy Jeżowskiej-Trzebiatowskiej. Jej uczniom i współpracownikom oraz wychowankom Jej uczniów. Medal z numerem 1, przyznany prof. dr hab. Józefowi J. Ziółkowskiemu, odebrała małżonka – pani Elżbieta Ziółkowska. Prof. J.J. Ziółkowski, jeden z najwybitniejszych uczniów Pani Profesor, zainicjował obchody setnej rocznicy Jej urodzin, niestety zmarł w końcowej fazie ich przygotowań. Nic dziwnego, że podczas całego spotkania wspomnienia o Pani Profesor spłatały się z reminiscencjami związanymi z Profesorem.



Fot. 6. Prof. Tadeusz Garbuliński wspomina profesor Trzebiatowską

Seminarium zakończyły wystąpienia okolicznościowe uczestników spotkania, w których próbowano przywołać obraz niezwykłej kobiety i uczoney, zapamiętanej w różnych sytuacjach i okolicznościach przez poszczególnych mówców. Głos zabrali m.in. prof. dr hab. Jan Stankowski, prof. dr hab. Andrzej Górski, prof. dr hab.

Jan Klamut, prof. dr hab. Adam Bielański, prof. dr hab. Zofia Stasicka, prof. dr hab. Zygmunt Galasiewicz, prof. dr hab. Tadeusz Garbuliński i prof. dr hab. Adam Jezierski. Prof. dr hab. Florian Pruchnik poinformował o ustanowieniu przez PTChem medalu im. Bogusławy i Włodzimierza Trzebiatowskich.



Fot. 7. Prof. Zofia Stasicka wspomina profesor Trzebiatowską

Wszyscy uczestnicy Seminarium otrzymali materiały zjazdowe: numer 2/2008 czasopisma „Spotkajmy się we Wrocławiu” poświęcony profesor Trzebiatowskiej i wrocławskiej chemii oraz książki przygotowane specjalnie na to spotkanie przez pomysłodawcę uroczystości rocznicowych – prof. Józefa J. Ziółkowskiego, zatytułowane: „Profesor Bogusława Jeżowska-Trzebiatowska 1908–1991” i „Chemia koordynacyjna w Polsce”. W pierwszej książce zamieszczono dokładne zestawienie dokonań zawodowych Pani Profesor wraz ze spisem wszystkich publikacji i doktoratów, których była promotorem. Znalazły się tu także osobiste, często wzruszające wspomnienia osób, które ją znały i które zachowały we wdzięcznej pamięci Jej obraz. Druga książka przedstawia współczesny wizerunek chemii koordynacyjnej w Polsce, dziedziny, w której tworzeniu prof. B. Jeżowska-Trzebiatowska miała ogromny udział.

Seminarium towarzyszyła okolicznościowa wystawa ukazująca fotografie i pamiątki po Pani Profesor, wykonana przez Katarzynę Lukjan i Wojciecha Nowaka.

Fotografie do tekstu autorstwa dr Władysława Wrzeszcza.

Leszek Z. Ciunik

INFORMACJE

INFORMACJA REDAKCJI „WIADOMOŚCI CHEMICZNYCH”

1. Redakcja „Wiadomości Chemiczne” w porozumieniu z Radą Redakcyjną kontynuuje inicjatywę podjętą na konferencji Dziekanów Wydziałów Chemicznych, która odbyła się w lutym 2009 roku w Poznaniu.

Zgodnie z tą inicjatywą poszczególne ośrodki chemiczne (przede wszystkim uczelniane) w Polsce mogą publikować w zeszytach „Wiadomości Chemiczne” informacje o swojej działalności.

Redakcja bardzo dziękuje za dotychczasowe wsparcie i jednocześnie informuje, że w 2008 roku pozytywnie na apel Redakcji odpowiedziały niżej wymienione ośrodki chemiczne:

1.	Wydział Chemiczny Politechniki Śląskiej w Gliwicach
2.	Wydział Inż. i Techn. Chem. Politechniki Krakowskiej w Krakowie
3.	Wydział Chemii Politechniki Wrocławskiej we Wrocławiu
4.	Wydział Technologii Chemicznej, Politechnika Poznańska
5.	Instytut Niskich Temp. i Badań Strukturalnych, PAN Wrocław
6.	Wydział Chemii, Uniwersytet Gdański
7.	Wydział Chemiczny Politechniki Łódzkiej
8.	Wydział Chemii, Uniwersytet im. A. Mickiewicza w Poznaniu
9.	Zakład Działalności Pomocniczej PAN, Wrocław
10.	Rektor Politechniki Rzeszowskiej

2.

UWAGA!!**ZMIANA CENY PRENUMERATY NA ROK 2009***

Redakcja miesięcznika PTCh „Wiadomości Chemiczne” zawiadamia, że wysokość prenumeraty rocznej „Wiadomości Chemicznych” za 2009 r. wynosi **150 zł** dla instytucji i niezrzeszonych prenumeratorów indywidualnych oraz **60 zł** dla bibliotek szkół średnich i podstawowych. 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 2009 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
Millennium BIG BG SA
NRB 57 1160 2202 0000 0000 2720 2458

* Prenumeratory, którzy wpłacili kwotę niższą od obowiązującej w 2009 roku, proszeni są o dopłatę



The Fifth International Symposium on Two-Dimensional Correlation Spectroscopy

5-7 August 2009, Wrocław, Poland

www.2dcos5.stud.wchuwr.pl

The symposium will cover all aspects of two-dimensional correlation spectroscopy ranging from theory to applications in various fields.

The scientific program will consist of invited lectures and contributed papers presented as posters.

A short course given by Profs. Y. Ozaki and I. Noda will be offered in conjunction with the symposium on 4th of August 2009.

The symposium venue will be the Faculty of Chemistry, University of Wrocław (F. Joliot-Curie 14, 50-383 Wrocław).

Contact:

Mirosław Czarnecki

mcza@wchuwr.pl

phone: +48 71 3757238

Bogusława Czarnik-Matusewicz

bc@wchuwr.pl

phone: +48 71 3757293

fax: +48 71 3282348

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. Stręk, M. Suszyńska, cena 25 zł.

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

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

Od substacji prostych do życia. Świat RNA – początki życia na Ziemi, Zdzisław Chilmonczyk, cena 18 zł.

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.

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 DLA AUTORÓW

„Wiadomości Chemiczne” publikują artykuły przeglądowe, dotyczące wszystkich dziedzin chemii i wcześniej niedrukowane w innych czasopismach. Prace raz opublikowane w „Wiadomościach Chemicznych”, bez zgody Redakcji, nie mogą być wydane gdzie indziej.

Treść artykułów powinna odpowiadać aktualnemu stanowi wiedzy i uwzględniać najnowsze osiągnięcia z dziedziny, której artykuł dotyczy.

„Wiadomości Chemiczne” nie przyjmują do druku oryginalnych prac własnych. W wyjątkowych przypadkach mogą zostać wydane prace przeglądowe dotyczące dorobku własnego autora (np. nowo mianowanego profesora lub laureata ważnej nagrody) albo prace podsumujące dorobek Instytutu, Wydziału itp. Zamiar złożenia takiego artykułu do druku powinien być jednak wcześniej uzgodniony z Redakcją.

Ponadto w serii „Biblioteka Wiadomości Chemicznych” publikowane są prace, będące z założenia dłuższymi artykułami przeglądowymi lub monografiami poświęconymi ważnym i aktualnym problemom współczesnej chemii. Autorzy, którzy chcieliby dla „Wiadomości Chemicznych” taki artykuł napisać, powinni wcześniej skontaktować się z Redakcją i przesłać pocztą elektroniczną (e-mail: wchem@wchuwr.pl) lub zwykłą informację zawierającą tytuł przygotowywanej publikacji oraz przybliżoną liczbę stron, tabel i rysunków itp.

W ramach nowej serii wydawniczej „WCh” pod nazwą „Habilitatione” mogą być publikowane prace habilitacyjne z szeroko pojmowanego obszaru chemii. Zważywszy, że zgodnie z ustawą, dopuszczalne jest przedstawianie rozpraw habilitacyjnych albo w formie monografii, albo w formie pliku bliskotematycznych publikacji, poprzedzonych omówieniem w języku polskim (tzw. autoreferatem), Redakcja przewiduje drukowanie (również w kolorach) obydwu tych wariantów. W zależności od sytuacji finansowej Wydawnictwa lub w przypadku specjalnych wymagań Autorów, Redakcja zastrzega sobie prawo negocjacji kosztów druku z Autorami lub Instytucjami zlecającymi druk.

Prace należy przysyłać do Redakcji pocztą elektroniczną (e-mail: wchem@wchuwr.pl) oraz **równolegle** – pocztą zwykłą (na adres: Redaktor Naczelny/Sekretarz Redakcji „Wiadomości Chemicznych”; ul. F. Joliot-Curie 14, 50-383 Wrocław), dwa egzemplarze jednostronnego wydruku komputerowego publikacji z dołączoną płytą CD, zawierającą tekst, tabele i ilustracje.

Tekst powinien być przygotowany w edytorze **Word** lub innym kompatybilnym z MS Office. Artykuły należy opracowywać zwięźle i nie zamieszczać nadmiaru szczegółów, odsyłając Czytelnika do piśmiennictwa oryginalnego, które powinno uwzględniać najnowsze prace z dziedziny, której dotyczy artykuł.

Maszynopis nie powinien przekraczać 25 stron, wliczając wykaz piśmiennictwa w przypadku krótkiego przeglądu, lub 100 stron, w przypadku monografii przeznaczonej do druku w Bibliotece „Wiadomości Chemicznych”. Strona powinna zawierać **1800** znaków (razem ze spacjami), co przy interlinii 1,5 oznacza 30 wierszy po 60 znaków oraz margines z prawej strony ok. 5 cm.

Na pierwszej stronie, pod tytułem polskim, należy umieścić tytuł w języku angielskim, nazwisko(a) i adres autora(ów) oraz spis rozdziałów. Dalej powinno się znaleźć obszerne streszczenie pracy w języku angielskim (do 2700 znaków, z cytowaniem piśmiennictwa i odsyłaczami do tabel i rysunków w tekście) oraz wykaz słów kluczowych, osobno w języku polskim i osobno w angielskim. Redakcja prosi o przysyłanie tekstów angielskich adjustowanych.

Na oddzielnej kartce prosimy dołączyć krótką (do 150 wyrazów) **notkę biograficzną**, zawierającą tytuły naukowe i miejsca pracy oraz inne informacje wg uznania Autora/Autorów, w tym aktualne zdjęcie. Nadesłanie tych informacji będziemy traktować jako zgodę na ich publikację.

Rysunki (mogą być kolorowe, ale trzeba się liczyć z dopłatą do druku) w formie wydruku należy przesłać w dwóch egzemplarzach. Muszą mieć odpowiednią formę graficzną, by w razie potrzeby nadawały się do reprodukcji. Na odwrocie należy wpisać ołówkiem nazwisko autora i numer rysunku – ten sam, który w odpowiednim miejscu został wpisany w manuskrypcie. Na osobnej stronie dołączyć podpisy pod rysunki w języku polskim i angielskim. Osobno należy dołą-

czyć ponadto jeden komplet wzorów i schematów, narysowanych oddzielnie w formie nadającej się do reprodukcji. W wersji elektronicznej rysunki czarno-białe należy zapisać w formacie .doc, .cdr, .jpg, .tif, .pdf, natomiast rysunki kolorowe – w formacie .jpg lub .tif. Rozdzielczość rysunków ≥ 300 dpi. Każdy z rysunków zapisać w oddzielnym pliku.

Tabele należy ponumerować cyframi arabskimi, a ich tytuły w języku polskim i angielskim zapisać nad tabelami.

Piśmiennictwo należy zestawić w kolejności cytowania w tekście: powinno ono zawierać kolejno inicjały imion i nazwisko, skrót tytułu czasopisma zgodny z przyjętymi normami, rok wydania, tom podkreślony i numer pierwszej strony cytowanej pracy, przykład: J. Kowalski, Wiad.Chem., 2007, **61**, 473. Wykaz skrótów ważniejszych czasopism chemicznych jest podany w „Wiadomościach Chemicznych”, 1989, **43**, 979. Jeśli część piśmiennictwa zebrana jest w monografiach lub innych wydawnictwach, nie należy podawać szczegółowo wykazu tego piśmiennictwa, lecz cytować odnośne wydawnictwo.

O **przyjęciu** pracy do druku decyduje Komitet Redakcyjny. Przed podjęciem decyzji wszystkie prace są przesyłane recenzentom. Artykuły niezakwalifikowane do druku Redakcja zwraca, zachowując kopię maszynopisu.

Autorzy zobowiązani są do wykonania jednej korekty tekstu.

Autorzy wydrukowanych prac otrzymują bezpłatnie 20 odbitek.

Redakcja
„Wiadomości Chemicznych”

SPIS TREŚCI

Anna M. TRZECIAK: Nanocząsteczkowe katalizatory palladowe w reakcjach tworzenia wiązań C-C	1
Jan MAŁYSZKO, Monika KARBARZ: Spektrofotometryczne i elektrochemiczne metody oznaczania aktywności antyoksydacyjnej	17
Izabela JASICKA-MISIAK: Allelopatyczne właściwości metabolitów wtórnych roślin uprawnych	39
Małgorzata BUKOWIECKA-MATUSIAK, Iwona ZIEMECKA: Perspektywy stosowania metody blokowej do syntezy modyfikowanych oligonukleotydów w roztworze i na podłożu stałym	63
Bogumiła KUPCEWICZ, Elżbieta BUDZISZ: Insulinonaśladowcze i przeciwcukrzycowe właściwości związków wanadu	85
Krystyna DZIERZBICKA, Aleksandra KAWZOWICZ, Agnieszka KOC, Magdalena KUKOWSKA-KASZUBA: Pochodne akrydyny/akrydonu – synteza, aktywność biologiczna i zastosowanie kliniczne	107
Felieton Naukowy	
Ignacy Z. SIEMION: Okruchy. IX. Maciej	141
Kronika	149
Informacje	155

W NASTĘPNYM ZESZYCIE UKAŻĄ SIĘ:

- Robert PAŹIK, Wiesław STREK, Karol NITSCH: Synteza, właściwości optyczne i elektryczne nanokrystalicznych materiałów BaTiO₃ domieszkowanych jonami ziem rzadkich
- Anna ZAWISZA: Wykorzystanie kompleksów palladu w syntezie związków heterocyklicznych
- Marta SOBIESIAK, Elżbieta BUDZISZ: Indukowane hipoksją selektywne działanie związków kompleksowych kobaltu(III) na komórki nowotworowe
- Magdalena MAŁACHOWSKA, Grzegorz CHOLEWIŃSKI, Krystyna DZIERZBICKA, Anna WARDOWSKA, Piotr TRZONKOWSKI: Kwas mykofenolowy i jego analogi. Synteza i aktywność biologiczna
- Zbigniew CZECH, Agnieszka BUTWIN: Poliakrylanowe kleje samoprzylepne sieciowane dualnie

Felieton Naukowy

Ignacy Z. SIEMION: Okruchy. X.