

# WIADOMOŚCI *chemiczne*

Zeszyt  
dedykowany pamięci  
Profesor  
Małgorzaty  
Jeżowskiej-Bojczuk



2018

(72)

7-8

(853-854)

# **CZASOPISMO POLSKIEGO TOWARZYSTWA CHEMICZNEGO**

## **RADA REDAKCYJNA**

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

## **KOMITET REDAKCYJNY**

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

## **REDAKTOR NACZELNY**

ZDZISŁAW LATAJKA

## **REDAKCJA**

BARBARA LATKO

## **SEKRETARZ REDAKCJI**

BEATA ŚWIĄTEK-TRAN

BARBARA LATKO (FINANSE)

KAZIMIERA LUKJAN (KOLPORTAŻ)

Korespondencję należy kierować pod adresem:

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

## **INTERNET**

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

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

© Copyright by Redakcja „Wiadomości Chemicznych”, Wrocław 2018  
pISSN 0043-5104  
eISSN 2300-0295

Maszynopis niniejszego numeru przekazano Wydawcy w lipcu 2018

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

IN MEMORIAM  
PROFESOR MAŁGORZACIE JEŻOWSKIEJ-BOJCZUK  
1953–2018



Środowisko naukowe poniosło niepowetowaną stratę – odeszła od nas p. Profesor Małgorzata Jeżowska-Bojczuk (Wydział Chemii UW), naukowiec, nauczyciel akademicki, wychowawca wielu pokoleń studentów i doktorantów, Człowiek wielkiej prawości, wiedzy i skromności.

Obok znaczącego dorobku naukowego p. Profesor zapisała się w naszej pamięci jako świetny wykładowca, zafascynowany nauką, dysponujący ogromną wiedzą wzbogaconą bystrym spojrzeniem na świat, erudycją i ugruntowaną hierarchią wartości życiowych.

---

Odeszła od nas dnia 8 lutego, 2018 roku, żegnana z żalem przez Rodzinę oraz liczne grono przyjaciół, współpracowników i wychowanków.

W tym roku, w październiku (2018) Profesor Małgorzata Jeżowska-Bojczuk obchodziłaby swoje 65 urodziny. Zapewne z tej okazji na Wydziale Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego zorganizowano by jubileuszową sesję naukową, młodszy pracownicy i doktoranci zaprezentowaliby swój dorobek i osiągnięcia naukowe, byłyby oczywiście życzenia i kwiaty, ale cóż ...

... życie pokazało zupełnie inne plany: Jubilatki nie będzie już z nami.

Profesor odeszła nagle, w okresie swojej największej aktywności życiowej i zawodowej, pełna planów i pomysłów na dalsze przedsięwzięcia badawcze i naukowe. Poruszała się w świecie, który ją fascynował, który wnikliwie badała i poznawała. Posiadła głęboką wiedzę z wielu dziedzin, potrafiła wynajdywać i formułować nowatorskie projekty, angażując w nie współpracowników, zwłaszcza swoich studentów i doktorantów.

Profesor Małgorzata Jeżowska-Bojczuk urodziła się 6 października 1953 roku, we Wrocławiu, jednakowoż rodzina Jeżowskich wywodzi się ze Stanisławowa, dawnej Małopolski Wschodniej. Ojciec, Krzysztof Jeżowski, był profesorem i rektorem Wyższej Szkoły Ekonomicznej we Wrocławiu, a matka, Halina z d. Krajewska, ekonomistką. Siostrą Ojca była wybitna uczona, nauczyciel akademicki i wielka organizatorka twórczości naukowej i dydaktycznej p. Profesor Bogusława Jeżowska-Trzebiatowska.

Po ukończeniu w 1968 roku szkoły podstawowej, dalszą naukę kontynuowała w V Liceum Ogólnokształcącym we Wrocławiu, tam też w 1972 roku złożyła egzamin maturalny i zaraz potem rozpoczęła studia chemiczne na Wydziale Matematyki Fizyki i Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego.

Tytuł magistra chemii uzyskała w październiku 1977 roku i podjęła studia doktoranckie w Instytucie Chemii UW, przygotowując pracę doktorską pod kierunkiem prof. Henryka Kozłowskiego związaną z badaniami nad specyfiką oddziaływań aminokwasów aromatycznych z jonami metali.

W latach 80. p. Profesor zajmowała się badaniami kompleksów Cu(II) i Ni(II) z dwu- lub trójpeptydami zawierającymi na N- lub C- końcu aminokwas aromatyczny.

Metodami elektronowego rezonansu paramagnetycznego, spektroskopii elektronowej, CD wykonywała pomiary kompleksów Cu(II) z peptydami: Pro-Gly, Pro-Gly-Gly, Pro-Gly-Gly-Gly, oraz z izoseryną i pochodną seryny – kwasem 4-amino-3-hydroksy masłowym. Przeprowadzała syntezy kompleksów palladu(II) i platyny(II) z peptydami zawierającymi aminokwasy aromatyczne: glicylo-tyrozyną i tyrozylo-glicyną oraz z estrem etylowym glicylo-tyrozyny, estrem metylowym i etylowym tyrozyny.

W lutym 1982 roku Małgorzata Jeżowska-Bojczuk obroniła pracę doktorską zatytułowaną „*Specyfika oddziaływań jonów Pd(II) i Cu(II) z peptydami zawierającymi aminokwasy aromatyczne.*”

Rozprawa doktorska uzyskała wysoką ocenę i została zakwalifikowana do wyróżnienia nagrodą. Dorobek naukowy Doktorantki stanowiły już wówczas cztery publikacje o zasięgu międzynarodowym. Prof. Henryk Kozłowski napisał wtedy: *Dr M. Jeżowska-Bojczuk współpracuje ze mną od 1976 roku. Dobrze pracuje w zespole badawczym. Jest pracownikiem zdolnym i sumiennym, co pozwala jej uzyskać szereg wartościowych wyników naukowych. Obecność Jej w naszym zespole ma istotne znaczenie dla dalszego rozwoju badań z nim związanych.*

W latach 1982–1987 zajmowała stanowisko asystenta na Wydziale Matematyki Fizyki i Chemii, UWr. W opinii napisanej przez prof. Józefa J. Ziółkowskiego czytamy: *Dr Małgorzatę Jeżowską-Bojczuk pamiętam jeszcze z okresu studiów jako wyróżniającą się studentkę, a następnie doktorantkę wykonującą pracę doktorską z zakresu chemii bionieorganicznej... Dr M. Jeżowska -Bojczuk jest dobrze przygotowana do pracy naukowej w dziedzinie badań strukturalnych układów kompleksowych i bionieorganicznych zawierających jony metali. Jest zdolnym, młodym pracownikiem naukowym, wykazującym duże zdolności eksperymentalne i interpretatorskie. Jest autorem lub współautorem prac oryginalnych opublikowanych w czasopismach, których tytuły znajdują się na Liście Filadelfijskiej, oraz szeregu komunikatów wygłoszonych na konferencjach naukowych krajowych i zagranicznych.*

Do przytoczonych powyżej opinii można by dołączyć zdanie prof. Henryka Ratajczaka, że *Dr M. Jeżowska-Bojczuk wykazuje duże zainteresowanie i uzdolnienia do pracy naukowej, rokuje nadzieję, że będzie dobrym pracownikiem naukowym – zdanie potwierdzone potem przez życie.*

Od 1987 roku rozpoczęła pracę w Zakładzie Chemii Nieorganicznej, Instytutu Chemii UWr. na stanowisku adiunkta, przechodząc dalej kolejne stopnie kariery naukowej. W 1993 roku odbyła staż naukowy w Wielkiej Brytanii.

Kilkanaście lat później, w 1999 roku, otrzymała stopień doktora habilitowanego na podstawie rozprawy: *Chemiczne aspekty oddziaływań jonów miedziowych z biologicznie ważnymi aminowymi i karboksylowymi pochodnymi mono- oraz oligosacharydów*”. Dwa lata później – w 2001 roku, uzyskała tytuł profesora nadzwyczajnego, a w 2010 roku tytuł profesora zwyczajnego.

Była kierownikiem Zakładu Dydaktycznego – ZD-3 Zakład Chemii Biologicznej, od 2005 roku – kierownikiem Studium Doktoranckiego przy Wydziale Chemii, UWr. Przewodniczyła Komisji Rekrutacyjnej w procedurach kwalifikacyjnych na studia doktoranckie, była też przewodniczącą Wydziałowej Komisji Doktoranckiej, opiniującej wnioski o przyznawanie stypendiów.

W roku 1999 powierzono jej kierowanie Wydziałowym Laboratorium Spektroskopii Dichroizmu Kołowego. Laboratorium działało niezwykle sprawnie, a p. Profesor swoim zapałem i umiejętnością trafnego, klarownego tłumaczenia zagadnień dichroizmu, potrafiła przyciągnąć do siebie liczne grono studentów i współpracowników.

O pozycji naukowej Profesor świadczył wybór na członka Komisji Konkursowej dla wniosków o granty z dotacji celowej MNiSW, na członka Komisji Stypendialnej

w projekcie „Rozwój potencjału i oferty edukacyjnej UW, szansą rozwoju konkurencyjności Uczelni”, na członka Wydziałowej Komisji ds. Jakości Kształcenia, oraz na członka Rady Bibliotecznej.

Profesor podejmowała się również wielu innych funkcji, głównie organizacyjnych, m.in. jako współorganizator specjalności *Chemia biologiczna* oraz *Chemia medyczna*, współorganizator kierunku *Chemia medyczna*. Uczestniczyła w pracach panelu ekspertów NCN, recenzowała projekty badawcze dla NCN, IBBPAN – granty doktorskie oraz projekty *DoktorRIS* – z programu stypendialnego na rzecz innowacyjnego Śląska.

Profesor M. Jeżowska-Bojczuk, jako uznany specjalista w dziedzinie chemii koordynacyjnej, opublikowała 112 prac naukowych o łącznym IF -273,9.

Najwybitniejsze i najbardziej zapamiętane Jej osiągnięcia naukowe dotyczyły badań nad oddziaływaniami jonów metali z peptydami i kwasami nukleinowymi oraz cytotoksycznością kompleksów metali.

Profesor zajmowała się molekularnymi mechanizmami oddziaływania jonów metali z substancjami o znaczeniu terapeutycznym. Charakteryzowała procesy koordynacji oraz trwałości tworzących się w warunkach fizjologicznych – w roztworach wodnych – kompleksów antybiotyków i innych związków terapeutycznych (leki przeciwnowotworowe, przeciwgrzybicze), oceniała zdolność do generowania reaktywnych form tlenu przez te układy.

Dogłębnie badała oddziaływania antybiotyków peptydowych i ich kompleksów z RNA. Szczególną uwagę poświęcała ich wpływowi na aktywność katalityczną rybozomu wirusa zapalenia wątroby typu D. Prace badawcze w tym obszarze miały na celu racjonalne projektowanie nowych związków o charakterze przeciwwirusowym.

Profesor i jej współpracownicy zajmowali się bacytracyną, jej zdolnościami do degradacji kwasów nukleinowych. Odkrycie hydrolitycznych właściwości bacytracyny wobec kwasów nukleinowych rozszerzyło potencjalne spectrum zastosowań tego antybiotyku i stało się podstawą przygotowania – wraz z zespołem prof. J. Ciesiołki z IChB PAN w Poznaniu – zgłoszeń patentowych (Zgł. pat., PCT/IB2012/055059, Zgł. pat., WO 2013/042093), a w 2017 r. prace te zaowocowały uzyskaniem patentu – PL 227562 B1.

Profesor Małgorzata Jeżowska-Bojczuk, wraz z zespołem, prowadziła również szerokie badania dotyczące cytotoksyczności strukturalnej zmodyfikowanych antybiotyków fluoro-chinolonowych (ich aktywności), badania nad białkami adhezyjnymi *Fusobacterium nucleatum* (białkami zwiększającymi prooksydatywną aktywność jonów żelaza i miedzi).

W ostatnich 5 latach była kierownikiem 4 grantów: „Czy białka adhezyjne zwiększają prooksydatywną aktywność jonów żelaza i miedzi” (grant NCN), „Fosfinowe pochodne antybiotyków chinolonowych i ich kompleksy z jonami miedzi(I) i miedzi(II)” (grant NCN), „Modulacja aktywności katalitycznej DNA. Rybozomy HDV jako potencjalny cel terapii przeciwwirusowej oraz użyteczne biosensory” (grant EIT<sup>+</sup>), „Liposomowe postacie fosfonowych pochodnych sparfloksacyny zamykane gradientem jonowym” (grant KNOW).



Fot. 1. Małgorzata Jeżowska-Bojczuk w swoim gabinecie na Wydziale Chemii UW.

Od początku swojej kariery na Wydziale Chemii UW, p. Profesor skrupulatnie porządkowała swoje zamierzenia i plany. Zapewne nie przypuszczała, że przyjmując funkcję Kierownika Zespołu Chemii Medycznej przyjdzie Jej ułożyć swój ostatni plan. A zamierzała:

- zaprojektować, syntezować i zbadać wpływ modyfikacji strukturalnych antybiotyków i innych substancji terapeutycznych na ich właściwości koordynacyjne oraz aktywność biologiczną,
- zbadać wpływ jonów metali na chemię i biochemię leków, ich funkcję w generowaniu stresu oksydacyjnego,
- zajmować się kompleksami jonów metali z fragmentami białek pełniących ważne funkcje biologiczne,
- także poznać właściwości przeciwnowotworowe, przeciwbakteryjne i przeciwgrzybicze badanych układów,
- rozwijać dalsze zainteresowania dotyczące związków o znaczeniu terapeutycznym,
- nadal badać mechanizmy cytotoksyczności potencjalnych terapeutyków na liniach komórek nowotworowych oraz zdrowotnych

i tak dalej...

Od momentu zatrudnienia na Wydziale Matematyki, Fizyki i Chemii, potem na Wydziale Chemii UW, p. Profesor brała czynny udział w procesach dydaktycznych. Była Kierownikiem Zakładu Dydaktycznego Chemii Biologicznej. Prowadziła ćwiczenia, wykłady i seminaria. Opracowała i prowadziła przez wiele lat wykłady dla studentów Wydziału Chemii i studium doktoranckiego.

W ramach specjalności chemia biologiczna Profesor na swoich wykładach przekazywała studentom wiedzę zarówno z zakresu współczesnej chemii, jak i z podstaw

chemii medycznej, biologii oraz dziedzin pokrewnych. Omawiała problemy dotyczące oczyszczania, prowadzenia analizy produktów pochodzenia naturalnego oraz badań ich właściwości chemicznych. Starła się, aby wiedza teoretyczna przekładała się na umiejętności praktyczne, niezbędne do projektowania, syntezy i badania struktury związków biologicznie czynnych.

Wykładając chemię medyczną, zależało Jej, aby student otrzymał informacje obejmujące zagadnienia z wielu dziedzin m.in. z chemii bionieorganicznej, bioorganicznej, biologii, biochemii, chemii leków, toksykologii, analizy chemicznej związanej z diagnostyką laboratoryjną.

Zwracała szczególną uwagę na rozwijanie u studenta samodzielnych umiejętności, które przydałyby się później w pracy – w laboratoriach badawczych, diagnostycznych lub – zwyczajnie – w branży chemicznej, biochemicznej, biotechnologicznej i innych.

Jej wykłady uniwersyteckie dotyczące chemii biologicznej, później chemii medycznej, wzbudzały u studentów entuzjazm. Mówiła ciekawie, swobodnie, charakterystycznie pięknym językiem. Zdarzało się, że po wykładzie miała czas na dyskusje ze studentami. Zawsze uśmiechnięta, cierpliwie tłumacząca trudniejsze zagadnienia, by wyjaśnić je studentom do końca.

Profesor była Kierownikiem Studium Doktoranckiego. Pracowała w nim z wielkim zapałem i energią, by pracę naukową doktorantów prowadzono w sposób właściwy.

Nie lubiła nierzetelnej pracy, bylejakości, czy to w nauce, czy też dydaktyce. Mówiono, że jest życzliwie surowym nauczycielem rzetelnej i odpowiedzialnej pracy naukowej. Doktoranci twierdzili: *Profesor stawiała nam wysokie wymagania, z tego powodu było nam ciężko pracować, ale patrząc wstecz widzimy, że sobie samej stawiała jednak jeszcze wyższe wymagania. Była pracowita. Jej sumienność była dla nas motywacją do stawiania czoła kolejnym wyzwaniom i problemom.*

Wypromowała dziewięciu doktorów, w chwili odejścia pracowała jeszcze z trzema. Była recenzentem kilku prac doktorskich wykonanych w różnych ośrodkach naukowych Polski.

Wyrazem uznania dla aktywności naukowej i dydaktycznej p. Profesor były liczne nagrody i odznaczenia. Kilkakrotnie otrzymała nagrodę Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego, w 2005 roku był to Medal Komisji Edukacji Narodowej. Uhonorowana nagrodami Rektora Uniwersytetu Wrocławskiego.

### I CZAS NA KILKA SŁÓW OD SIEBIE...

Profesor Małgorzata Jeżowska-Bojczuk, dla wielu z nas po prostu Gosia, była niezwykłą osobowością, z charyzmą jak magnes przyciągający ludzi. Fascynowała swoistym sposobem wypowiedzi, piękną polszczyzną, szerokim horyzontem myślowym, no i stylem bycia (zawsze elegancka), a także humorem.



Na pytanie co trzeba zrobić, by życie było udane, odpowiadała – Trzeba lubić drugiego człowieka. Była lubianym nauczycielem, lubiącym swoich uczniów. Z głębi swojej osobowości była nad wyraz dobra, a dobrzy ludzie, jak ktoś kiedyś powiedział – mają tę moc, że żyją w niejednym wspomnieniu.

Ja serdecznie wspominam Profesor ze współpracy, gdy w 2008 roku przygotowaliśmy obchody 100. rocznicy urodzin prof. Bogusławy Jeżowskiej-Trzebiatowskiej. Gosia, jej bratanica, skrzętnie gromadziła wszelkie pamiątki rodzinne, zdjęcia, medale, dyplomy, wycinki z gazet. Potrafiła zadzwonić późnym wieczorem, by upewnić się, że wszystko jest dobrze przygotowane. Dbała o każdy szczegół, podobnie jak ja. Na wystawie, w hallu Wydziału, w centralnym miejscu miała stanąć replika gabinetu Jubilatki, z biurkiem, na którym ustawiliśmy wazon kremowych róż – ulubionych kwiatów Cioci. Obok stał wypożyczony z Gmachu Głównego Uniwersytetu Wrocławskiego zabytkowy fotel. Gosia zaproponowała: „*położymy na biurku Cioci okulary, pojemnik na listy, nożyk do rozcinania listów, a na fotelu przewiesimy Jej szal*”. Ja postawiłam jeszcze filiżankę ze świeżo zaparzoną, parującą kawą. Gosi bardzo się to spodobało – biurko wyglądało tak, jakby prof. Trzebiatowska wstała od niego przed chwilą i poszła na wykład.

Gosia jako chemik, w dodatku podtrzymujący tradycje rodzinne, mówiła często: – *Chemia jest piękna*. Tą swoją *chemią* przyciągała do swojego gabinetu na Wydziale i studentów, i doktorantów, i współpracowników, i profesorów, i nauczycieli. Przychodzili na krótsze lub dłuższe dyskusje naukowe, dzielili się swoimi wątpliwościami, dylematami, problemami życiowymi, radościami.

Ona cierpliwie słuchała, z uwagą, jakby chodziło o coś najistotniejszego na świecie. Potrafiła wychwycić i nazwać istotę problemu i podsunąć sensowne rozwiązanie. Jeśli potrzebna była interwencja, chwytła za telefon i dzwoniła. Cieszyły ją sukcesy swoich studentów i doktorantów, zawsze dyskretnie wspomagała w ich karierach.



Prof. Bogusława Jeżowska-Trzebiatowska



Prof. Małgorzata Jeżowska-Bojczuk

Profesor Bogusława Jeżowska-Trzebiatowska, niezwykła Uczona, mawiała „*Naprawdę ważne jest to, aby móc pracować, coś tworzyć, służyć nie tylko nauce i odkryciom, ale służyć ludziom, moim uczniom – to jest największa satysfakcja. Smuci tylko krótkość czasu, jaki człowiek otrzymał do dyspozycji*”.

Słowa te mogłaby z pewnością powtórzyć prof. Małgorzata Jeżowska-Bojczuk, osoba niezwykle pracowita, twórcza, służąca nauce i przede wszystkim pomagająca ludziom, zwłaszcza swoim uczniom. Nas, którzyśmy Ją znali, smuci bardzo fakt, że będąc w pełni sił twórczych, tak szybko musiała odejść.

Czas szybko biegnie, ale Profesor jest i zawsze będzie w naszej pamięci, jako Człowiek wielkiej wiedzy, znawca chemii biologicznej i medycznej, jako nasz Przyjaciel.

*Kazimiera Lukjan*  
(Wydział Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego)

## WSPOMNIENIE

Prof. Małgorzatę Jeżowską-Bojczuk poznałem w 1995 jako student pierwszego roku. Była wówczas adiunktem, zbierała materiały do habilitacji. Prowadziła wykłady i seminaria z Podstaw Ochrony Środowiska i wyróżniała się poczuciem humoru oraz zaangażowaniem w przygotowanie wykładów. Legendarne były Jej przezrocza, wówczas drukowane lub pisane ręcznie na folii, na których obok reakcji przebiegających w środowisku, były rysunki zwierząt, drzew, czy chmur. Prowadziła ożywiony dialog ze studentami, uwielbialiśmy Jej ironiczne żarty i chyba jako jedyny wykładowca nie musiała prowadzić listy obecności na swoich wykładach. Poczucie humoru bywało czasami trochę sarkastyczne, ale zawsze bardzo inteligentne. Erudytką, czytana i wychowana wśród naukowców, miała olbrzymi szacunek do wiedzy, nauki, książek. Często podkreślała elitarność studiów w naszym społeczeństwie, zwłaszcza że wówczas ledwie 9% populacji miało wyższe wykształcenie. Była wymagająca względem studentów. Mówiła często *'noblesse oblige'*, z francuska szlachectwo zobowiązuje, i jako takie traktowała swoje wykształcenie i rolę na uniwersytecie. Egzamin z przedmiotu, który wykladała, nie był łatwy. Był to test z wieloma grupami, wieloma pytaniami albo reakcjami do uzupełnienia. Kiedyś na egzaminie podmieniliśmy z kolegą testy, żeby mieć kopie z tej samej grupy. Na wywieszonej kartce wyników, naszych ocen nie było, widniała informacja, że mamy zgłosić się osobiście do gabinetu p. Profesor. Chyba wpadliśmy. Jak stanęliśmy w drzwiach od razu nas poznała. Pamiętała, że siedzieliśmy koło siebie, i powiedziała „Za rękę panów nie złapałam, więc siadacie teraz tutaj koło mnie i piszecie jeszcze raz”. Usiedliśmy i napisaliśmy. Kiedy przyszedłem z indeksem po ocenę powiedziała, że stać mnie na więcej i prawdopodobnie oceną trzy plus się nie zadowolę. Co miałem robić, usiadłem, napisałem test po raz trzeci i tym razem z oceną cztery plus dumnie opuściłem Jej gabinet.

Nie mieliśmy już niestety żadnych zajęć z Panią Profesor do końca studiów, tym niemniej na moim wyborze odcisnęła piętno i po bardzo interesujących zajęciach, na których w dwóch zespołach broniliśmy elektrowni atomowych albo węglowych, zdecydowałem robić pracę magisterską z chemii jądrowej. Kiedy okazało się, że z powodu braku promotora nie było to możliwe, pobiegłem do Pani Profesor z pytaniem, czy by mnie nie przyjęła. Nie udało się, miała już dwie magistrantki, jak zwykle zresztą, zapisywały się do Niej tłumy. Odczekałem pół roku i dostałem się na studia doktoranckie, oczywiście promotorem była Ona. Wówczas świeżo po habilitacji, pełna planów naukowych na przyszłość, jak zwykle pełna pomysłów i uśmiechu. Od razu znalazła mi nowy temat do rozgryzienia – elektroforeza. W Zespole Chemii

---

---

Bioorganicznej i Biomedycznej była to wówczas metoda niemal nieznaną oraz prawie nieużywaną. Przyjąłem wyzwanie, ale również czułem się dumny, że do realizacji swojego tematu będę przecierał nowe szlaki. Pani Profesor, wówczas już Małgosia, zawsze służyła pomocą swoją wiedzą oraz ogromną łatwością w nawiązywaniu kontaktów. Dzięki niej w Instytutach PAN oraz Wydziału Biochemii na spotkaniach z innymi doktorantami, nauczyłem się izolacji DNA plazmidowego z bakterii oraz całej metodyki elektroforezy żelowej. Innym razem, kiedy potrzebowałem wykonać badania metodą NMR, umówiła mnie ze swoimi przyjaciółmi z Uniwersytetu w Sienie, a kiedy do badań potrzebowaliśmy bardzo rzadkiej metody EXAFS, umożliwiła mi eksperymenty w Instytucie EMBL przy synchrotronie w Hamburgu.

Małgosia uzyskiwała granty naukowe i dużo inwestowała w rozwój doktorantów. Nawiązywała wielostronną współpracę naukową. Jej doktoranci zawsze mieli dostęp do publikacji naukowych, i najnowszych metod badawczych z pogranicza chemii i biochemii. Zabierała nas na zagraniczne konferencje, a czasem – kiedy funduszy brakowało – wysyłała nas, samych. Na konferencjach brylowała w tłumie naukowców, witała się z dziesiątkami znajomych, przedstawiała nas z wdziękiem profesorom i doktorom z Francji, Włoch, Węgier czy Holandii. Znała ich ze swoich staży naukowych, wspólnych prac, czy poprzednich konferencji. Bywało że, w otoczeniu wielu z nich popijaliśmy wino i rozmawialiśmy nie tylko o nauce. Gosia zawsze miała pomysł na kolejne eksperymenty, granty czy współpracę. Przypominała w tym swoją ciotkę, najważniejszą kobietę wrocławskiej chemii: profesor Bogusławę Jeżowską-Trzebiatowską. Osobiście jej nie znałem, ale z opowiadań Małgosi tak sobie Panią Profesor wyobrażałem. Z każdej konferencji wracaliśmy umówieni na nowe eksperymenty, coraz bardziej wykraczające poza dotychczasowy zakres prac w naszym zespole. Pracowaliśmy z mikrobiologami, mykologami, immunologami. Gosia potrafiła bardzo ciekawie opowiadać o swoich badaniach, o antybiotykach, nad którymi pracowała latami, ale również o innych związkach, interesujących z punktu widzenia chemii koordynacyjnej bądź farmakologii. Zarażała nas swoim entuzjazmem. Często też słyszałem, że koledzy doktoranci zazdroszczą mi tematu, że zazdroszczą mi promotora.

Gosia była fantastycznym rozmówcą, nie unikała żadnego tematu, nawet polityki, i zawsze przekonywająco operowała argumentami, nie ulegała emocjom, jak inni polemici i z typowym dla siebie sarkazmem pointowała dyskusje. Interesowała się polityką, namawiała nas do głosowania i zawsze podpytywała, czy znaleźliśmy czas na pójście do urny. Miała bardzo rozwinięte obywatelskie poczucie odpowiedzialności i bardzo ceniła wolność. Wiele nam opowiadała o latach 70. i 80. w Polsce i w polskiej nauce. Tamte lata ją ukształtowały i często wracała do nich w rozmowach. Najczęściej wspominała je pozytywnie, w ogóle była osobą usposobioną pozytywnie, pełną zrozumienia, chęci pomocy i optymistycznie patrzącą w przyszłość. Podobny był zresztą Jej mąż, Janusz, którego poznałem przy okazji wspólnych wyjazdów na konferencje. Bywało, że w towarzystwie współmałżonków wybieraliśmy się na konferencje, a po wykładach wspólnie zwiedzaliśmy okolice. Takim wyjazdem

była w 2008 roku *International Conference on Coordination Chemistry*, na którą przyjechały tysiące naukowców. Wieczorami, po wykładach chodziliśmy po starej Jerozolimie do bladego świtu. Zatrzymywaliśmy się w małych restauracjach i odpoczywaliśmy przy wyśmienitym winie. Gosia była niezmqordowana, miała ogromną ciekawość świata i, dzięki Niej, bardzo dużo wówczas zwiedziliśmy. Wiele rozmawialiśmy o historii Żydów, o ich losach podczas II Wojny Światowej oraz o przykładach ich ratowania w rodzinie Gosi. Pojechaliśmy nawet do *Yad Vashem*, gdzie są tablice z nazwiskami Sprawiedliwych Wśród Narodów Świata, w tym prof. Bogusławy Jeżowskiej-Trzebiatowskiej. Gosia była bardzo dumna i przejęta, długo o tym marzyła i wreszcie tam była.



Fot. 1. Małgorzata Jeżowska-Bojczuk i Wojciech Szczepanik z małżonkami (*38th International Conference on Coordination Chemistry, Jeruzalem, Izrael, 2008 r.*)



Fot. 2. Małgorzata Jeżowska-Bojczuk i Wojciech Szczepanik (*29th International Conference on Solution Chemistry, Portoroz, Słowenia, 2005 r.*)



Fot. 3. Małgorzata Jeżowska-Bojczuk i Wojciech Szczepanik (29th International Conference on Solution Chemistry, Portoroz, Słowenia, 2005 r.)

Rodzina była zawsze dla niej bardzo ważna. Miała wspaniałe dzieci, męża i brata. Dawali Jej wiele wsparcia, codziennie opowiadała o nich i, jak rzadko kto, rozumiała potrzebę równowagi pomiędzy pracą a życiem prywatnym. Było to bardzo ważne również dla nas, Jej doktorantów, gdyż w trudnych sytuacjach mogliśmy liczyć i na Jej wyrozumiałość, i na wsparcie. Ja doświadczyłem tego dwukrotnie, jako że w tamtym czasie dwa razy zostałem ojcem.

Bardzo dużo zawdzięczam Gosi. Poświęciła dużo swojej energii i czasu, abym ukończył doktorat i mógł pozostać na stanowisku adiunkta na Wydziale Chemii. Dzięki Jej wsparciu, zdobyłem znaczący dorobek naukowy, nagrodę ministra za doktorat oraz etat na naszej wspólnej *Alma Mater*. Zawsze będę Jej ogromnie wdzięczny za tę bezinteresowną pomoc, ogromne wsparcie i setki mądrych rozmów, nie tylko o badaniach naukowych, ale też o życiu, przyszłości, polityce, książkach, dzieciach i milionie innych spraw. To właśnie Jej magnetyczna osobowość sprawiła, że pomimo odejścia z Uniwersytetu, po pięciu latach pracy naukowo-dydaktycznej, wciąż współpracowaliśmy przy projektach naukowych i snuliśmy plany na kolejne. Nawet w ostatnim roku, przed Jej chorobą, dyskutowaliśmy o potencjalnych badaniach w przyszłości. Tym żyła i, gdziekolwiek teraz jest, pewnie dalej z promiennym uśmiechem popija dobre wino i snuje plany naukowe. Taką Ją zapamiętam na zawsze.

*Wojciech Szczepanik*

## OD WSPÓŁPRACOWNIKÓW



Kiedyś usłyszałem od jednego z największych autorytetów naukowych w Polsce zdanie, które towarzyszy mi przez całe życie:

*„Nieważne, jakim jesteś naukowcem;  
ważne, jakim jesteś człowiekiem”.*

Pani Prof. Małgorzata Jeżowska-Bojczuk, a tak naprawdę po prostu Gosia, z naddatkiem spełniała oba kryteria, będąc świetnym, dociekliwym naukowcem oraz ciepłą, przyjazną osobą, która kochała ludzi. Bez wątplenia, z tego względu starała się pomagać wszystkim w każdej sytuacji, ale oprócz tego była również bardzo wymagająca.

Pamiętam nasze pierwsze spotkanie na zajęciach z chemii środowiska w latach 90-tych. Mimo że był to nowy kurs, dostaliśmy wtedy sporą dawkę wiedzy w postaci bardzo profesjonalnego wykładu, wraz z typowym dla Gosi wyrafinowanym humorem. Następnie okres doktoratu licznych rozmów „przy kawie”, dużej pomocy w stawianiu pierwszych kroków w świecie nauki, a także w rozwiązywaniu tych zwykłych, codziennych spraw towarzyszących pracy zawodowej.

Nigdy nie zapomnę naszych spotkań o treści naukowej, które były bardzo kreatywne i trwały po kilka godzin, na zmianę wprowadzając poprawki do publikacji wraz z zaciekłą dyskusją nad najdrobniejszymi szczegółami, wypijając przy tym niezliczone filiżanki kawy i herbaty. Czasami, pomimo braku kontaktu przez dłuższe okresy czasu, spowodowanego pędem życia, po podniesieniu słuchawki lub spotkaniu miało się wrażenie, że to wczoraj rozmawialiśmy ostatni raz. A tym razem to było we wrześniu 2017, po wspaniałym wykładzie Gosi o Pani Prof. Bogusławie Jeżowskiej-Trzebiatowskiej.

Piotr Młynarz



W moim sercu i wspomnieniach Pani Profesor Małgorzata Jeżowska-Bojczuk pozostanie jako świetny naukowiec, badacz o interdyscyplinarnych zainteresowaniach, osoba otwarta, radosna i wesoła.

Współpraca z Panią Profesor dała możliwość mikrobiologom czerpania z tajemnic chemii i odkrywania zupełnie nowych obszarów do dalszych naukowych eksploracji.

Nasze spotkania naukowe były twórcze, pełne pasji i planów na przyszłość. Dziś Pani Profesor nie ma już z nami, ale współpraca jaką zbudowała z Zakładem Mikrobiologii UW. trwa i przynosi naukowe owoce.

Dziękuję Pani Profesor w imieniu własnym i Pracowników Zakładu Mikrobiologii za zaufanie, jakim nas obdarzyła.

Pamięć o Pani Profesor zostanie na zawsze w naszych sercach.

*Gabriela Bugla-Płoskońska*



Moja Szefowa, kobieta o wielkim sercu, zawsze potrafiąca pomóc i wysłuchać. Przyjaciółka i wymagający przełożony jednocześnie. Przez tak wiele razem przeszliśmy... niejedna nieprzespana noc, hektolitry wypitej kawy, godziny dyskusji i szlifowania tekstu, codzienne i niecodzienne radości oraz smutki... Na zawsze pozostanie w moim sercu...

*Kamila Stokowa-Soltys*



Prof. Jeżowska-Bojczuk była recenzentem mojej pracy doktorskiej. Jej recenzja była taka, jak Ona sama – rzeczowa, do bólu wnikliwa, ciepła, przeniknięta nutką humoru i ironii.

Wydaje mi się, że Prof. Bojczuk (czy, jak zwykła czasem mówić sama o sobie: „ciocia Gosia”) miała dla każdego dobre słowo, sarkastyczny komentarz do otaczającego świata i garść cennych (pożądanych!) rad dotyczących spraw wszelakich – od organizacji pracy dydaktycznej i naukowej po kilka trików radzenia sobie z niemowlakami.

Empatyczna i niezwykle zaangażowana we wszystko, co jej powierzono; najważniejsza dla niej była rodzina – ta w tradycyjnym rozumieniu tego słowa, i ta, którą stworzyła wokół siebie na Wydziale.



Myszę, że na pewno ucieszyłaby się, widząc niniejsze wydanie *Wiadomości Chemicznych*. Możliwe, że mogłaby nie okazać tego wprost, tylko patrząc znad okularów, ze swoją charakterystyczną dykcją (w której – jak dla mnie – było coś arystokratycznego), powiedzieć: „A ty, Misiu, co mi tu popisales/łaś? Popatrz, jak ładnie się postaraliście, to trzeba przyznać. Ale Żabciu, tutaj przecinek to bym nie tutaj, tylko tu wstawiła, no popatrz, teraz to się lepiej czyta...”.

I jeszcze jedno – „Magdziusiu”. Była jedyną osobą na świecie, która mówiła do mnie „Magdziusiu” i jedyną, w której ustach to „Magdziusiu” bardzo dobrze brzmiało.

*Magdalena Rowińska-Żyrek*



**M**ałgosię poznałam zaraz po studiach, uczestnicząc w organizowanych przez profesor Bogumiłę Jeżowską-Trzebiatowską Szkołach Chemii Koordynacyjnej. Przez lata spotykałyśmy się z Gosią na konferencjach naukowych, obronach prac doktorskich, spotkaniach dziekańskich. Bliską współpracę rozpoczęłyśmy mniej więcej dziesięć lat temu. Współpraca naukowa związana z badaniami nad nowymi związkami koordynacyjnymi miedzi i rutenu, ich potencjalnych aplikacjach biomedycznych, przeplatała się z pracami nad przygotowaniem i wprowadzeniem na naszych uczelniach nowego kierunku studiów poświęconego chemii medycznej.

Małgosia była nie tylko znakomitym naukowcem i nauczycielem akademickim, ale przede wszystkim ciepłym i ciekawym świata człowiekiem, któremu jednakową radość sprawiało poznawanie nowych obszarów z pogranicza chemii i biologii, ale też działania na rzecz środowiska akademickiego. Szczególną życzliwość i pomoc kierowała do młodych ludzi, zarówno studentów, jak i młodzieży szkolnej. Tak wiele potrzebnych do różnorodnej działalności sił Gosia gromadziła wypoczywając w cichych i urokliwych zakątkach polskiego wybrzeża Bałtyku. Tam też czasami prowadziłyśmy rozmowy, nie tylko o nauce ale i o radościach i smutkach życia codziennego. Zapamiętam Małgosię jako osobę energiczną, nie bojącą się różnych wyzwań, ale jednocześnie ciepłą, pogodną i życzliwą ludziom.

*Grażyna Stochel*



**METALOTIONEINY I MOTYWY POLICYSTEINYLOWE  
– ODDZIAŁYWANIE Z JONAMI METALI**

**METALLOTHIONEINS AND POLYTHIOL MOTIFS  
– INTERACTIONS WITH METAL IONS**

**Karolina Krzywoszyńska\*, Henryk Kozłowski**

*Państwowa Medyczna Wyższa Szkoła Zawodowa w Opolu,  
ul. Katowicka 68, 45-060 Opole*

*\*e-mail: krzywoszynskak@wsm.opole.pl*

---

*Pracę dedykujemy pamięci Pani Profesor Małgorzaty Jeżowskiej-Bojczuk*

---

Abstract

Wykaz stosowanych symboli i oznaczeń

Wprowadzenie

1. Metalotioneiny - białka bogate w cysteinę.

1.1. Funkcje metalotionein

1.2. Struktura metalotionein i oddziaływanie z jonami metali

2. Motywy policysteinyłowe

2.1. Oddziaływanie motywów policysteinyłowych z jonami metali

Piśmiennictwo cytowane

---

**Prof. dr hab. Henryk Kozłowski** jest twórcą polskiej chemii bionieorganicznej, który kieruje projektami na pograniczu chemii i biologii. Obecnie pracuje we Wrocławskim Centrum Badań EIT+, jest szefem projektu badawczego Maestro realizowanego na Wydziale Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego oraz od 2016 roku zajmuje się tworzeniem Zespołu Chemii Medycznej w Państwowej Medycznej Wyższej Szkole Zawodowej w Opolu.

**Dr Karolina Krzywoszyńska** w 2014 roku ukończyła studia doktoranckie na Wydziale Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego w Zespole Chemii Bionieorganicznej i Biomedycznej. Obecnie zajmuje stanowisko adiunkta w Państwowej Medycznej Wyższej Szkole Zawodowej w Opolu, uczestnicząc w projekcie tworzenia laboratorium Chemii Medycznej.

## ABSTRACT

Many of biochemical paths and processes require some metal ions to occur. There are also known the negative effects of the presence of metal ions in the organism. The both sides of metal ions interactions on the living organism require specific regulations and cannot be left without supervision and control of the organism itself. One of the strategy to keep the control on metal ions are cystein-rich proteins that play crucial role in detoxication of metal ions that are dangerous for human organism as well as they help to maintain homeostasis of essential metal ions. Metallothioneins are one of the well known, but still not fully understood, cysteine-rich proteins. They are small proteins but may contain up to 30% of cysteine residues in the sequence, and what makes them very special from chemical point of view - all of the thiols present there are reduced [1]. This property makes these proteins very tempting for coordination of various metal ions. The most efficient binding to metallothionein is observed for the ions belonging to a Group 11 and 12.  $\text{Cu}^+$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  and  $\text{Cd}^{2+}$  represent these metal ions [2]. Besides of the lack of disulfide bridges, metallothioneins show also the absence or low amount of aromatic amino acid residues in the sequence [1]. Studies of the metallothioneins and their isoforms among different organisms show that the position of cysteine residues is very conservative [3]. Considering this aspect of metallothionein structure, some specific motifs of cysteine residues arrangement can be found in the sequence of these proteins. Most of the common polythiol motifs are CXC, CXXC, CXXXC, CC – where C is a cysteine residue and X is random  $\alpha$ -amino acid residue (other than cysteine) [3–5]. The influence of the cysteine residues organization on the specificity of metal ions binding was intensively studied. The differences observed for specificity of metal ions binding by metallothioneins and selected polythiol motifs are reviewed in this paper – with strong emphasis on the effect of the cysteine residues topography.

Keywords: metallothioneins, polythiol motifs, metal ions

Słowa kluczowe: metalotioneiny, motywy policysteinyłowe, jony metali

---

---

**WYKAZ STOSOWANYCH SRÓTÓW**

MT	- metalotioneina
C	- reszta cysteinyłowa
X	- dowolna reszta $\alpha$ -aminokwasu, inna niż cysteina
M	- metal
-SH	- grupa tiolowa
S-S	- wiązanie disiarczkowe

## WPROWADZENIE

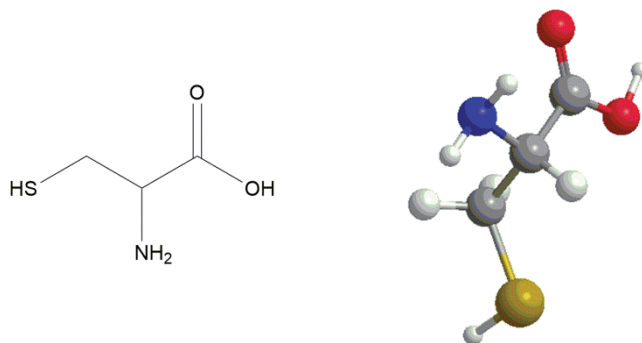
Oddziaływanie jonów metali na organizmy żywe jest zjawiskiem powszechnie znanym, a jego natura oraz konsekwencje pozytywne bądź negatywne leżą u podstaw chemii bionieorganicznej. Metale przejściowe, takie jak cynk i miedź, pierwiastki niezbędne, ale też toksyczne, np. kadm i nikiel, z dużym powinowactwem wiążą się do białek, które w swojej sekwencji zawierają reszty cysteinyłowe. Białka te pojawiają się często na szlakach związanych z transportem tych jonów i dostarczaniem ich do odpowiedniego miejsca w organizmie, a co za tym idzie – ściśle regulują ich biodostępność.

Jednymi z najlepiej poznanych białek zawierających w swojej sekwencji wiele reszt cysteinyłowych, są metalotioneiny. Te niewielkie białka mogą zawierać nawet do 30% reszt tego aminokwasu. Kluczowy w przypadku metalotionein jest fakt, że wszystkie dostępne w cząsteczce reszty cysteinyłowe standardowo są w stanie zredukowanym, co w konsekwencji tworzy potencjalne miejsca wiązania się jonów metali do cząsteczek tych białek. Z tego względu metalotioneiny są silnie ekspresjonowane podczas narażenia organizmu na wysokie stężenia toksycznych jonów metali, do których można zaliczyć np. jony  $\text{Cd}^{2+}$ , gdy niezbędne jest zatrzymanie ich swobodnej ekspansji i detoksykacja organizmu. Ponadto znajdują się one na szlakach transportowych odpowiedzialnych za utrzymanie odpowiedniej homeostazy metali, które są niezbędne dla prawidłowego funkcjonowania organizmu. Do tej ostatniej grupy można zaliczyć właśnie jony  $\text{Zn}^{2+}$ .

### 1. METALOTIONEINY – BIAŁKA BOGATE W CYSTEINĘ

Z chemicznego punktu widzenia cysteina, jest aminokwasem, który w łańcuchu bocznym zawiera grupę tiolową -SH (Rys. 1). Przekłada się to na wiele możliwych zastosowań tego aminokwasu w organizmie. Dzięki obecności tej grupy, cysteina uczestniczy w biologicznych reakcjach redox mających za zadanie neutralizowanie wolnych rodników, mogących uszkadzać składniki komórek[6]. W wyniku tych reakcji, cysteina utlenia się, co oznacza utworzenie wiązania kowalencyjnego pomiędzy dwoma atomami siarki (S-S) z dwóch cząsteczek tego aminokwasu, nazywanym mostkiem disiarczkowym.

Ponadto, atom siarki budujący tę grupę wykazuje wysokie powinowactwo pod względem chemicznym do wielu jonów metali. Dlatego też aminokwas ten pojawia się w sekwencji białek, których zadaniem jest wiązanie różnych lub specyficznych jonów metali [6].



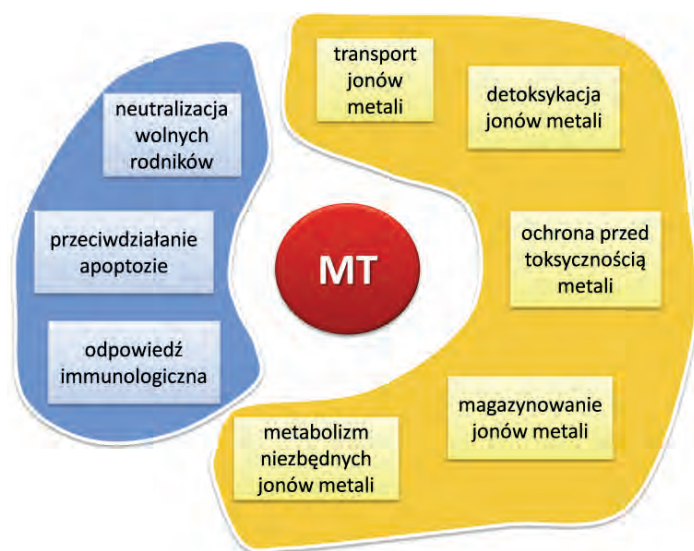
Rysunek 1. Wzór strukturalny cysteiny  
Figure 1. The structure of cysteine

Metalotioneiny są przedstawicielami tego typu białek i, od momentu ich odkrycia w 1957 roku, stanowią interesujący i ciągle nie do końca zgłęбiony przedmiot badań w chemii bionieorganiczej. Zostały one pierwszy raz wyizolowane z materiału biologicznego w postaci związanej z jonami kadmu  $Cd^{2+}$  [7]. Od tamtego czasu naukowcy wyodrębnili wiele białek należących do tej rodziny, pochodzących z różnych organizmów zwierzęcych i roślinnych [8]. Znane są także metalotioneiny syntetyzowane przez komórki grzybów [9, 10] oraz bardzo podobne do metalotionein białka bakteryjne [11, 12]. Do tej pory określono ich sekwencje aminokwasowe, a także sposób wiązania jonów metali, i nadal znajdują się nowe postacie i izoformy metalotionein oraz w dalszym ciągu naukowcy starają się wyjaśnić ich rolę oraz mechanizm działania [8, 13].

### 1.1. FUNKCJE METALOTIONEIN

W wyniku wielowymiarowych badań nad metalotioneinami odkryto, że białka te nie posiadają jednej sprecyzowanej funkcji, jaką pełnią w organizmach żywych [14]. Najważniejsze z nich schematycznie zaprezentowano na Rysunku 2 i opisano poniżej.





Rysunek 2. Diagram prezentujący najważniejsze funkcje metalotionein. W jaśniejszym polu znajdują się funkcje związane z bezpośrednim oddziaływaniem z jonami metali, natomiast w ciemniejszym polu zaznaczono pozostałe funkcje, wynikające z innego rodzaju działania tych białek

Figure 2. Diagram showing the most important functions of metallothioneins. The brighter area – functions directly related with MT-metal ions interactions; darker area – other functions basing on different mechanism.

Jak już wspomniano, jedna z najważniejszych funkcji metalotionein związana jest z metabolizmem i szeroko pojętą regulacją biodostępności metali. Białka te „opiekują się” enzymami i innymi białkami wymagającymi związania jonów metali do prawidłowego funkcjonowania, poprzez dostarczanie do nich odpowiedniego jonu. Metalotioneiny mogą działać również w odwrotnym kierunku i usuwając np. jony cynku z palców cynkowych czy czynników transkrypcyjnych powodując ich dezaktywację [15].

Poza tym białka te zaangażowane są w procesy neutralizacji wolnych rodników [16]. Jednakże wydajność działania antyoksydacyjnego metalotionein jest dużo niższa, w porównaniu z innymi naturalnymi antyoksydantami występującymi w komórce, do których można zaliczyć np. glutation GSH [17]. Uczestniczą one również w odpowiedzi immunologicznej, gdzie ich podstawowym zadaniem jest dystrybuowanie jonów  $Zn^{2+}$  [18, 19]. Metalotioneiny odgrywają ważną rolę w procesach kancerogenezy i genotoksyczności, indukowanych działaniem promieniowania w zakresie UV oraz za sprawą takich metali, jak kadm, nikiel, ołów czy rtęć [19–21].

Ważnym aspektem działania, które przypisuje się metalotioneinom, jest ich zdolność do hamowania apoptozy. Jest to istotne w przypadku utrzymania przy życiu zdrowej komórki, jednak nie jest to proces selektywny i pozwala również na przetrwanie komórek nowotworowych i umożliwienie ich dalszej proliferacji [21–23].

## 1.2. STRUKTURA METALOTIONEIN I ODDZIAŁYWANIE Z JONAMI METALI.

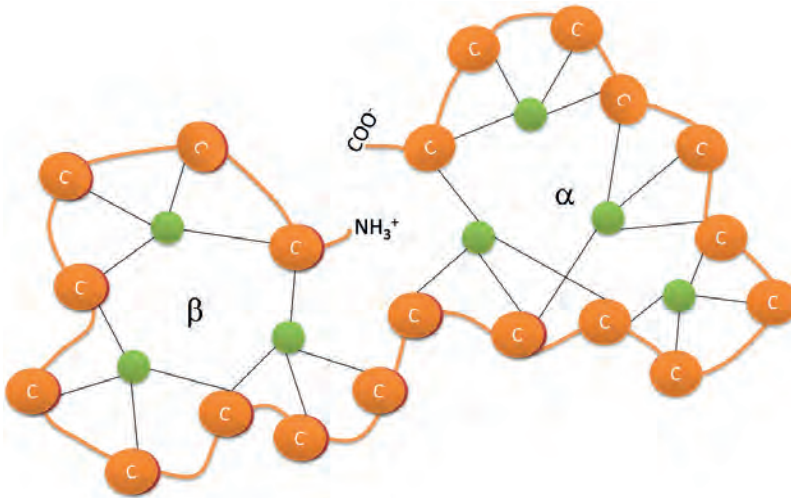
Pod względem chemicznym metalotioneiny są małymi białkami, które charakteryzują się wysoką zawartością reszt cysteinyłowych. Wszystkie reszty cysteinyłowe w białku w stanie wolnym są w formie zredukowanej, z wolną grupą tiolową – nieuwikłaną w wiązania disiarczkowe [1]. Stanowi to kluczowy aspekt dla funkcji, jakie pełnią metalotioneiny. Dodatkową cechą struktury pierwszorzędowej tych białek jest bardzo niska zawartość lub brak reszt aminokwasów aromatycznych w sekwencji [1].

U ludzi wyodrębniono cztery podstawowe izoformy metalotionein: MT-1, MT-2 (znajdujące się przede wszystkim, odpowiednio, w nerkach i wątrobie) oraz MT-3 i MT-4 – występujące w ośrodkowym układzie nerwowym [8].

Ogólnie białka te zbudowane są z pojedynczego łańcucha polipeptydowego, który w stanie wolnym, bez związanych jonów metali, nie posiada jednoznacznie uporządkowanej struktury trójwymiarowej. Dopiero związanie się do cząsteczki metalotioneiny jonów metali powoduje organizację struktury trzeciorzędowej. Pojedyncza cząsteczka białka wiąże najczęściej do 7 jonów metali dwuwartościowych (np.  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ) oraz do 12 jonów jednowartościowych (np.  $\text{Cu}^+$ ). MT-1 i MT-2 izolowane są w szczególności w postaci wiążącej jedynie jony  $\text{Zn}^{2+}$ , z kolei MT-3 i MT-4 wyizolowane z mózgu posiadają w strukturze zarówno jony  $\text{Zn}^{2+}$ , jak i  $\text{Cu}^+$  [1]. Powinowactwo jonów metali do metalotionein zmienia się w szeregu:  $\text{Zn}^{2+} < \text{Pb}^{2+} < \text{Cd}^{2+} < \text{Cu}^+ < \text{Hg}^{2+}$  [15, 24]. Dlatego też toksyczne jony metali, jak  $\text{Pb}^{2+}$  i  $\text{Cd}^{2+}$ , mogą swobodnie wypierać jony cynku z metalotionein [25, 26].

Chelatacja metali przez metalotioneiny związana jest z utworzeniem wiązań S–M o charakterze koordynacyjnym i wyodrębnieniem dwóch klastrów metalo-siarkowych, gdzie jony metalu skoordynowane są przez grupy tiolowe, pochodzące z łańcuchów bocznych reszt cysteinyłowych w geometrii teraedrycznej [1]. Klastery te przedstawione zostały schematycznie na Rysunku 3. Pierwszy klaster, znajdujący się w części N-końcowej białka, oznaczany jest symbolem  $\beta$  i tworzy się przez związanie 3 jonów  $\text{M}^{2+}$ . Z kolei klaster  $\alpha$  wiąże 4 jony metalu  $\text{M}^{2+}$  i powstaje przy końcu C metalotioneiny [27].

W niektórych przypadkach, jak zaobserwowano dla MT-3, wysokie stężenie jonów  $\text{Zn}^{2+}$  może doprowadzić do związania przez białko dodatkowego jonu metalu, tworząc układ  $\text{Zn}_8^{2+}$ -MT, co zaburza strukturę zaprezentowanych klastrów, jednak jest to zjawisko rzadko występujące i charakterystyczne dla tej izoformy [28].



Rysunek 3. Schematyczne przedstawienie klasterów metalosiarkowych powstałych w wyniku związania jonu  $M^{2+}$  przez cząsteczkę metalotioneiny. Klaster  $\beta$  powstaje poprzez związanie trzech jonów metali w N-końcowej części metalotioneiny, z kolei klaster  $\alpha$  tworzą cztery jony metalu związane poprzez grupy tiolowe reszt cysteinylnych w części C-końcowej białka. Rysunek zaadaptowany z [24]

Figure 3. Schematic representation of metal-sulphur clusters formed due to binding of  $M^{2+}$  ion to MT molecule.  $\beta$  cluster is created by binding of three metal ions in the N-terminal part of protein. The  $\alpha$  cluster is formed by the binding of four metal ions in the C-terminal part of metalothionein. Adapted from [24]

## 2. MOTYWY POLICYSTEINYLOWE

Ważnym aspektem struktury metalotionein jest powtarzalność położenia reszt cysteinylnych w sekwencji różnych izoform tych białek [3]. Można to zaobserwować na przykładzie zestawienia sekwencji ludzkich metalotionein pokazanego w Tabeli 1, gdzie wyróżniono wszystkie reszty cysteinylnych znajdujące się w sekwencji.

Tabela 1. Zestawienie sekwencji ludzkich izoform metalotionein. Wyróżniono wszystkie reszty cysteinylnych znajdujące się w sekwencjach białek. Źródło – baza uniprot

Table 1. The compilation of sequences of human metalothioneins. All cysteine residues are in bold. Source – uniprot database

MT	Sekwencja
1	MDPN. <b>CS</b> CEAGGS <b>CAC</b> AGS <b>CKCKKCK</b> CTS <b>CKKSCCS</b> CCPLG <b>CAKCA</b> QGC <b>ICK</b> GAS..... <b>EKCS</b> CCA
2	MDPN. <b>C</b> SAAGDS <b>CTC</b> AGS <b>CKCKE</b> CKCTS <b>CKKSCCS</b> CCPVG <b>CAKCA</b> QGC <b>ICK</b> GAS..... <b>DKCS</b> CCA
3	MDPET <b>CP</b> PSGG <b>SCT</b> CAD <b>SKCE</b> GCKCTS <b>CKKSCCS</b> CCPA <b>CEKCA</b> KD <b>CK</b> KGEEAAEA <b>EA</b> E <b>CKSC</b> CCQ
4	MDPRE <b>CV</b> CMSSG <b>GIC</b> MCGDN <b>CKT</b> T <b>CN</b> CKTYWKS <b>CCP</b> CCPPG <b>CAK</b> CARG <b>ICK</b> GGs..... <b>DKCS</b> CCP

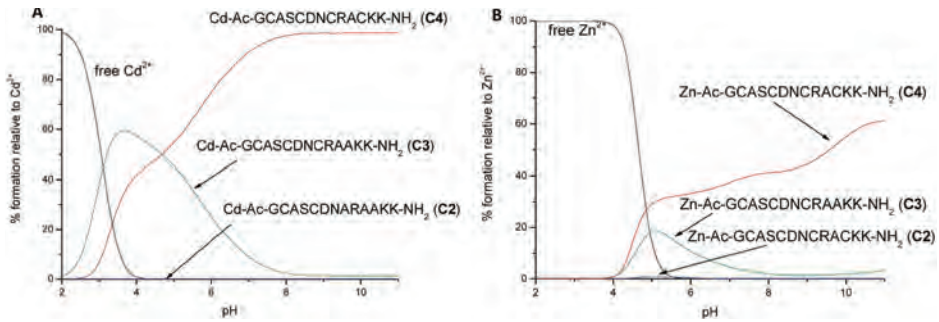
Przyglądając się bliżej układowi reszt cysteinyłowych zaprezentowanych w tabeli, można wyodrębnić pewne powtarzające się motywy w sekwencji, w które zaaranżowane są reszty tego aminokwasu. Jednym z najbardziej popularnych wśród motywów policysteinyłowych, pochodzących z metalotionein, jest motyw CXC, gdzie dwie reszty cysteinyłowe oddzielone są od siebie jedną dowolną resztą  $\alpha$  aminokwasu, niebędącego cysteiną. Kolejne charakterystyczne dla metalotionein motywy to dublet reszt cysteinyłowych (CC) oraz motywy CXXC [3–5]. Wszystkie te motywy zostały bardzo dobrze przebadane pod względem interakcji z jonami metali [29–32].

W sekwencjach metalotionein, które zostały wyizolowane z innych organizmów, wyodrębniono nietypowe motywy policysteinyłowe, do których zaliczyć można przede wszystkim motywy trypletu reszt cysteinyłowych (CCC) [13].

## 2.1. ODDZIAŁYWANIE MOTYWÓW POLICYSTEINYŁOWYCH Z JONAMI METALI

Rozmieszczenie reszt cysteinyłowych znajdujących się w łańcuchu peptydu lub białka, takiego jak metalotioneina, ma bardzo duże znaczenie w modyfikowaniu siły wiązania jonu metalu. Wynika to przede wszystkim z geometrii tworzonych kompleksów pomiędzy różnymi jonami metali a ligandami, które zawierają w sekwencji reszty cysteinyłowe. W przypadku jonów dwuwartościowych ( $Zn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ), tworzone kompleksy wykazują symetrię tetraedryczną z możliwymi czterema miejscami koordynacji wokół jonu centralnego. W przypadku jonów, takich jak  $Cu^+$  czy  $Ag^+$  z udziałem metalotionein czy peptydów policysteinyłowych, mogą powstawać kompleksy o symetrii trygonalnej i liniowej [6, 33, 34].

Ilość reszt cysteinyłowych zaangażowanych w wiązanie danego jonu także jest parametrem kluczowym w tych oddziaływaniach. W odniesieniu do pojedynczego jonu metalu, im więcej reszt cysteinyłowych wikła się w jego wiązanie, tym tworzone kompleksy są bardziej termodynamicznie stabilne [31]. Zależność ta pokazana jest na Rysunku 5, gdzie znajdują się wykresy kompetycyjne ilustrujące dystrybucję jonów cynku oraz kadmu pomiędzy trzy peptydy, różniące się ilością reszt cysteinyłowych w sekwencji.

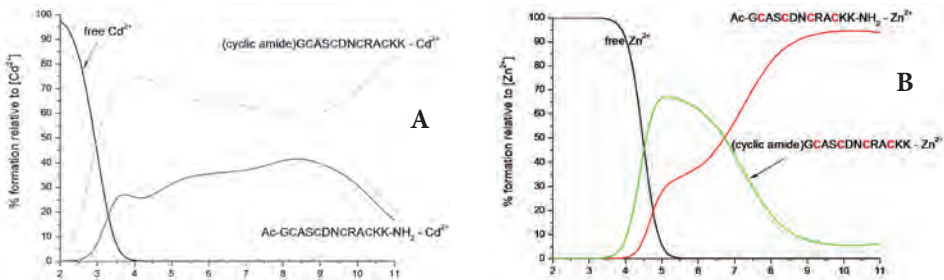


Rysunek 4. Wykresy kompetycyjne pokazujące w jaki sposób różna ilość reszt cysteinyłowych w sekwencji peptydu wpływa na jego oddziaływanie z jonami metali –  $\text{Cd}^{2+}$  (A) oraz  $\text{Zn}^{2+}$  (B) [31]

Figure 4. Competition plots, that show the influence of the number of cysteine residues in peptide chain on its interaction with metal ions –  $\text{Cd}^{2+}$  (A) and  $\text{Zn}^{2+}$  (B) [31]

Peptyd, który zawiera cztery reszty cysteinyłowe, wypełniające cztery dostępne miejsca w sferze koordynacyjnej metalu, zaaranżowane w motywie CXXC, wykazuje najsilniejsze powinowactwo do jonu metalu w grupie peptydów zaprezentowanych na Rysunku 4.

Na parametry wiązania jonów metalu do peptydów, które zawierają motywy policysteinyłowe pochodzące z sekwencji metalotionein, mogą wpływać (poza doбором samego motywu i ilością reszt cysteinyłowych) także aspekty steryczne. Wykazano to podczas eksperymentu, w którym porównano ze sobą peptyd liniowy zawierający cztery reszty cysteinyłowe oraz jego cykliczny analog (mający na celu imitować działanie nieustrukturyzowanej pętli białkowej) [32].



Rysunek 5. Wykresy kompetycyjne obrazujące wpływ cyklizacji peptydu na jego oddziaływanie z jonami metali na przykładzie  $\text{Cd}^{2+}$  (A) i  $\text{Zn}^{2+}$  (B) [32]

Figure 5. Competition plots showing the influence of cyclization of the peptide on its interaction with metal ions like  $\text{Cd}^{2+}$  (A) and  $\text{Zn}^{2+}$  (B) [32]

Jak pokazano na Rysunku 5, w przypadku jonów  $\text{Cd}^{2+}$  oddziaływanie z cyklicznym analogiem jest silniejsze w całym zakresie pH, jednak w przypadku jonów  $\text{Zn}^{2+}$  początkowo peptyd liniowy wykazuje słabsze powinowactwo do tego jonu jednak w wyższych wartościach pH tendencja się odwraca. Wynika to z zasadniczej różnicy w rozmiarze obu tych jonów i, o ile  $\text{Cd}^{2+}$  jest wystarczająco dużym jonem, by

związać cztery grupy tiolowe w cyklicznym peptydzie, o tyle mniejszy jon  $Zn^{2+}$  nie ma takiej możliwości i utrudnia mu to sztywność zapętlonego łańcucha polipeptydowego[32].

Podsumowując, oddziaływanie jonów metali z białkami, takimi jak metalotioneiny, niesie za sobą wiele różnorodnych konsekwencji dla organizmów żywych – od regulacyjnych po ochronne. Przekładając te oddziaływania na wyselekcjonowane z tych białek motywy policysteinyłowe, można w przybliżeniu odpowiedzieć na pytania związane z czysto chemiczną charakterystyką oddziaływania pomiędzy tymi ważnymi dla nas białkami, a równie istotnymi jonami metali.

#### PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] Y. Kojima, *Methods in Enzymology: Metallobiochemistry. Part B Metallothionein and Related Molecules*, Academic Press, Inc., San Diego 1991.
- [2] D.E.K. Sutherland, M.J. Stillman, *Metallomics*, 2011, **3**, 444.
- [3] M. Capdevila, S. Atrian, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2011, **16**, 977.
- [4] N. Romero-Isart, M. Vasak, *J. Inorg. Biochem.*, 2002, **88**, 388.
- [5] C. Baumann, A. Beil, S. Jurt, M. Niederwanger, O. Palacios, M. Capdevila, S. Atrian, R. Dallinger, O. Zerbe, *Angewandte Chemie-International Edition*, 2017, **56**, 4617.
- [6] S.J. Lippard, J.M. Berg, *Podstawy chemii bionieorganicznej*, PWN, Warszawa 1998.
- [7] M. Margoshes, B.L. Vallee, *J. Am. Chem. Soc.*, 1957, **79**, 4813.
- [8] J.S. Scheller, G.W. Irvine and M.J. Stillman, *Dalton Trans.*, 2018, **47**, 3613.
- [9] T. Kalsotra, S. Khullar, R. Agnihotri, M. S. Reddy, *Microbiology*, 2018, doi: 10.1099/mic.0.000666.
- [10] P. Iturbe-Espinoza, S. Gil-Moreno, W. Lin, S. Calatayud, Ö. Palacios, M. Capdevila, S. Atrian, *PLoS One*. 2016, **11**, e0148651.
- [11] J. Shi, W.P. Lindsay, J.W. Huckle, A.P. Morby, N.J. Robinson, *FEBS Lett.*, 1992, **303**, 159.
- [12] K. Takatera, N. Osaki, H. Yamaguchi, T. Watanabe, *Anal. Sci.*, 1994, **10**, 907.
- [13] A. Ziller, R.K. Yadav, M. Capdevila, M.S. Reddy, L. Vallon, R. Marmeisse, S. Atrian, O. Palacios, L. Fraissinet-Tachet, *J. Inorg. Biochem.*, 2017, **167**, 1.
- [14] M. Nordberg, G.F. Nordberg, *Met. Ions Life Sci.*, 2009, **5**, 1.
- [15] J. Calvo, H. Jung, G. Meloni, *IUBMB Life*, 2017, **69**, 236.
- [16] M. Sato, I. Bremner, *Free Radic. Biol. Med.*, 1993, **14**, 325.
- [17] R. Kassim, C. Ramseyer, M. Enescu, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2013, **18**, 333.
- [18] K. Subramanian Vignesh, G.S. Deepe, Jr., *Int. J. Mol. Sci.*, 2017, **18**, 2197.
- [19] A.T. Miles, G.M. Hawksworth, J.H. Beattie, V. Rodilla, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 2000, **35**, 35.
- [20] M.P. Waalkes, J. Liu, *Met. Ions Life Sci.*, 2009, **5**, 399.
- [21] P.C. Caldeira, L.S. Silva, A.C. Batista, M.C. Aguiar, *Arch. Oral. Biol.*, 2017, **77**, 75.
- [22] A. Bizoń, K. Jędryczko, H. Milnerowicz, *Postepy Hig. Med. Dosw.*, 2017, **71**, 98.
- [23] M.Ø. Pedersen, A. Larsen, M. Stoltenberg, M. Penkowa, *Prog. Histochem. Cytochem.*, 2009, **44**, 29.
- [24] M.C. Carpenter, A. Shami Shah, S. DeSilva, A. Gleaton, A. Su, B. Goundie, M.L. Croteau, M.J. Stevenson, D.E. Wilcox, R.N. Austin, *Metallomics*, 2016, **8**, 605.
- [25] H. Kozłowski, P. Kolkowska, J. Watly, K. Krzywoszyńska, S. Potocki, *Curr. Med. Chem.*, 2014, **21**, 3721.
- [26] I. Sabolic, D. Brejčak, M. Skarica, C. M. Herak-Kramberger, *Biomaterials*, 2010, **23**, 897.

- [27] D. Juárez-Rebollar, C. Rios, C. Nava-Ruiz, M. Méndez-Armenta, *Oxid. Med. Cell Longev.*, 2017, **2017**, 1.
- [28] G. Meloni, T. Polanski, O. Braun, M. Vasák, *Biochem.*, 2009, **48**, 5700.
- [29] K. Kulon, D. Woźniak, K. Wegner, Z. Grzonka, H. Kozłowski, *J. Inorg. Biochem.*, 2001, **101**, 1699.
- [30] M. Rowińska-Żyrek, D. Witkowska, S. Bielińska, W. Kamysz, H. Kozłowski, *Dalton Trans.*, 2011, **40**, 5604.
- [31] K. Krzywoszyńska, M. Rowińska-Żyrek, D. Witkowska, S. Potocki, M. Łuczowski, H. Kozłowski, *Dalton Trans.*, 2011, **40**, 10434.
- [32] K. Krzywoszyńska, H. Kozłowski, *Dalton Trans.*, 2014, **43**, 16207.
- [33] A. Cotton, G. Wilkinson, P.L. Gaus, *Chemia nieorganiczna podstawy*, PWN, Warszawa 1998.
- [34] R. Bofill, O. Palacios, M. Capdevila, N. Cols, R. González-Duarte, S. Atrian, P. González-Duarte, *J. Inorg. Biochem.*, 1999, **73**, 57.

Praca wpłynęła do Redakcji 7 czerwca 2018





# REGULACJA AKTYWNOŚCI KATALITYCZNEJ RYBOZYMÓW HDV ORAZ DEOKSYRYBOZYMÓW ZA POMOCĄ ANTYBIOTYKÓW I JONÓW METALI

REGULATION OF THE CATALYTIC ACTIVITY OF  
HDV RIBOZYMES AND DEOXYRIBOZYMES WITH  
ANTIBIOTICS AND METAL IONS

**Jan Wrzesinski, Jerzy Ciesiołka**

*Zakład Biochemii RNA, Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk,  
ul. Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań  
e-mail: wrzesinj@ibch.poznan.pl, jerzy.ciesiolka@ibch.poznan.pl*

---

*Pracę dedykujemy pamięci Pani Profesor Małgorzaty Jeżowskiej-Bojczuk*

---

Abstract

Wprowadzenie

1. Struktura rybozymów HDV oraz mechanizm ich działania
2. Oddziaływania antybiotyków z rybozymami HDV
3. Wpływ pH na zdolność antybiotyków do regulacji aktywności katalitycznej rybozymu HDV
4. Degradacja kwasów nukleinowych w obecności bacytracyny
5. Deoksyrybozymy aktywne w obecności jonów kadmu oraz w środowisku o niskiej wartości pH, otrzymane metodą selekcji *in vitro*

Uwagi końcowe

Podziękowania

Piśmiennictwo cytowane

---

**Dr hab. Jan Wrzeński** pracuje w Zakładzie Biochemii RNA Instytutu Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu na stanowisku profesora nadzwyczajnego.

**Prof. dr hab. Jerzy Ciesiołka** pracuje na stanowisku profesora zwyczajnego w Instytucie Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu oraz jest kierownikiem Zakładu Biochemii RNA.

## ABSTRACT

This review article describes the results of a 15-year cooperation between the Department of RNA Biochemistry at the Institute of Bioorganic Chemistry, Polish Academy of Sciences in Poznań and the Medical Chemistry Team of the Faculty of Chemistry at the University of Wrocław, headed by Professor Małgorzata Jeżowska-Bojczuk. A wide spectrum of antibiotics and other low molecular compounds and their complexes with  $\text{Cu}^{2+}$  ions have been tested as potential inhibitors of the HDV ribozyme catalytic reaction. Unexpectedly, it has been found that a number of compounds, depending on the conditions, exhibit inhibitory or stimulatory properties, i.e. they act as modulators of the RNA catalysis process. It was found that the effect of stimulation / inhibition of the catalytic activity of the HDV ribozyme is closely related to the degree of protonation of the antibiotics under study in given conditions. Their ability to inhibit catalysis also increases after binding the  $\text{Cu}^{2+}$  cation. In an environment with a higher pH, antibiotics usually stimulate the cleavage reaction, as at least some of their nitrogen centers are allowed to participate in the catalysis reaction, as proton acceptors / donors or a catalytic metal ion coordination site. During the study of one of the antibiotics, bacitracin, it was also observed that it exhibits nucleolytic properties with RNA and DNA molecules. The discovery of the hydrolytic properties of bacitracin extended the potential use of this antibiotic in antiviral therapy with the aim to destroy undesired nucleic acids in the cell. To search for DNAzymes catalyzing RNA hydrolysis, the *in vitro* selection method was used. In the selection experiment aimed at obtaining DNAzymes active in the presence of  $\text{Cd}^{2+}$  ions, variants belonging to the family of DNAzymes 8–17 previously described in the literature were obtained. Analysis of their properties showed that not only  $\text{Cd}^{2+}$  but also  $\text{Zn}^{2+}$  and  $\text{Mn}^{2+}$  ions support catalysis, therefore the site of catalytic metal ion coordination is not highly specific. The DNAzymes obtained in the second selection experiment showed an optimum of catalytic activity in the pH range of 4.0–4.5 and were inactive at a pH higher than 5.0. Interestingly, they do not require the presence of any divalent metal ions as cofactors in the catalysis reaction. The obtained results broaden the repertoire of DNAzymes which operate under non-physiological conditions and bring new information on the possible mechanisms of reactions catalyzed by nucleic acids.

**Keywords:** antibiotics, HDV ribozymes, deoxyribozymes, metal ions

**Słowa kluczowe:** antybiotyki, rybozomy HDV, deoksyrybozomy, jony metali

---

## WPROWADZENIE

Na początku lat 80. XX w. Thomas Cech oraz, niezależnie, Sydney Altman odkryli cząsteczki RNA posiadające właściwości katalityczne [1, 2]. W trakcie badań nad procesem *splicingu*, Cech zauważył, że wycinanie intronów RNA u jednokomórkowego organizmu eukariotycznego *Tetrahymena thermophila* nie wymaga udziału białek [1]. Zatem cząsteczki RNA w specyficznych sytuacjach mogą wykazywać właściwości enzymantyczne. Podobne wnioski sformułował Altman na podstawie obserwacji, że do dojrzewania cząsteczek tRNA przy udziale komponentu RNA RNazy P, wymagana jest tylko obecność jonów magnezu [2]. W późniejszych latach odkryto szereg występujących w naturze rybozymów, m.in. hammerhead [3] i hairpin [4], pochodzące z wirusów roślinnych, VS występujący w transkrypcie mitochondrialnego DNA pleśni *Neuspora crassa* [5] oraz rybozym HDV, znaleziony w wirusie zapalenia wątroby typu D [6]. Wszystkie naturalnie występujące rybozomy posiadają zdolność przecinania łańcucha RNA, a w przypadku rybozomu hairpin - także ligacji fragmentów RNA [7].

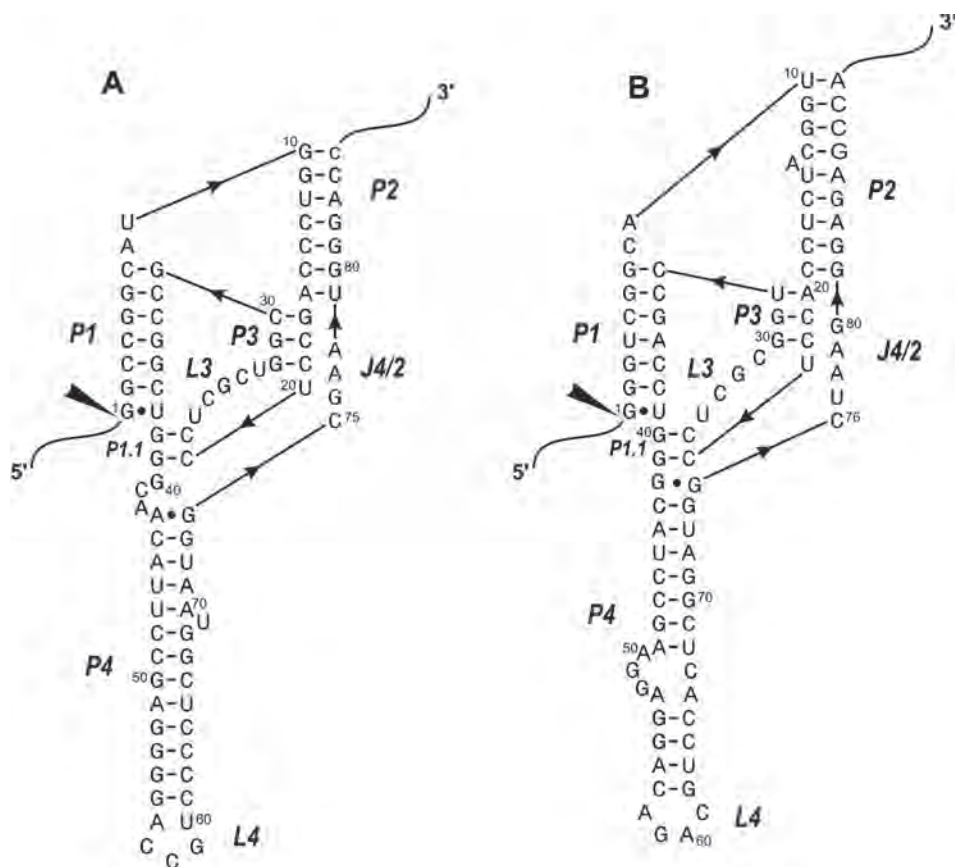
Cechą charakterystyczną cząsteczek RNA, w porównaniu do DNA, jest ich niestabilność. Okres półtrwania cząsteczek RNA waha się od kilku godzin do kilku dni, w zależności od ich składu nukleotydowego, struktury lub warunków środowiska. W przypadku DNA ten czas wynosi około 500 lat. Powstała zatem idea zastąpienia nietrwałej cząsteczki RNA przez DNA i konstrukcji DNAzymów o właściwościach nukleolitycznych, przecinających łańcuch RNA, podobnie do rybozymów, co zostało uwieńczone sukcesem w 1997 roku [8]. Stosując metodę selekcji *in vitro*, Breaker i Joyce znaleźli dwa DNAzomy, nazwane 8-17 i 10-23, wymagające dla swej aktywności hydrolitycznej obecności niektórych jonów metali dwuwartościowych. Ostatnie lata przyniosły wiele doniesień o zastosowaniu DNAzymów, dzięki ich stabilności - w konstrukcji biosensorów do wykrywania jonów metali, w tym jonów metali ciężkich, oraz zastosowaniu terapeutycznym DNAzymów w niszczeniu patogennych RNA w komórce [9].

Niniejszy artykuł przeglądowy opisuje wyniki 15-letniej współpracy pomiędzy Zakładem Biochemii RNA Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu i Zespołem Chemii Medycznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego, kierowanym przez Panią Profesor Małgorzatę Jeżowską-Bojczuk. Nasze wspólne badania dotyczyły wpływu wybranych antybiotyków oraz ich kompleksów z jonami miedzi(II) na aktywność katalityczną antygenomowego rybozomu HDV. Podjęliśmy także próbę znalezienia DNAzymów, wykazujących zdolność przecinania cząsteczek RNA w obecności wybranych jonów metali przejściowych.

### 1. STRUKTURA RYBOZYMÓW HDV ORAZ MECHANIZM ICH DZIAŁANIA

Jedynym rybozymem występującym w organizmie człowieka jest rybozym HDV, nazywany także rybozymem *delta*. Został on znaleziony w wirusie zapalenia

wątroby typu D (ang. *hepatitis delta virus*). Replikacja tego wirusa RNA zachodzi według mechanizmu „toczącego się koła” na terenie jądra komórkowego z udziałem RNA polimerazy II gospodarza [10]. Proces replikacji przebiega na matrycy RNA typu genomowego wirionu i jest syntezowana nić typu antygenomowego. Powstający w wyniku tego procesu transkrypt składa się z wielokrotnie powtarzających się sekwencji genomu wirusa, połączonych ze sobą w formie multimerycznej. Występujący odcinek sekwencji o aktywności rybozymalnej umożliwia przecinanie się formy multimerycznej do form monomerycznych. Linowe odcinki RNA typu antygenomowego ulegają następnie ligacji do formy kolistej i służą jako kolejne matryce do syntezy RNA typu genomowego [11]. Mimo że genom wirusa HDV wykazuje wysoką zmienność i ulega ciągłej ewolucji w trakcie infekcji, odcinek sekwencji nukleotydowej warunkujący autokatalityczne przecinanie się RNA charakteryzuje się bardzo wysoką zachowawczością.



Rysunek 1. Struktury drugorzędowe A) genomowego i B) antygenomowego rybozymu HDV  
Figure 1. Secondary structures of A) genomic and B) antigenomic HDV ribozyme

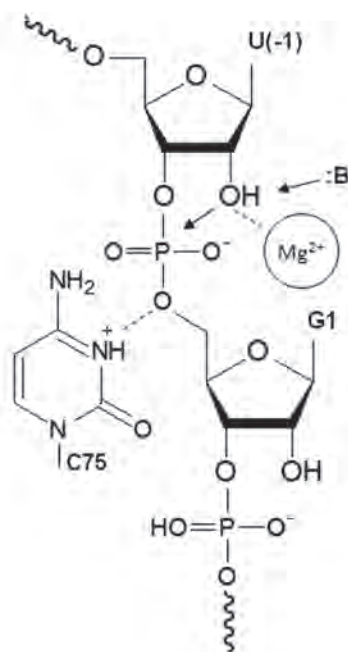
Obydwa rybozomy HDV tworzą strukturę typu pseudowęzła, która zakłada silne upakowanie cząsteczki, polegające na występowaniu większości nukleotydów w regionach dwuniciowych (Rys. 1). Struktura ta złożona jest z czterech regionów dwuniciowych, oznaczonych P1, P2, P3 i P4, regionu jednoniciowego, oznaczonego jako J4/2, oraz dwóch regionów pętlowych, L3 i L4 zamykających regiony P3 i P4. Autokatalityczne przecinanie łańcucha RNA występuje za resztą guanozyny, tworzącą niestandardową parę zasad G-U w regionie P1.

Wyjątkowo upakowana forma cząsteczki rybozomu HDV rodzi pytanie o sposób jego zwijania się w aktywną katalitycznie formę podczas replikacji wirusowego RNA [11]. Nowo powstająca cząsteczka RNA syntetyzowana jest przez polimerazę RNA od końca 5' poprzez przyłączanie kolejnych nukleotydów. Sformułowano dwie hipotezy: pierwszą, że powstająca podczas replikacji nić RNA może tworzyć sekwencyjnie odpowiednie motywy struktury drugorzędowej rybozomu, gdy tylko odpowiedni fragment RNA zostanie zsyntetyzowany (12). Druga hipoteza sugerowała, że multimeryczny transkrypt RNA może pozostawać w nieaktywnej katalitycznej formie i dopiero oddziaływanie z chaperonami RNA może rybozom uaktywnić [13]. Problemem tym zajęliśmy się w Zakładzie Biochemii RNA Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN.

Wykorzystując rybozom HDV typu genomowego, przeprowadziliśmy badania *in vitro* mające na celu modelowanie kolejnych stadiów procesu zwijania się tego rybozomu [14]. Zsyntetyzowano cztery fragmenty rybozomu o wzrastającej długości od końca 5', złożone z nukleotydów 1-43, 1-73, 1-78 i 1-84. Odpowiadały one kolejnym stadiom syntezy regionu rybozymalnego podczas replikacji wirusowego RNA. Do badań struktury otrzymanych fragmentów użyto metody cięć indukowanych jonami  $Pb^{2+}$ , trawień nukleazami oraz metod chemicznej modyfikacji DMS oraz hydrazyną. Stwierdzono, że helisy P1 i P4 są tworzone natychmiast, gdy tylko zsyntetyzowany fragment RNA zawiera te elementy struktury. W przypadku regionu P3/L3, tworzy on początkowo strukturę spinki, która w trakcie dalszej elongacji łańcucha RNA ulega przearanżowaniu, co pozwala na utworzenie finalnej struktury rybozomu typu pseudowęzła [14].

Modele struktur drugorzędowych rybozomów HDV zostały potwierdzone przez wyniki chemicznej modyfikacji oraz cięcia nukleazami [15]. Jednakże decydujące było rozwiązanie w końcu lat 90. struktury rybozomu HDV typu genomowego w kryształach [16]. Analiza krystalograficzna pokazała silne upakowanie struktury poprzez utworzenie dwóch pseudowęzłów z zaangażowaniem helisy P1 oraz nowej helisy P1.1 powstałej przez oddziaływanie regionu jednoniciowego J1/4 z pętlą L3. Co ciekawe, oddalone w strukturze drugorzędowej nukleozydy G1 oraz C75, w strukturze trzeciorzędowej rybozomu tworzą miejsce katalityczne podobne do miejsc katalitycznych enzymów białkowych. Centrum katalityczne stabilizowane jest przez szereg oddziaływań, takich jak: oddziaływania warstwowe, powodujące przemieszczenie C75 w głąb rdzenia struktury, jak i szereg wiązań wodorowych, stabilizujących położenie katalitycznej reszty C75 [16, 17].

Rozwiązanie kolejnych struktur krystalograficznych rybozomu HDV pozwoliło na zaproponowanie mechanizmu autokatalitycznego przecięcia łańcucha RNA przez rybozym [18] (Rys. 2). Reszta cytydyny w pozycji 75 jest protonowana i tworzy wiązanie wodorowe z 5' atomem tlenu wiązania fosfodiesterowego reszty guanozyny w pozycji 1 (Rys. 2). Aktywny jon metalu koordynuje do atomu *pro*-Rp tlenu reszty G1 i grupy 2' hydroksylowej reszty urydyny w pozycji (-1). Wiązanie jonu metalu do czynnika nukleofilowego ułatwia deprotonację przez zasadę B. Protonowana reszta C75 oraz jon  $Mg^{2+}$  stabilizują fosforan w stanie przejściowym, powstały poprzez atak nukleofilowy zjonizowanej grupy  $2'O^-$  reszty U(-1). Końcowym etapem przedstawionej reakcji transestryfikacji jest utworzenie 2'3'-cyklicznego fosforanu na reszcie U(-1) i grupy 5' hydroksylowej na G1. Efektywność reakcji przecięcia łańcucha RNA przez rybozym HDV zależy od dwóch czynników, obecności wybranych jonów metali dwuwartościowych oraz odpowiedniej aranżacji miejsca katalitycznego, zapewniającego atak *in line* grupy  $2'O^-$  na atom fosforu. Wymaga to ustawienia atomów  $2'O-P-5'O$  w jednej linii.



Rysunek 2. Mechanizm auto-katalitycznego przecięcia antygenomowego rybozomu HDV  
 Figure 2. Mechanism of auto-catalytic cleavage of HDV ribozyme

Nasze badania z zastosowaniem wariantów antygenomowego rybozomu HDV, działającego w formie *cis* oraz *trans*, wykazały ich największą aktywność w obecności 1 mM stężenia jonów  $Mg^{2+}$  oraz  $Mn^{2+}$  [19]. Ponadto, zauważono wyższą aktywność wariantów *cis*, w porównaniu do form *trans*. Dla innych jonów metali, rybozym HDV był aktywny w obecności jonów  $Co^{2+}$  oraz  $Sr^{2+}$ . Natomiast w warunkach

zblizonych do fizjologicznych, rybozym był nieaktywny w obecności jonów jednowartościowych oraz spermidyny.

Testowanie wpływu struktury miejsca katalitycznego na aktywność antygenomowego rybozemu HDV umożliwiła metoda selekcji *in vitro* [20]. Skonstruowana biblioteka kombinatoryczna zawierała ok.  $4,3 \times 10^9$  różnych wariantów tego rybozemu. Zawierała 16 pozycji typu *random*, to jest każdy z czterech nukleotydów występował z równym prawdopodobieństwem w tych pozycjach, w regionach P1.1, L3 oraz J4/2 (Rys. 1). W wyniku selekcji otrzymano szereg aktywnych katalitycznie wariantów rybozemu HDV. Jedna trzecia wariantów zawierała pojedynczą mutację G80U, która nie obniżała efektywności reakcji cięcia łańcucha RNA. Ponadto, co trzeci wariant zawierał mutację reszty C76, która bierze udział w mechanizmie katalizy RNA, identycznie jak C75 w rybozymie HDV typu genomowego (Rys. 2). Okazało się, że C76 w antygenomowym rybozymie HDV można zastąpić innym nukleotydem, lecz w sąsiedniej pozycji 77 musi występować reszta cytydyny. Wyznaczona stała szybkości reakcji cięcia ( $k_{obs}$ ) jest jednak znacznie niższa niż dla rybozemu typu dzikiego. Świadczy to o unikalności miejsca katalitycznego rybozemu HDV [20].

## 2. ODDZIAŁYWANIA ANTYBIOTYKÓW Z RYBOZYMAMI HDV

Rozpoczynając współpracę z zespołem prof. M. Jeżowskiej-Bojczuk postanowiliśmy skoncentrować się na dwóch zagadnieniach: poszukiwaniach antybiotyków regulujących właściwości katalityczne antygenomowego rybozemu HDV oraz wykorzystując wieloletnie doświadczenie zespołu Pani Profesor w badaniach koordynacji jonów metali do antybiotyków sprawdzić, jak koordynacja jonów  $Cu^{2+}$  wpływa na zdolność antybiotyków do regulacji aktywności katalitycznej tego rybozemu.

Wiadomo, że związki niskocząsteczkowe wiążą się do różnych cząsteczek RNA (tRNA, rRNA, rybozomy oraz aptamery). Wielu badaczy zwróciło szczególną uwagę na oddziaływanie RNA z antybiotykami. Szereg antybiotyków wiąże się do rybosomalnego 16S rRNA, wpływając na przebieg translacji [21]. Antybiotyki oddziałują także z wieloma rybozymami. Antybiotyk aminoglikozydowy – neomycyna, inhibuje aktywność katalityczną rybozymów: intronów grupy I, RNazy P, hammerhead, hairpin czy też HDV. Z drugiej strony, kanamycyna działa bardzo specyficznie i inhibuje wyłącznie aktywność katalityczną rybozemu RNazy P [22].

Przetestowaliśmy aktywność katalityczną antygenomowego rybozemu HDV, w obecności szeregu antybiotyków o bardzo różnej strukturze i właściwościach chemicznych (Tab. 1). Okazało się, że istnieją trzy grupy antybiotyków [23]. Takie, które nie inhibują reakcji cięcia i podobne właściwości posiadają ich kompleksy z jonami  $Cu^{2+}$ . Do grupy tej należą amikacyna bądź kanamycyna. Dla neomycyny oraz jej kompleksu z jonami  $Cu^{2+}$  obserwuje się silny ich wpływ na reakcję cięcia. Natomiast w przypadku sisomycyny, wankomycyny i aktynomyny D, inhibicję aktywności katalitycznej rybozemu HDV obserwowano tylko w obecności kompleksów tych



antybiotyków z jonami  $\text{Cu}^{2+}$ . Stała  $K_i$  była niższa około trzykrotnie dla kompleksów sisomycyny i vankomycyny. Największe różnice, ponad 35-krotne w wartościach  $K_i$ , zaobserwowano dla kompleksu aktynomycyny D z jonami  $\text{Cu}^{2+}$  w porównaniu do nieskompleksowanego antybiotyku. Wyznaczone wartości wynosiły 33 i 1270  $\mu\text{M}$ , dla reakcji cięcia w obecności jonów  $\text{Mg}^{2+}$ . Wartość  $K_i$  dla kompleksu aktynomycyny D z jonami  $\text{Cu}^{2+}$  była porównywalna z wartościami  $K_i$  dla innych antybiotyków, będących silnymi inhibitorami reakcji katalitycznego cięcia, zachodzącej w różnych rybozymach [22]. Należy podkreślić, że wolne jony  $\text{Cu}^{2+}$  nie miały wpływu na aktywność katalityczną badanego rybozymu HDV.

Tabela 1. Badane antybiotyki i związki niskocząsteczkowe:  
Table 1. Tested antibiotics and low molecular-weight compounds

Antybiotyki aminoglikozydowe:	Leki przeciwgrzybicze:
higromycyna B	flukonazol
amikacyna	
apramycyna	<b>Związki niskocząsteczkowe:</b>
neomycyna	pochodne koniugatów heminali z 1,2,4 triazolami
sisomycyna	puromycyna
kasugomycyna	
<b>Antybiotyki peptydowe:</b>	
kapreomycyna	oraz kompleksy tych wszystkich związków z jonami $\text{Cu}^{2+}$
bacytracyna	
aktynomycyna D	
ristomycyna	
ramoplanina	
blastycydyna S	
fleomycyna	
kolistyna	
wiomycyna	
gramicydyna	
<b>Antybiotyki <math>\beta</math>-laktamowe:</b>	
amoksycylina	

Interesujące zjawisko zaobserwowano dla ristomycyny, apramycyny i amoksycyliny, antybiotyków należących do różnych grup antybiotyków, odpowiednio: glikopeptydowych, glikozydowych oraz  $\beta$ -laktamów [24]. Przy niskich 100  $\mu\text{M}$  stężeniach antybiotyków obserwowano wzrost aktywności katalitycznej antygenomowego rybozymu HDV, przy 300  $\mu\text{M}$  stężeniu antybiotyków ten efekt zanikał, natomiast przy 300  $\mu\text{M}$  stężeniu kompleksów tych antybiotyków z jonami  $\text{Cu}^{2+}$

występowała silna inhibicja. Wykazano także, że koniugaty heminali z 1,2,4-triazolami, związkami o potencjalnym znaczeniu farmakologicznym, są nową klasą związków niskocząsteczkowych, które mogą inhibować aktywność katalityczną rybozomu HDV [25]. Efektywność inhibicji tych pochodnych heminali zależy od ich struktury i nawet blisko spokrewnione izomery mają różny wpływ na aktywność katalityczną rybozomu. To wskazuje, że miejsce wiązania tego ligandu w rybozynie może rozróżniać poszczególne izomery.

W celu ustalenia mechanizmu inhibicji własności katalitycznych antygenomowego rybozomu HDV typu *trans*, w obecności antybiotyków, użyto dwóch oligonukleotydowych substratów RNA, które zawierały w pozycji (-1) cytydynę oraz 2'-deoksytydynę [26]. Grupa 2' OH cytydyny jest niezbędna w mechanizmie reakcji autokatalitycznego cięcia rybozomu HDV (Rys. 2). Pierwszy substrat ulegał przecięciu z wysoką efektywnością i odzwierciedlał konformację rybozomu HDV po reakcji cięcia. Natomiast drugi substrat związany z rybozynie odpowiadał jego konformacji przed reakcją cięcia. Obydwa modelowe rybozomy HDV, przed i po reakcji cięcia, poddano mapowaniu struktury RNA w obecności wybranych antybiotyków: neomycyny, amikacyny oraz aktynomycyny D oraz ich kompleksów z jonami  $\text{Cu}^{2+}$ . Jak wspomniano powyżej, neomycyna i jej kompleks z jonami  $\text{Cu}^{2+}$  oraz kompleks aktynomycyna D- $\text{Cu}^{2+}$  były silnymi inhibitorami rybozomu. Natomiast wolna amikacyna oraz w kompleksie, a także nieskompleksowana aktynomycyna D, nie miały wpływu na przebieg reakcji autokatalitycznego cięcia nici RNA. Do mapowania struktury rybozomu użyto metodę cięcia jonami  $\text{Pb}^{2+}$  i nukleazami oraz metodę SHAPE. Wykazano, że w obydwu modelowych rybozomach neomycyna oraz jej kompleks są ulokowane w „kieszeni” utworzonej przez regiony P1.1 oraz J4/2. Ponadto, podobny rozkład modyfikacji w obydwu formach rybozomu HDV dla neomycyny oraz jej kompleksu wskazuje na bardzo podobny sposób oddziaływań RNA-antybiotyk. Natomiast dane mapowania amikacyny wskazują na wiązanie antybiotyku oraz jej kompleksu w pętli L3 obydwu form rybozomu HDV. Dla kompleksu aktynomycyna D- $\text{Cu}^{2+}$  zaobserwowano zmiany w rozkładzie miejsc trawień w trzonach P4 i P2 wyłącznie dla rybozomu HDV z substratem zawierającym deoksytydynę w miejscu jego przecięcia. Prawdopodobnie, dodatkowy ładunek dodatni kompleksu aktynomycyna D- $\text{Cu}^{2+}$  zwiększa jego powinowactwo do trzonów P4 i P2. Wyznaczono także wartości  $K_d$  charakteryzujące wiązanie badanych antybiotyków lub ich kompleksów z jonami  $\text{Cu}^{2+}$  do rybozomu, które mieszczą się w zakresie 8–136  $\mu\text{M}$  i mogą być ustawione w następującej kolejności: neomycyna B- $\text{Cu}^{2+}$ , aktynomycyna D- $\text{Cu}^{2+}$ , neomycyna B, aktynomycyna D, amikacyna- $\text{Cu}^{2+}$ , amikacyna [26]. Ta kolejność zgadza się doskonale z wcześniej badanym wpływem tych antybiotyków na inhibicję aktywności katalitycznej rybozomu HDV [27].

Lokalizację badanych antybiotyków w rybozynie HDV typu antygenomowego potwierdzono metodą modelowania komputerowego. Do modelowania wykorzystano modele krystalograficzne rybozomu HDV [16, 17]. Antybiotyki aminoglikozydowe: neomycyna B oraz amikacyna zajmują podobne miejsca w strukturze rybo-

zymu HDV, kieszeń utworzoną przez regiony J4/2, P2 oraz P3. Jednakże położenie neomycyny B różni się nieco od amikacyny, gdyż neomycyna oddziałuje z katalityczną resztą C76, zaangażowaną w mechanizm autokatalitycznego cięcia rybozimu (Rys. 2). Dla aktynomycyny modelowanie komputerowe pokazało dwa miejsca wiązania antybiotyku do struktury rybozimu, odpowiednio w trzonach P2 i P4. Choć te miejsca wiązania antybiotyku wydają się być oddalone od kieszeni katalitycznej utworzonej przez reszty U(-1) i C76, to kompleks aktynomycyna D-Cu<sup>2+</sup> silnie wpływa na aktywność rybozimu HDV. Najprawdopodobniej, dodatkowy ładunek dodatni zwiększa powinowactwo kompleksu do trzonu P4, powodując takie zmiany konformacyjne rybozimu, które czynią go nieaktywnym katalitycznie.

### 3. WPŁYW pH NA ZDOLNOŚĆ ANTYBIOTYKÓW DO REGULACJI AKTYWNOŚCI KATALITYCZNEJ RYBOZYMU HDV

Wcześniejsze badania wykazały, że zdolności koordynacyjne antybiotyków w stosunku do jonów metali silnie zależą od wartości pH środowiska [28]. Protonowane grupy aminowe w cząsteczkach antybiotyków zmieniają ich powinowactwo do jonów Cu<sup>2+</sup>. W trakcie prowadzonych badań określiliśmy wpływ wartości pH środowiska reakcji na auto-katalityczne przecięcie rybozimu HDV. Jako modele wybraliśmy dwa antybiotyki peptydowe: kapreomycynę oraz wiomycynę, należące do rodziny antybiotyków tuberamycyny.

Kapreomycyna i wiomycyna są używane jako leki przeciwgruźlicze i wykazują podobny mechanizm działania [29]. W rybosomach *Thermus. thermophilus* obydwa antybiotyki są położone w szczelinie pomiędzy dwoma podjednostkami rybosomalnymi i oddziałują z 16S oraz 23S rRNA, blokując proces translokacji. Ponadto, wiomycyna posiada podwójną aktywność w katalizie RNA, inhibując aktywność katalityczną intronów grupy I, natomiast dla rybozimu VS zaobserwowano wzrost jego aktywności w obecności tego antybiotyku [30, 31]. Wpływ tych antybiotyków oraz ich kompleksów z jonami Cu<sup>2+</sup> na reakcję autokatalitycznego przecięcia oligonukleotydowego substratu antygenomowego rybozimu HDV, działającego w wersji *trans*, jest podobny [32, 33]. Przy stężeniach, 0,20–75 mM dla kapreomycyny i 0,2 mM dla wiomycyny zaobserwowano 2-3 krotną stymulację reakcji katalizy RNA, przy wyższych stężeniach inhibicję. Podobny efekt występował w przypadku kompleksów tych antybiotyków z jonami Cu<sup>2+</sup>, przy 0,2 mM stężeniu kompleksów występowała stymulacja reakcji katalizy, natomiast przy 0,5 mM stężeniu kompleksu wiomycyna-Cu<sup>2+</sup> – silna inhibicja.

Zbadaliśmy także wpływ pH środowiska na przebieg reakcji cięcia rybozimu HDV w obecności kapreomycyny, wiomycyny oraz ich kompleksów z jonami Cu<sup>2+</sup> [32, 33]. Struktura kapreomycyny i wiomycyny jest niemal identyczna, zatem można oczekiwać podobnych ich właściwości podczas protonacji. Kapreomycyna zawiera cztery centra protonacji o wartościach pKa od 6,23 do 11,37, zatem można ją zdefiniować jako kwas o ogólnym wzorze H<sub>4</sub>L [28]. Natomiast wiomy-

cybę posiadającą trzy centra protonacji – jako kwas  $H_3L$ . Zasadnicza różnica we wpływie kapreomycyny i wiomycyny na aktywność katalityczną rybozomu HDV dotyczy ich kompleksów. W pH 5,5 i 6,5 kompleks kapreomycyny całkowicie inhibuje aktywność rybozomu, podczas gdy kompleks wiomycyny nie posiada takich właściwości. Ponadto, w pH 7,5 wiomycyna stymuluje aktywność katalityczną rybozomu HDV dwukrotnie lepiej niż kapreomycyna. Interesujące, odkryte przez nas zjawisko stymulacji aktywności katalitycznej rybozomu HDV, może być wyjaśnione w dwojaki sposób. Po pierwsze, badane antybiotyki ułatwiają tworzenie kompleksu substrat-rybozym dla rybozomu w wersji *trans*. Inna możliwość, to ich udział w rearanżacji struktury rybozomu do bardziej aktywnej w reakcji cięcia substratu. Mechanizm ten był sugerowany wcześniej dla wyjaśnienia wpływu wiomycyny na aktywność rybozomu VS i pierwsza z rozważanych możliwości była decydująca [31]. Jak wspomniano powyżej, kapreomycyna i wiomycyna posiadają cztery lub trzy miejsca protonacji. Wiomycyna nie posiada pierwszorzędowej grupy aminowej reszty kwasu  $\alpha,\beta$ -diaminopropionowego o wartości  $pK_a$  6,23. Ponieważ wiomycyna i kapreomycyna mają podobny wpływ na reakcję cięcia rybozomu HDV, zatem w pH 5,5 oraz 6,5 protonacja tej grupy nie odgrywa większej roli. Natomiast występuje w tych warunkach pH silny wpływ kompleksu kapreomycyna- $Cu^{2+}$  na reakcję cięcia. Z wcześniejszych badań grupy prof. M. Jeżowskiej-Bojczuk wynika, że w tym zakresie pH w roztworze istnieje głównie kompleks  $CuH_3L$ , zatem to on jest odpowiedzialny za inhibicję rybozomu HDV [28]. Z drugiej strony, w pH 5,5 oraz 6,5 kompleks wiomycyna- $Cu^{2+}$  nie miał wpływu na właściwości katalityczne rybozomu HDV. Zatem, występujący w tych warunkach kompleks typu  $CuL$  jest niezdolny do modulowania aktywności katalitycznej rybozomu HDV [33].

Do identyfikacji miejsc wiązania wiomycyny w strukturze antygenomowego rybozomu HDV użyliśmy metodę modelowania molekularnego, stosując jako model wyjściowy strukturę krystalograficzną rybozomu typu genomowego. Wcześniejsze badania w roztworze sugerowały bardzo podobną bądź identyczną strukturę obydwu rybozymów [6]. Wyniki modelowania molekularnego sugerują istnienie dwóch różnych miejsc wiązania wiomycyny w strukturze rybozomu HDV. Pierwsze występuje pomiędzy trzonem P2 oraz pętlą L3. Drugie miejsce wiązania wiomycyny jest zlokalizowane w głębokiej szczelinie utworzonej w strukturze przez trzony P1, P2 oraz P3. Podobne miejsce wiązania było sugerowane dla kompleksu wiomycyna- $Cu^{2+}$ , gdyż wielkość szczeliny  $10 \times 20 \text{ \AA}$  umożliwia ulokowanie tam antybiotyku bądź jego kompleksu. Także inne antybiotyki peptydowe, jak kapreomycyna oraz kompleks kapreomycyna- $Cu^{2+}$ , można zadokować w to miejsce. Precyzyjna analiza wyników modelowania molekularnego pokazała oddziaływanie wiomycyny z resztami A14/U15 w trzonie P2 oraz G3/U4 w trzonie P1. Dodatkowo, wiomycyna tworzy wiązanie wodorowe z resztą U32 w trzonie P3 oraz oddziałuje z resztą U77 z regionu pseudowęzła J4/2, który jest zaangażowany w tworzenie miejsca katalitycznego. Ważność struktury pseudowęzła potwierdziła struktura aptameru wiążącego wiomycynę [34]. Jego obecność jest konieczna dla efektywnego wiązania wiomycyny przez ten aptamer.

#### 4. DEGRADACJA KWASÓW NUKLEINOWYCH W OBECNOŚCI BACYTRACYN

Prowadzone wcześniej przez obie nasze grupy badania wiązania neomycyny B do drożdżowego tRNA<sup>Phe</sup> pokazały, że wyszczepienie hipermodyfikowanej zasady Y (wyozyiny) zlokalizowanej w pozycji 37 pętli antykodonu tRNA pozwala efektywnie przeciąć łańcuch polinukleotydu w obecności 1  $\mu\text{M}$  stężenia tego antybiotyku [35]. Zatem przypadkowa depurynacja w łańcuchu RNA, w obecności nawet niskiego stężenia antybiotyków, może prowadzić do zniszczenia funkcjonalnych RNA. Może to być ważny, niepożądany efekt wiązania antybiotyków do cząsteczek RNA.

Podczas analizy wpływu bacytracyny na funkcjonowanie rybozemu HDV, nieoczekiwanie okazało się, że degradowuje ona łańcuch RNA [36]. Cząsteczka tego cyklicznego antybiotyku polipeptydowego składa się z 10 aminokwasów: L-izoleucyna, L-leucyna, D-fenylalanina, L-cysteina, kwas L- i D-asparaginowy, D-glutaminowy, L-histydyna, L-lizyna i D-ornityna. Co ciekawe, bacytracyna degradowuje także jednoniciowe cząsteczki DNA. Zatem antybiotyk ten wykazuje podobieństwo do enzymów degradowujących kwasy nukleinowe, takich jak rybonukleaza  $T_1$  lub nukleaza  $S_1$ . Degradacja cząsteczek RNA występuje preferencyjnie po resztach guaniny, przy czym w przeciętym łańcuchu RNA grupa fosforanowa pozostaje na końcu 3'. Przypomina to zatem degradację RNA za pomocą nukleazy  $T_1$ . Ponadto, degradacja RNA, której ulegają cząsteczki o zwartej strukturze jak: rybozym HDV oraz drożdżowy tRNA<sup>Phe</sup>, przebiega efektywnie już przy niskich stężeniach antybiotyku rzędu 5  $\mu\text{M}$  i nie wymaga obecności jonów metali. Bacytracyna należy do niewielu związków degradowujących DNA, jednak w porównaniu do degradacji RNA, wymaga 10-krotnie wyższego stężenia i obecności jonów metali dwuwartościowych:  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  lub  $\text{Zn}^{2+}$ . Antybiotyk ten specyficznie degradowuje łańcuch DNA po resztach cytozyny, pozostawiając grupę fosforanową na końcu 5' łańcucha, podobnie jak nukleaza  $S_1$ . W przeciwieństwie do enzymów białkowych, antybiotyk nie traci właściwości degradowacyjnych RNA i DNA nawet po inkubacji w 100°C.

Mechanizm działania bacytracyny w degradacji kwasów nukleinowych nie został dokładnie poznany. W przypadku rybonukleazy  $T_1$ , przecięcie łańcucha RNA przebiega według mechanizmu katalizy kwasowo-zasadowej [37]. W proponowanym mechanizmie dwie reszty histydyny His40 oraz His92 działają jako kwas, natomiast reszta Glu58 działa jako zasada, co potwierdziły badania krystalograficzne. Również RNaza A, enzym efektywnie degradowujący cząsteczki RNA, wymaga dwóch histydyn, mianowicie His12 i His119, do utworzenia 2'3'-cyklicznego fosforanu, reszta Lys41 stabilizuje stan przejściowy [38]. Także 30-aminokwasowy peptyd pochodzący z N-końca palca cynkowego wymaga obecności pierścienia imidazolowego do aktywności rybonukleazy, jednakże jest on nieaktywny w stosunku do DNA [39]. Co ciekawe, wyznaczona wartość stałej szybkości reakcji cięcia dla tego peptydu jest 20-krotnie niższa niż dla bacytracyny. Podsumowując, podobne produkty cięcia oraz obecność histydyny w pozycji 10 bacytracyny czynią mechanizm

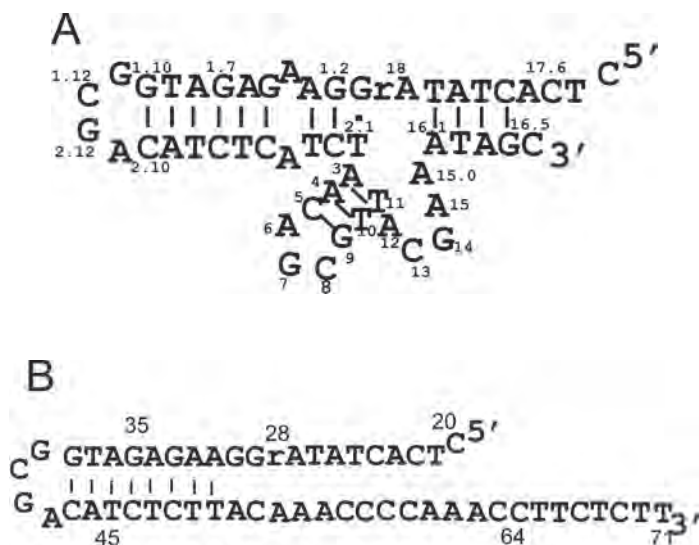
hydrolityczny obserwowany dla RNazy  $T_1$  wysoce prawdopodobny także dla bacytracyny. Natomiast w przypadku degradacji DNA mechanizm działania bacytracyny pozostaje niewyjaśniony. Najprostszą sugestią jest mechanizm reakcji wolnorodnikowej, jednakże w tym przypadku mechanizm ten nie ma miejsca. Obecność bacytracyny i  $H_2O_2$  nie miała wpływu na degradację DNA [36, 37].

## 5. DEOKSYRYBOZYMY AKTYWNE W OBECNOŚCI JONÓW KADMU ORAZ W ŚRODOWISKU O NISKIEJ WARTOŚCI PH OTRZYMANE METODĄ SELEKCJI *IN VITRO*

W trakcie realizowanego wspólnie z prof. M. Jeżowską-Bojczuk jednego z zadań projektu „Biotechnologie i zaawansowane technologie medyczne” w ramach Wrocławskiego Centrum Badań EIT+, podjęliśmy próbę otrzymania DNAzymów aktywnych w obecności jonów  $Cd^{2+}$  [40]. Jony  $Cd^{2+}$  należą do najbardziej toksycznych jonów metali z uwagi na zastępowanie jonów  $Zn^{2+}$  i  $Ca^{2+}$  w enzymach, co czyni je nieaktywnymi. Do poszukiwania DNAzymów aktywnych w obecności jonów  $Cd^{2+}$  wykorzystano metodę selekcji *in vitro*. Przygotowana biblioteka kombinatoryczna DNAzymów zawierała 23-nukleotydowy odcinek typu *random*, co odpowiadało  $7 \times 10^{13}$  różnych wariantów. Uzyskane w wyniku selekcji wszystkie aktywne katalitycznie DNAzyny należały do często spotykanej wśród DNAzymów rodziny DNAzymów 8–17 (Rys. 3a). Otrzymane DNAzyny preferowały jony  $Cd^{2+}$ , ale były aktywne w obecności jonów  $Mn^{2+}$  i  $Zn^{2+}$ , co oznacza, że miejsce koordynacji katalitycznych jonów metali nie jest wysoce specyficzne. Należy dodać, że także wcześniej uzyskane DNAzyny wykazywały szeroką specyficzność w stosunku do jonów metali [41]. Można zatem sądzić, że otrzymanie DNAzymów aktywnych tylko w obecności jednego rodzaju jonu metalu jest bardzo trudne lub niemożliwe. W naszym przypadku, wzięwszy pod uwagę aktywność katalityczną oraz selektywność, wariant 1/VIIWS wykazuje najlepsze właściwości (Rys. 3a). Ponadto, uzyskane DNAzyny były mniej aktywne w podwyższonej temperaturze, co sugeruje zmiany ich struktury przy podwyższaniu temperatury. Co ciekawe, dla jednego z wariantów, DNAzymu 15XWS, w podwyższonej temperaturze występuje nie tylko obniżenie jego aktywności, ale także zmiana preferencji w stosunku do jonów metali wymaganych do katalizy [40].

Postanowiliśmy zbadać, jak zmiany sekwencji nukleotydowej mogą wpływać na zmiany aktywności katalitycznej wybranych DNAzymów. Zwróciliśmy uwagę na zachowawcze elementy występujące w DNAzymach 8–17: nukleotyd w pozycji 12 oraz trzy pary zasad w strukturze „spinki do włosów”. Obecność puryny w pozycji 12 okazała się kluczowa dla zachowania aktywności DNAzymu 1/VIIWS, natomiast miała mały wpływ na jego preferencje co do wyboru jonów metali. Przeprowadzono także mutagenezę par zasad występujących w strukturze „spinki do włosów”. Wymiana środkowej pary zasad z A-T na C-G powodowała wzrost aktywności DNAzymu dla jonów  $Zn^{2+}$ , spadek dla jonów  $Mn^{2+}$  oraz nie zmieniła aktywności

dla jonów  $\text{Cd}^{2+}$ . Oznacza to, że wspomniane pary zasad określają właściwości katalityczne DNAzemu 1/VIIWS [40]. Wcześniejsze badania sugerowały, że wśród wspomnianych trzech par zasad, dla zachowania aktywności DNAzemu 8–17 wymagane są dwie pary typu G-C [42]. Później wykazano, że motyw zawierający jedną parę, a nawet brak pary zasad G-C jest wystarczający. Obserwacje te są zbliżone z naszymi, gdyż DNAzym 1/VII zawierający jedną parę zasad G-C w motywie „spinki do włosów” zachowuje aktywność katalityczną.



Rysunek 3. Struktura drugorzędowa DNAzymów A) Dzl1/VIIWS aktywnego w obecności jonów  $\text{Cd}^{2+}$  oraz B) Dz27WS aktywnego w niskim pH. Symbol rA oznacza ryboadenozynę

Figure 3. Secondary structure of DNAzymes A) Dzl1/VIIWS active in the presence of  $\text{Cd}^{2+}$  and B) Dz27WS active at low pH. The symbol rA denotes riboadenosine

W kolejnym etapie podjęliśmy próbę selekcji DNAzymów, stosując podczas selekcji obniżone pH rzędu 4,5 [43] (Rys. 3b). Wszystkie uzyskane DNAzemy wykazywały optimum aktywności katalitycznej w zakresie pH 4,0–4,5 i były nieaktywne przy pH wyższym niż 5,0. Jak wspomniano, DNAzemy scharakteryzowane przez nas wcześniej wymagały do swej aktywności obecności niektórych jonów metali dwuwartościowych [43]. Natomiast otrzymane DNAzemy aktywne w niskim pH oraz ich warianty nie wymagają obecności żadnych jonów metali, jako kofaktorów w reakcji katalizy. W niskich wartościach pH, w których prowadzono selekcję *in vitro*, występuje w kwasach nukleinowych rozległa protonacja zasad, głównie pozycji N1 adeniny oraz N3 cytozyny. W tych warunkach, protonowane zasady mogą zastępować jony metali w cięciu RNA przebiegającym według mechanizmu katalizy kwasowo-zasadowej. Ponadto, mogą brać udział w procesach zwijania DNAzemu w aktywną katalityczną strukturę. Badania wybranych DNAzymów technikami spektralnymi, UV oraz CD wykazały duże zmiany w ich strukturze w zakresie

pH 4,0–4,5, co pokrywa się z warunkami sprzyjającymi ich najwyższej aktywności katalitycznej. W wersji *trans* otrzymane DNAzemy, podobnie jak w wersji *cis* były najbardziej aktywne w pH około 4,5. Mutageneza miejsca cięcia wykazała znacznie wyższą aktywność w przypadku obecności puryn niż pirymidyn. Co ciekawe, znaczny spadek aktywności DNAzemu w wersji *trans* obserwowano, gdy w miejscu cięcia zamiast jednego nukleotydu typu rybo występowały dwa. Wytłumaczeniem tej obserwacji może być oddziaływanie drugiego nukleotydu z kompleksem substrat-DNAzym lub zmiany struktury substratu skutkujące niższą efektywnością cięcia. Potwierdzeniem tej sugestii są wyniki mutagenezy czterech wybranych pozycji w nici enzymu. Zmiany te skutkują zanikiem aktywności katalitycznej DNAzymów. Wynika z tego, że pH-zależne DNAzemy wymagają bardzo specyficznej architektury i są katalitycznie aktywne w ściśle określonych warunkach pH [43].

Istnieje zapotrzebowanie na nowe DNAzemy, które mogą funkcjonować w skrajnych warunkach: wysokiej temperaturze, niskim lub wysokim pH, w obecności jonów metali ciężkich. Dużą zaletą opisanych przez nas DNAzymów jest to, że są one nieaktywne przy wartościach pH zbliżonych do fizjologicznych oraz w obecności jedno- i dwuwartościowych jonów metali. Czynnikiem „uruchamiającym” ich aktywność katalityczną jest obniżenie wartości pH do zakresu 4,0–4,5. Te pH-zależne DNAzemy mogą być wykorzystane jako kasety molekularne w biotechnologii lub nanotechnologii, lub jako specyficzne narzędzia molekularne, takie jak biosensory. Takie kasety pozwalają na zmiany pod wpływem warunków środowiska i tylko ta kasetta może być wycięta z większej struktury DNA przez obniżenie wartości pH. Ponadto, *trans*-działające warianty pH-zależnych DNAzymów są stosunkowo małe, o wielkości 31 nukleotydów, co znacznie upraszcza ich syntezę i wykorzystanie. Wreszcie, pH-zależne DNAzemy mogą być stosowane do monitorowania zmian wartości pH w komórkach podczas procesów metabolicznych [43].

## UWAGI KOŃCOWE

W ramach współpracy pomiędzy Zakładem Biochemii RNA Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu oraz Zespołem Chemii Medycznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego, kierowanym przez Panią Profesor Małgorzatę Jeżowską-Bojczuk, przebadano szerokie spektrum antybiotyków oraz innych związków niskocząsteczkowych i ich kompleksów z jonami  $\text{Cu}^{2+}$ , jako potencjalnych inhibitorów reakcji katalizy rybozymów HDV. Nieoczekiwanie, okazało się, że szereg badanych związków, w zależności od warunków, wykazuje właściwości inhibujące lub stymulujące reakcję, czyli działają jako modulatory procesu katalizy RNA. Jest to obserwacja bardzo istotna, wskazująca, że również w przypadku innych procesów przebiegających z udziałem antybiotyków, zmienione warunki środowiska mogą w istotny sposób modulować ich właściwości.

Stwierdzono, że efekt stymulacji/inhibicji aktywności katalitycznej rybozymu HDV jest ściśle związany ze stopniem protonacji badanych antybiotyków w danych



warunkach. Zdolność do inhibicji wzrasta przy tym ze zwiększeniem ładunku antybiotyku np. po związaniu kationu metalu. Natomiast w środowisku o wyższym pH antybiotyki zazwyczaj stymulują reakcję cięcia, gdyż jak można sądzić, wolne są przynajmniej niektóre ich centra azotowe, zdolne do uczestniczenia w reakcji katalizy, jako akceptory-donory protonu bądź miejsca koordynacji katalitycznego jonu metalu. Ważną rolę odgrywa przy tym położenie antybiotyków w cząsteczce rybozemu oraz to, jak ułożone są ich grupy funkcyjne w obrębie jego centrum katalitycznego.

W trakcie badań jednego z antybiotyków – bacytracyny, jako potencjalnego inhibitora reakcji katalizy rybozymów HDV, zaobserwowano, że wykazuje on właściwości nukleolityczne. Bacytracyna jest nukleazą degradującą obydwa rodzaje kwasów nukleinowych, RNA i DNA. Zdolność bacytracyny do degradowania cząsteczek RNA była obserwacją zaskakującą, bowiem szereg antybiotyków pochodzących z różnych grup terapeutycznych, badanych wcześniej, nie wykazywało podobnych właściwości. Bardzo ważne jest to, że degradacja RNA zachodzi już przy niskim stężeniu antybiotyku, w zakresie mikromolarnym, porównywalnym ze stężeniami, jakie oznaczono w osoczu krwi pacjentów poddawanych leczeniu tym lekiem. Odkrycie hydrolitycznych właściwości bacytracyny rozszerzyło także potencjalne zastosowania tego antybiotyku w terapii antywirusowej, do niszczenia w komórce niepożądanych kwasów nukleinowych.

Do poszukiwania DNAzymów katalizujących hydrolizę RNA wykorzystano metodę selekcji *in vitro*. W eksperymencie selekcji, mającym na celu otrzymanie DNAzymów aktywnych w obecności jonów  $\text{Cd}^{2+}$ , otrzymano warianty należące do wcześniej opisanej w literaturze rodziny DNAzymów 8–17. Analiza ich właściwości w obecności szerokiego spektrum jonów dwuwartościowych pokazała, że nie tylko jony  $\text{Cd}^{2+}$ , ale także  $\text{Zn}^{2+}$  i  $\text{Mn}^{2+}$  wspierają katalizę. Oznacza to, że miejsce koordynacji jonów metali nie jest wysoce specyficzne i że selekcja DNAzymów aktywnych tylko w obecności jednego rodzaju jonu metalu jest bardzo trudna lub niemożliwa. DNAzyny otrzymane w drugim eksperymencie selekcji wykazywały optimum aktywności katalitycznej w zakresie pH 4,0–4,5 i były nieaktywne przy pH wyższym niż 5,0. Co interesujące, nie wymagają obecności żadnych jonów metali, jako kofaktorów w reakcji katalizy. Przypuszczalnie, w niskich wartościach pH protonowane zasady mogą zastępować jony metali w cięciu RNA, przebiegającym według mechanizmu katalizy kwasowo-zasadowej. Otrzymane wyniki poszerzają repertuar DNAzymów, które działają w warunkach niefizjologicznych i przynoszą nowe informacje na temat możliwych mechanizmów reakcji katalizowanych przez kwasy nukleinowe.

## PODZIĘKOWANIA

Autorzy artykułu pragną podziękować pracownikom Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu oraz Wydziału Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego, zaangażowanym w realizację przedstawionych badań za wieloletnią współpracę.

Ponadto, dziękujemy Komitetowi Badań Naukowych, Narodowemu Centrum Nauki oraz Wrocławskiemu Centrum Badań EIT+ za wsparcie finansowe. Publikacja współfinansowana ze środków przyznanych przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego w ramach dotacji KNOW.

#### PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] K. Kruger, P. Grabowski, A. Zaug, J. Sands, E. Gottschling, T. Cech, *Cell*, 1982, **31**, 147.
- [2] C. Guerrier-Takada, K. Gardiner, T. Marsh, N. Pace, S. Altman, *Cell*, 1983, **35**, 849.
- [3] R. Symons, *Annu. Rev. Biochem.*, 1992, **61**, 641.
- [4] J. Buzayan, W. Gerlach, G. Bruening, *Nature*, 1986, **323**, 349.
- [5] B. Saville, R. Collins, *Cell*, 1990, **61**, 685.
- [6] I.-H. Shih, M. Been, *Annu. Rev. Biochem.*, 2002, **71**, 887.
- [7] R. Jimenez, J. Polanco, A. Lupták, *Trends Biochem. Sci.*, 2015, **40**, 649.
- [8] R. Breaker, G. Joyce, *Chem. Biol.*, 1995, **2**, 655.
- [9] D. Baum, S. Silverman, *Cell. Mol. Life Sci.*, 2008, **65**, 2156.
- [10] M. Kuo, L. Sharmeen, G. Dinter-Gottlieb, *J. Taylor J. Virol.*, 1988, **62**, 4439.
- [11] M. Łęgievicz, J. Ciesiołka, *Post. Biochemii*, 2004, **50**, 19.
- [12] M. Lai, *Annu. Rev. Biochem.*, 1995, **64**, 259.
- [13] D. Lazinski, *J. Taylor, RNA*, 1995, **1**, 225.
- [14] M. Matysiak, J. Wrzesinski, J. Ciesiołka, *J. Mol. Biol.*, **291**, 283.
- [15] A. Perrota, M. Been, *Nucleic Acids Res.*, 1990, **18**, 6821.
- [16] A. Ferré-D'Amaré, K. Zhou, J. Doudna, *Nature*, 1998, **395**, 567.
- [17] A. Ke, K. Zhou, F. Ding, J. Cate, J. Doudna, *Nature*, 2004 **429**, 201.
- [18] B. Golden, *Biochemistry*, 2011 **50**, 9424.
- [19] J. Wrzesinski, M. Łęgievicz, B. Smólska, J. Ciesiołka, *Nucleic Acids Res.*, 2001, **29**, 4482.
- [20] M. Łęgievicz, A. Wichłacz, B. Brzezicha, J. Ciesiołka, *Nucleic Acids Res.*, 2006, **34**, 1270.
- [21] A. Yonath, *Annu. Rev. Biochem.*, 2005, **74**, 649.
- [22] F. Walter, Q. Vicens, E. Westhof, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 1999, **3**, 694.
- [23] J. Wrzesinski, M. Brzezowska, W. Szczepanik, M. Jeżowska-Bojczuk, J. Ciesiołka, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2006, **349**, 1394.
- [24] N. Gaggelli, J. Nagaj, W. Szczepanik, J. Ciesiołka, J. Wrzesinski, A. Górńska, E. Gaggelli, G. Valensin, M. Jeżowska-Bojczuk, *J. Inorg. Biochem.*, 2013, **124**, 26.
- [25] M. Wrońska, J. Wrzesinski, M. Jeżowska-Bojczuk, W. Szczepanik, R. Starosta, M. Barys, Z. Ciunik, J. Ciesiołka, *J. Inorg. Chem.*, 2012, **108**, 62.
- [26] J. Wrzesinski, L. Błaszczuk, M. Wrońska, A. Kasproicz, K. Stokowa-Sołtys, J. Nagaj, M. Szafraniec, T. Kulinski, M. Jeżowska-Bojczuk, *J. Ciesiołka, FEBS J*, 2013, **280**, 2652.
- [27] J. Rogers, A. Chang, U. von Ahsen, R. Schroeder, J. Davies, *J. Mol. Biol.*, 1996, **259**, 916.
- [28] E. Gaggelli, N. Gaggelli, E. Molteni, G. Valensin, D. Balenci, M. Wrońska, W. Szczepanik, J. Nagaj, J. Skąła, M. Jeżowska-Bojczuk, *Dalton Trans.*, 2010, **39**, 9830.
- [29] R. Stanley, G. Blaha, R. Grodzicki, M. Strickler, T. Steitz, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2010, **17**, 289.
- [30] H. Wank, J. Rogers, J. Davies and R. Schroeder, *J. Mol. Biol.*, 1994, **236**, 1001.
- [31] J. Olive, D. De Abreu, T. Rastogi, A. Andersen, A. Mittermaier, T. Beattie, R. Collins, *EMBO J*, 1995, **14**, 3247.
- [32] M. Szafraniec, K. Stokowa-Sołtys, J. Nagaj, A. Kasproicz, J. Wrzesinski, M. Jeżowska-Bojczuk, *J. Ciesiołka, Dalton Trans.*, 2012 **41**, 9728.

- [33] K. Stokowa-Sołtys, N. Nuno, M. Barbosa, A. Kasproicz, R. Wieczorek, N. Gaggelli, D. Gaggelli, G. Valensin, J. Wrzesinski, J. Ciesiołka, T. Kuliński, W. Szczepanik, M. Jeżowska-Bojczuk, *Dalton Trans.*, 2016, **45**, 8645.
- [34] M. Wallis, B. Streicher, H. Wankl, U. von Ahsen, E. Clod, S. Wallace, M. Famulok, R. Schroeder, *Chem. Biol.*, 1997, **4**, 357.
- [35] J. Wrzesinski, W. Szczepanik, J. Ciesiołka, M. Jeżowska-Bojczuk, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2005, **331**, 267.
- [36] J. Ciesiołka, M. Jeżowska-Bojczuk, J. Wrzesiński, K. Stokowa-Sołtys, J. Nagaj, A. Kasproicz, L. Błaszczuk, W. Szczepanik, *Biochim. Biophys. Acta*, 2014, **1840**, 1782.
- [37] J. Steyaert, *Eur. J. Biochem.*, 1997, **247**, 1.
- [38] C. Cuchillo, M. Nogués, R. Raines, *Biochemistry*, 2011, **50**, 7835.
- [39] W. Lima, S. Crooke, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1999, **96**, 10010.
- [40] A. Kasproicz, K. Stokowa-Sołtys, J. Wrzesiński, M. Jeżowska-Bojczuk, J. Ciesiołka, *Dalton Trans.*, 2015, **44**, 8138.
- [41] A. Peracchi, M. Bonaccio, M. Clerici, *J. Mol. Biol.*, 2005, **352**, 783.
- [42] S. Santoro, G. Joyce, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1997, **94**, 4262.
- [43] A. Kasproicz, K. Stokowa-Sołtys, M. Jeżowska-Bojczuk, J. Wrzesinski, J. Ciesiołka, *Chemistry-Open*, 2017, **6**, 46.

Praca wpłynęła do Redakcji 4 czerwca 2018



**BADANIA NANOKOMPOZYTÓW  
HYDROKSYAPATYTOWYCH WOBEC BAKTERII  
BEZTLENOWYCH**

**INVESTIGATIONS OF HYDROXYAPATITE  
NANOCOMPOSITES AGAINST ANAEROBIC  
BACTERIA**

**Anna Kędziora<sup>1</sup>, Agata Bernat<sup>1</sup>, Rafał Jakub Wigłusz<sup>2\*</sup>**

<sup>1</sup> *Uniwersytet Wrocławski, Wydział Nauk Biologicznych,  
Instytut Genetyki i Mikrobiologii*

*ul. Przybyszewskiego 63-68, 51-148 Wrocław*

<sup>2</sup> *Instytut Niskich Temperatur i Badań Strukturalnych, Polska Akademia Nauk  
ul. Okólna 2, 50-422 Wrocław*

*\*e-mail: r.wiglusz@intibs.pl*

---

*Pracę dedykujemy pamięci Pani Profesor Małgorzaty Jeżowskiej-Bojczuk*

---

Abstract

1. Wstęp; 1.1. Bakterie beztlenowe w organizmie człowieka; 1.1.1. Komórka tlenowa i beztlenowa  
1.1.2. Beztlenowa mikroflora człowieka; 1.1.3. Patogeneza zakażeń; 1.2. Diagnostyka infekcji  
powodowanych bakteriami beztlenowymi; 1.3. Potencjalne możliwości zastosowania bakterii  
beztlenowych w medycynie; 1.4. Chorobotwórczość badanych gatunków; 1.4.1. *Prevotella bivia*;  
1.4.2. *Parabacteroides distasonis*; 1.5. Hydroksyapatyty i ich biofunkcjonalizacja oraz potencjalne  
zastosowanie; 1.5.1. Antybiotyki w inżynierii biomateriałowej: metronidazol i tinidazol; 1.5.2.  
Jony i nanocząsteczki srebra w inżynierii biomateriałowej

2. Materiały i metody; 2.1. Podłoża i warunki hodowli; 2.2. Testowane gatunki bakterii; 2.3. Testo-  
wane związki antybakteryjne; 2.4. Liza krwi końskiej; 2.5. Przechowywanie szczepów bakterii; 2.6.  
Przygotowanie szeregu mikrorozcieńczeń związków antybakteryjnych; 2.7. Inokulacja i inkubacja  
płytki titracyjnej; 2.8. Odczyt wyników

Wyniki i dyskusja

Podziękowania

Piśmiennictwo cytowane

---

**Anna Kędziora**, dr nauk biologicznych, wieloletni pracownik naukowo-dydaktyczny Wydziału Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego. Jej zainteresowania naukowe obejmują przede wszystkim sposoby oddziaływania nanomateriałów na komórkę bakterii oraz znaczenie srebra w terapii antybakteryjnej.

**Agata Bernat**, mgr mikrobiologii, absolwentka studiów magisterskich na kierunku Mikrobiologia na Wydziale Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego. Podczas studiów uczestniczyła w badaniach związanych z wrażliwością bakterii beztlenowych na bionanokompozyty apatytowe.

**Rafał Jakub Wiglusz** jest profesorem nadzwyczajnym w Instytucie Niskich Temperatur i Badań Strukturalnych PAN we Wrocławiu. W 1999 roku ukończył Wydziału Matematyki-Fizyki-Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego (specjalność Chemia Środowiska). Doktorat obronił w 2004 roku na temat syntezy i spektroskopii związków lantanowców. W 2005–2006 przebywał jako post-doc na Uniwersytecie w Kolonii. Obecnie prowadzi badania biokompozytów na bazie nanoapatytów przeznaczonych do teranostyki.

## ABSTRACT

Nanocrystalline apatites  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  (HAp) non-doped and doped with  $\text{Ag}^+$  and  $\text{Eu}^{3+}$  ions were synthesized by different wet chemistry methods. The obtained hydroxyapatite was loaded with  $\text{Ag}^0$ , as well as nitroimidazole antimicrobials: metronidazole and tinidazole. The antimicrobial activity of the obtained materials against *Prevotella bivia* and *Parabacteroides distasonis* was studied. The method used for the antibacterial susceptibility testing was broth microdilution, according to the CLSI – Clinical and Laboratory Standard Institute – standard M11-A8; agar Schaedler, enriched with 50% LHB - Lysed Horse Blood, was used as a medium for culturing strains. The antibacterial activity increased for the immobilized antibiotics – HAp doped with metronidazole and tinidazole was six times more bactericidal than non-immobilised metronidazole for both clinical isolates. In comparison with non-immobilised tinidazole, HAp immobilised with tinidazole was six thousand times more effective against *P. distasonis* and two hundred times more effective against *P. bivia*. HAp doped with tetracycline was over two times more bactericidal than tetracycline non-immobilised (according to the literature data). The exact MIC for bionanocomposites of HAp and silver was not obtained. The research shows that bionanocomposites of hydroxyapatite are good drug carriers for both antibiotics and silver particles and ions. The use of bionanocomposites of apatite immobilised with antibiotics in dentistry could result in a prolonged antibacterial activity of these compounds.

Keywords: nanotechnology, hydroxyapatite, endodontics, anaerobic bacteria

Słowa kluczowe: nanotechnologia, hydroksyapatyt, endodoncja, bakterie beztłenowe

---

---

## 1. WSTĘP

### 1.1. BAKTERIE BEZTLENOWE W ORGANIZMIE CZŁOWIEKA

#### 1.1.1. KOMÓRKA TIENOWA A BEZTLENOWA

Podstawową różnicą w metabolizmie bakterii obligatoryjnie beztlenowych i tlenowych jest fakt, że bakterie beztlenowe nie potrafią wykorzystywać tlenu, jako akceptora elektronów w procesie wytwarzania energii (ATP). Obecność tlenu jest dla nich toksyczna (wyjątkiem są tzw. beztlenowce aerotolerancyjne, np. z rodzaju *Clostridium* spp., które choć nie wykorzystują tlenu w swoim metabolizmie, tolerują jego obecność przez określony czas). Z kolei metabolizm bakterii tlenowych opiera się na wykorzystaniu tej cząsteczki przy udziale oksydaz, jako końcowego akceptora elektronów. Bakterie względnie beztlenowe są formą pośrednią; ich wzrost można zaobserwować zarówno w warunkach tlenowych, jak i przy braku tlenu – jest to przystosowanie do zmiennych warunków środowiska i polega na przechodzeniu z metabolizmu tlenowego na beztlenowy i odwrotnie [1]. Adaptacja ta wiąże się z koniecznością syntezy nowych enzymów przez komórkę [2]. Gdy w środowisku występuje tlen, u bakterii beztlenowych dochodzi do szoku oksydacyjnego; tlen powoduje nagromadzenie reaktywnych form tlenu (ang. *reactive oxygen species*, ROS). Wśród nich wyróżnia się: anionorodnik ponadtlenkowy, nadtlenek wodoru, rodnik hydroksylowy. Bakterie beztlenowe nie są w stanie pozbyć się ROS z komórki, ze względu na brak u zdecydowanej większości z nich enzymów detoksykacyjnych, tj. dysmutaza ponadtlenkowa, katalaza, peroksydaza [3, 4]. Bakterie beztlenowe mogą przetrwać ekspozycję na tlen, jeśli posiadają alternatywny system rozkładu ROS bez wytwarzania tlenu. System ten może być kodowany na operonie sor-rub; jest złożony z białek Sor (reduktaza ponadtlenkowa, ang. *superoxide reductase*) i Rbr (rubrerytryna) [5]. Bakterie beztlenowe mogą pozyskiwać energię w procesie fosforylacji substratowej przez fermentację węglowodanów, a najważniejszą reakcją w tym procesie jest przekształcanie aldehydu 3-fosfoglicerynowego do pirogronianu przez kinazę pirogronianową [1]. Fermentacja jest procesem katabolicznym, w którym związek organiczny jest zarówno donorem, jak i akceptorem elektronów [6], z tego właśnie względu, że nie występuje zewnętrzny czynnik utleniający [7]. Beztlenowce mogą także uzyskiwać energię w procesie oddychania beztlenowego, które jest procesem katabolicznym, wykorzystującym fosforylację oksydacyjną i alternatywne akceptory elektronów [6]. W oddychaniu beztlenowym (w przeciwieństwie do tlenowego) łańcuch oddechowy jest krótszy [8], a końcowym akceptorem elektronów nie jest tlen, ale może to być:  $\text{NO}^{3-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{S}^0$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{AsO}_4^{3-}$ ,  $\text{SeO}_4^{2-}$ ,  $\text{ClO}_4^-$ ,  $\text{ClO}_3^-$ , fumaran, dimetylosulfotlenek lub tlenek tri metyloaminy [5]. Oddychanie beztlenowe jest bardziej wydajne niż fermentacja, ale mniej wydajne niż oddychanie tlenowe [8].



### 1.1.2. Beztlenowa mikroflora człowieka

Bakterie beztlenowe występują licznie w organizmie człowieka, jako główny składnik mikroflory błon śluzowych; znacznie przewyższają liczebnie bakterie tlenowe zarówno w jamie ustnej (100:1), jak i w układzie pokarmowym (1000:1). W Tabeli 1 przedstawiono najczęściej występujące gatunki beztlenowe w wybranych partiach organizmu człowieka.

Tabela 1. Beztlenowa mikroflora człowieka (w oparciu o: [1, 4, 9] )

Table 1. Anaerobic microflora of the human body [1, 4, 9]

Miejsce występowania	Wybrane rodzaje bakterii beztlenowych
Górne drogi oddechowe i jama ustna	<i>Fusobacterium spp.</i> <i>Prevotella spp.</i> <i>Porphyromonas spp.</i> <i>Peptostreptococcus spp.</i>
Przewód pokarmowy	<i>Bacteroides spp.</i> <i>Clostridium spp.</i> <i>Peptostreptococcus spp.</i> <i>Lactobacillus spp.</i> <i>Bifidobacterium spp.</i>
Skóra	<i>Propionibacterium spp.</i> <i>Peptostreptococcus spp.</i>
Pochwa	<i>Bacteroides spp.</i> <i>Clostridium spp.</i> <i>Peptostreptococcus spp.</i> <i>Lactobacillus spp.</i> <i>Prevotella spp.</i>

Jama ustna jest złożonym i heterogennym środowiskiem dla mikroorganizmów. Ślina zawiera co prawda składniki odżywcze niezbędne do wzrostu mikroorganizmów, jednak występują one w niewielkich stężeniach. Jest ona źródłem substancji bakteriobójczych tj. lizozym, laktooperoksydaza. Korzystniejsze warunki do przeżycia bakterie znajdują w okolicy zębów i dziąseł. W pierwszym roku życia człowieka mikroflora jamy ustnej składa się głównie z bakterii beztlenowych aero-tolerancyjnych oraz bakterii tlenowych, natomiast po pojawieniu się zębów równowaga mikroflory przesuwana się w stronę organizmów obligatoryjnie beztlenowych, które zasiedlają powierzchnię zębów i kieszeń przyzębia [6]. Jako składnik mikroflory jelita grubego, beztlenowce pełnią główną rolę w fermentacji polisacharydów, których organizm człowieka sam nie potrafi katabolizować. Produktami tej fermentacji są m. in. ditlenek węgla, wodór, krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe (octan, propionian, maślan). Te ostatnie są absorbowane przez komórki jelita i zużywane jako źródło węgla i energii [9, 10]. Bakterie beztlenowe pełnią także rolę w rozwoju błon śluzowych układu immunologicznego [11]. Odpowiadają za syntezę witamin i aminokwasów, transformują żółć [10].

Ostatnie badania pokazują, że beztlenowa mikroflora jelit różni się u osób otyłych i szczupłych, prawdopodobnie ze względu na różnice w diecie. Analiza 16S rRNA wykazała, że mikroflora otyłych myszy i ludzi różni się od mikroflory osobników nieotyłych stosunkiem występowania obligatoryjnie beztlenowych bakterii z typu *Bacteroidetes* do typu *Firmicutes*. U ludzi i myszy otyłych występowały wyższe proporcje *Firmicutes* niż *Bacteroidetes*. Co więcej, sterylne myszy (nie posiadające żadnych bakterii jelitowych), skolonizowane bakteriami z typu *Firmicutes*, przytyły w trakcie trwania eksperymentu więcej; niż sterylne myszy skolonizowane bakteriami z typu *Bacteroidetes*. Zakłada się, że jest to związane z wydajnością fermentacji, która jest wyższa u *Firmicutes* [12].

### 1.1.3. Patogeneza zakażeń

Ze względu na powszechność występowania bakterii beztlenowych w organizmie człowieka, mogą one być przyczyną infekcji endogennych. Wybrane chorobotwórcze bakterie beztlenowe i związan z nimi zakażenia przedstawiono w Tabeli 2.

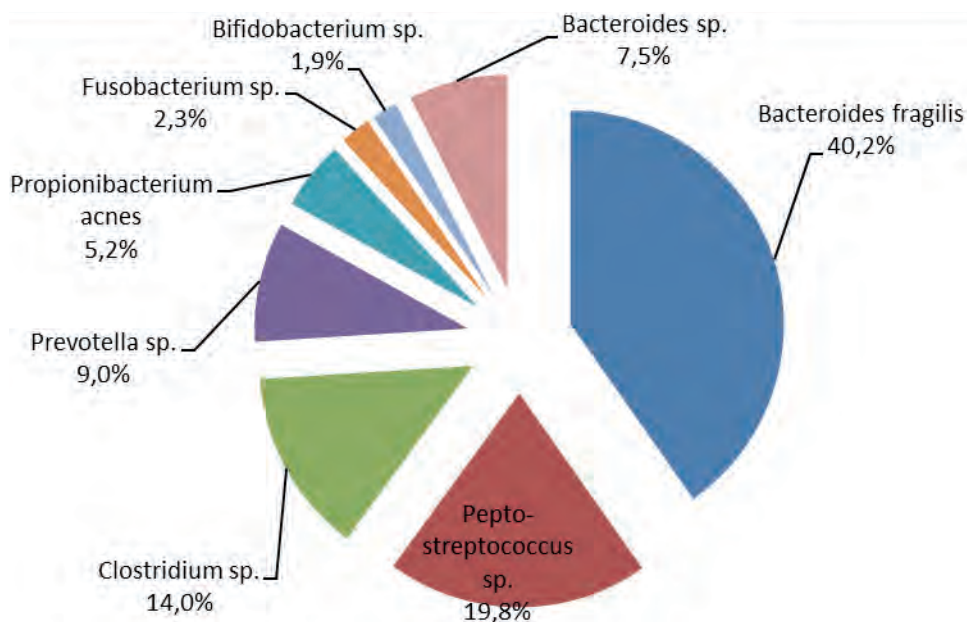
Zakażenia mogą być mieszane, czyli powodowane przez dwa lub więcej gatunków – tylko bakterii beztlenowych lub razem z gatunkami tlenowymi, jak np. w przypadku zakażeń wewnątrz jamy brzusznej, położniczo-ginekologicznych, infekcji stopy cukrzycowej [13], przewlekłego zapalenia zatok, ucha środkowego, anginy Ludwiga, ropni przyzębia [14]. Infekcje mieszane są szczególnie niebezpieczne, ze względu na wymianę informacji genetycznej pomiędzy gatunkami tlenowymi i beztlenowymi, a tym samym ich większą wirulencję i oporność na antybiotyki [9].

Tabela 2. Wybrane chorobotwórcze bakterie beztlenowe i związan z nimi zakażenia [4]  
Table 2. Selected anaerobic bacteria and their infections [4]

Gatunek	Zakażenie
<i>Clostridium difficile</i>	Biegunka poantybiotykowa, rzekomoblaniaste zapalenie jelit
<i>Actinomyces spp.</i>	Zlokalizowane zakażenia jamy ustnej, promienica
<i>Propionibacterium spp.</i>	Trądzik, zapalenie kanalików łzowych, zakażenia oportunistyczne
<i>Mobiluncus spp.</i>	Bakteryjna waginoza, zakażenia oportunistyczne
<i>Lactobacillus spp.</i>	Zapalenie wsierdzia, zakażenia oportunistyczne
<i>Eubacterium spp.</i>	Zakażenia oportunistyczne
<i>Bifidobacterium spp.</i>	Zakażenia oportunistyczne
<i>Bacteroides fragilis</i>	Zakażenia jamy brzusznej, skóry, tkanek miękkich, bakteriemia
<i>Fusobacterium spp.</i>	Zakażenia jamy ustnej, bakteriemia
<i>Prevotella bivia</i>	Zakażenia jamy ustnej, przewlekłe zapalenie zatok i uszu, ropnie mózgu, zakażenia ginekologiczne

Gatunek	Zakażenie
<i>Prevotella melaninogenica</i>	Zakażenia jamy ustnej, przewlekłe zapalenie zatok i uszu, ropnie mózgu, zakażenia jamy brzusznej

Badania pokazują, że liczba zarówno tlenowych, jak i beztlenowych izolatów z miejsca mieszanych infekcji wynosiła od 1 do 5 patogenów, średnio 3,7 z próbki; z kolei organizmów tylko beztlenowych znajdowano średnio 1 na próbkę. Najczęściej izolowaną z organizmu pacjentów bakterią beztlenową jest *B. fragilis* (40,2% przypadków) (Rys. 1). Tlenowce, które często towarzyszą zakażeniom bakteriami beztlenowymi, to najczęściej *E. coli* (41,8%), *S. aureus* (7,5%) i *K. pneumoniae* (7,5%) [14]. Procentowy rozkład izolatów bakterii beztlenowych pobranych od 3260 pacjentów przedstawiono na Rysunku 1.



Rysunek 1. Procentowy rozkład izolatów bakterii beztlenowych, pobranych od 3260 pacjentów (materiały własne, w oparciu o: [14])

Figure 1. Percentage distribution of anaerobic bacterial isolates, obtained from 3260 patients, according to Y. Park et. al. [14]

Infekcje beztlenowcami powstają często jako choroby oportunistyczne (występujące u osób z obniżoną odpornością, np. po antybiotykoterapii, zabiegach chirurgicznych, immunosupresji, w trakcie ciąży, w podeszłym wieku) i/lub wtedy, kiedy zaburzona zostaje równowaga mikrobiomu jelitowego [14].

Oportunistyczną chorobą powodowaną przez beztlenowe *Clostridium difficile* jest m.in. rzekomobłoniaste zapalenie jelit. W następstwie antybiotykoterapii lekami o szerokim zakresie działania (głównie klindamycyną) zaburzona zostaje

naturalna beztlenowa mikroflora jelita grubego i dochodzi do niekontrolowanego namnożenia *C. difficile* (naturalnie opornego na klindamycynę) w świetle jelita (tzw. oportunistyczna dominacja). Produkowane toksyny CDTA i CDTB prowadzą do powstania biegunki i stanu zapalnego.

Innym przykładem oportunistycznego beztlenowego patogenu może być *Bacteroides fragilis*, bytujący w jelicie grubym człowieka. Staje się on niebezpieczny, gdy dostaje się do krwiobiegu człowieka. Może to nastąpić np. wskutek pooperacyjnych uszkodzeń jelita lub innych urazów zaburzających integralność tkanek. Kiedy bakteria ta dostaje się do krwiobiegu, powoduje szereg schorzeń, m. in. ropnie, bakterie, ropnie, ropnie [9]. Bakteriemia powodowana *B. fragilis* może być uznana za chorobę typu „*emerging*” [9]; choroba ta nie była dotąd znana, ponieważ nie przeprowadzono rutynowej hodowli w kierunku beztlenowców z próbek krwi pacjentów. Rozwój bakterii z tego gatunku trwa kilka dni, w przeciwieństwie do bakterii powodowanej przez *E. coli*, która rozwija się w kilkanaście godzin i szybko może doprowadzić do śmierci pacjenta. Po opracowaniu skutecznej terapii dla pacjentów z infekcją krwi powodowaną przez *E. coli* okazało się, że krew tych pacjentów wciąż była zainfekowana bakteriami. Po czasie okazało się, że terapia ta, mimo że skuteczna wobec *E. coli*, nie miała wpływu na oporny gatunek beztlenowy *B. fragilis*, co prowadziło do powstania infekcji krwi przez *B. fragilis*. Posocznica powodowana przez *E. coli* jest w stanie zabić pacjenta o wiele szybciej niż powolnie rozwijająca się infekcja krwi z udziałem *B. fragilis*. Innym powodem, dla którego nie znano wcześniej tej choroby, jest fakt, że aż do lat 70. XX w. nie sądzono, że jakiegokolwiek bakterie beztlenowe są w stanie przeżyć (jak się wydawało) tlenowym środowisku ludzkich tkanek i krwi. Nie brano jednak pod uwagę regionów martwej tkanki, które w szybkim tempie są pozbawione tlenu ze względu na utratę krwi. Takie beztlenowe środowisko może wystąpić nawet w płucach [9], np. w przypadku zachłystowego zapalenia płuc, ropniaka, ale najczęściej ropnia płuc, którego bakterie beztlenowe są przyczyną nawet w 80% przypadków, z przewagą izolatów *Prevotella melaninogenica*, *Fusarium nucleatum*, *Peptostreptococcus spp.* [15]. Zdrowa mikroflora jamy ustnej składa się głównie z fakultatywnie beztlenowych bakterii gram dodatnich, głównie ziarniaków (*Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*). W chorobach przyzębia równowaga ta zostaje zachwiana i w miejscu styku zębów z dziąsłem (tzw. kieszeń przyzębia), gdzie środowisko jest beztlenowe, dochodzi do rozrostu gramujemnych obligatoryjnie beztlenowych pałeczek, np. *Porphyromonas gingivalis* czy *Prevotella spp.* Gatunki te występują jako flora jamy ustnej, tworząc biofilmy. Produkują proteazy i inne enzymy degradujące tkankę, co może doprowadzić do reakcji zapalnej i w efekcie do chorób dziąseł, a nawet utraty uzębienia u dorosłych [6, 9].

Naukowcy sugerują, że inny gatunek zaangażowany w choroby przyzębia, *Fusobacterium nucleatum* (gramujemny, obligatoryjny beztlenowiec), może być jednym z czynników odpowiedzialnych za wywołanie przedwczesnego porodu (tzn. przed 37 tygodniem ciąży). Hipoteza zakłada, że przez tkankę zapalną dziąseł bakteria dostaje się do krwiobiegu i przenosi się razem z krwią do łożyska. Tam powoduje

stan zapalny, przez co dziecko rodzi się przedwcześnie. Inne źródła podają, że bakterie jamy ustnej wywołujące zapalenie dziąseł (np. *Fusobacterium nucleatum subsp. polymorphum*, *Prevotella oulorum*) mogą dostać się do krwiobiegu powodując stan zapalny naczyń krwionośnych, prowadząc do powstania chorób serca [9]. Uważa się także, że codzienne mycie zębów znacznie zmniejsza ryzyko takich powikłań i jest bezpieczniejsze i mniej kosztowne niż profilaktyczne stosowanie antybiotykoterapii, którą zaleca się tylko pacjentom z kategorii wysokiego ryzyka (chorującym przewlekle, po inwazyjnych zabiegach chirurgicznych z ryzykiem wystąpienia bakteriemii, u osób z niedoborami odporności) [16, 17].

## 1.2. DIAGNOSTYKA INFEKCI POWODOWANYCH BAKTERIAMI BEZTLENOWYMI

Diagnostyka w kierunku bakterii beztlenowych nie jest łatwa, ze względu na trudności hodowlane – bakterie beztlenowe mają wysokie wymagania wzrostowe. Wymagają obecności czynników wzrostu oraz obniżonego potencjału oksydoredukcyjnego [3]. Ponadto cechują się długim czasem generacji (hodowla *in vitro* w temperaturze 37°C trwa zazwyczaj od 48h do kilku dni, a nawet tygodni). Izolacja materiału z zainfekowanych lub zmienionych chorobowo miejsc wymaga odpowiednich metod transportu i przechowywania próbek [18]. Z tych powodów hodowla laboratoryjna beztlenowców jest kosztowna i nierzadko nie przynosi rezultatów. Badania często należy wielokrotnie powtarzać, a każdy posiew niesie ryzyko zanieczyszczenia próbki tlenowcami lub względnymi beztlenowcami, z uwagi na stosowane bogate media hodowlane. Diagnostyka infekcji powodowanych bakteriami beztlenowymi możliwa jest dopiero po kilku dniach, dlatego terapia celowana opóźniona jest w czasie. Leczenia nie ułatwia też fakt, że oporność bakterii na środki bakteriobójcze stale rośnie. W ciągu ostatnich trzydziestu lat znacznie zmalała wrażliwość bakterii beztlenowych na antybiotyki, zwłaszcza z grupy *Bacteroides* (wykaz bakterii należących do tej grupy zamieszczono w Tabeli 3). Pojawiła się oporność nawet na najbardziej aktywne antybiotyki, tj. imipenem, piperacylina-tazobaktam, tigeicyklina, ampicylina-sulbaktam oraz metronidazol [19]. CLSI rekomenduje dwie metody badania lekowrażliwości bakterii beztlenowych: rozcieńczeń w agarze lub mikrorozcieńczeń w bulionie. Metoda mikrorozcieńczeń nie jest zalecana dla bakterii bardziej wymagających czy wolnorosnących, ponieważ może dawać niespójne i niezetelne wyniki z powodu słabego wzrostu mikroorganizmów, co powodowane jest nadmierną ekspozycją na tlen w części procedury. Stąd CLSI zaleca metodę mikrorozcieńczeń tylko dla bakterii z grupy *Bacteroides* oraz dla *C. perfringens*, które rosną stosunkowo szybko (ok. 48 h) i przeżywają ekspozycje na tlen (choć nie-możliwa jest ich hodowla w warunkach tlenowych). Metoda rozcieńczeń w agarze nie ma takich zastrzeżeń, pozwala na badanie wielu gatunków beztlenowych [19].

### 1.3. POTENCJALNE MOŻLIWOŚCI ZASTOSOWANIA BAKTERII BEZTLENOWYCH W MEDYCYNIE

Na przełomie XIX i XX wieku u pacjentów z gangreną powodowaną przez *Clostridium sp.* zaobserwowano spontaniczną regresję nowotworu. Nieliczne przeprowadzane próby kliniczne nie wykazywały jednak dużej wartości onkolizy przeprowadzanej przez *Clostridium sp.* Obecnie rozwój genetyki molekularnej i idące za tym modyfikacje genomów bakteryjnych pozwalają na zastosowanie terapii celowanej bakteriami beztlenowymi, jako jednej z metod zwalczania nowotworów. Użyciu beztlenowców sprzyja fakt, że w tkance nowotworowej panuje beztlenowe środowisko, w przeciwieństwie do tkanek zdrowych [20].

Kandydatem do wykorzystania w terapii nowotworowej jest także niepatogeny beztlenowiec *Bifidobacterium bifidum*. Gatunek ten, zawieszony w PBS i wstrzyknięty myszom z chorobą nowotworową nie powodował dodatkowych symptomów, a ponadto znikał ze zdrowych tkanek i organów w ciągu 48–96 h, następnie kumulując się i namnażając jedynie w tkance nowotworowej. Kolejne badania z użyciem metod molekularnych pozwoliły na wprowadzenie do plazmidu *Bifidobacterium longum* genów kodujących deaminazę cytozyny, która odpowiada za przekształcenie 5-fluorocytozyny – podawanego pacjentowi doustnie leku przeciwgrzybiczego – w 5-fluorouracyl, lek antynowotworowy; pierwsze próby przeprowadzane na modelach zwierzęcych (myszy, szczury, małpy) wykazały skuteczność i brak efektów ubocznych takiej terapii [20].

Jedną z proponowanych strategii terapeutycznych przeciwko chorobom zapalnym jelit (ang. *inflammatory bowel disease*, IBD) jest doustne podawanie fragmentowanych bakterii probiotycznych. Udowodniono, że specyficzne beztlenowe lizaty *P. distasonis* i składniki jego komórki mają właściwości antyzapalne. Zmniejszają produkcję cytokin prozapalnych, jak np. TNF- $\alpha$ , produkowany przez makrofagi, także IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$ . Podawanie fragmentów bakterii jest bezpieczniejsze niż podawanie żywych bakterii, zwłaszcza dla pacjentów poważnie chorych lub z obniżoną odpornością. Może zatem stanowić nowe podejście kliniczne wobec chronicznych zapaleń jelit [11].

### 1.4. CHOROBOTWÓRCZOŚĆ BADANYCH GATUNKÓW

#### 1.4.1. *Prevotella bivia*

Obligatoryjnie beztlenowy gatunek *Prevotella bivia* (dawniej znany jako *Bacteroides bivius* [21]) to gramujemna, niepigmentująca pałeczka, która występuje w jamie ustnej, gdzie może być przyczyną chorób przyzębia [22]. Rodzaj *Prevotella spp.* bierze udział w rozprzestrzenianiu się oporności na antybiotyki, głównie beta-

-laktamy (najczęściej przepisywane w medycynie i stomatologii) wśród bakterii występujących w jamie ustnej, a także w przestrzeni poddąsłowej. Wraz z *Fusobacterium sp.* stanowią główne źródło beta-laktamaz [23, 24]. Jest składnikiem naturalnej mikroflory dolnych partii układu rozrodczego. Rośnie obficie w obecności estrogenu [22, 25]. Ma zdolność adherencji i inwazji do komórek epitelium szyjki macicy, a co za tym idzie, jest zdolna powodować zakażenie wewnątrzmaciczne. Kojarzona z bakteryjną waginozą (izolowana od 44% chorych). Jest także izolowana z krwi pacjentów urodzonych przez cesarskie cięcie oraz u pacjentów ze zdiagnozowanym ostrym zapaleniem narządów miednicy mniejszej [4, 26]. Infekcja *P. bivia* zwiększa ryzyko przedwczesnego porodu u ciężarnych kobiet, co związane jest ze zwiększoną produkcją prostaglandyn [27]. Może także powodować choroby u mężczyzn, np. ropnie prącia [24].

Poza układem moczowo-płciowym, zanotowano także przypadki izolacji tego gatunku z wysięku w opłucnej i ropniaków [21], a także z kości, stawów, z łożyska paznokcia, z męskich narządów rozrodczych, a także z wsierdzia [27]. Nielezione infekcje *P. bivia* prowadzą do poważnych schorzeń, m.in. martwiczego zapalenia powięzi, zapalenia szpiku lub septycznego zapalenia stawów [22]. *P. bivia* izolowana jest z miejsc zakażenia jako jedyny patogen lub w powiązaniu z innymi (względny lub obligatoryjnymi) beztlenowcami (infekcje mieszane), np. *Bacteroides sp.*, *Porphyromonas sp.*, *Gardnerella vaginalis*, *Streptococcus constellatus* [27]. *P. bivia* i *G. vaginalis* wykazują symbiotyczną zależność i często powodują mieszane infekcje (oba gatunki izolowane są razem u 59,1% kobiet z bakteryjną waginozą, oraz u 3,9% kobiet zdrowych; oba gatunki często są znajdowane u pacjentek z rakiem szyjki macicy). Patogenność *P. bivia* wzrasta przy obecności względnych beztlenowców [26] oraz tlenowców [24]. Uznawana jest ona za późnego kolonizatora, w przypadku bakteryjnych waginoz [28]. Z drugiej strony obecność naturalnej flory pochwy, np. rodzaju *Lactobacillus*, hamuje wzrost *P. bivia* [27]. *Lactobacillus* wykorzystuje flawoproteiny w reakcji utleniania, prowadzącej do powstania nadtlenu wodoru. *P. bivia* nie ma peroksydazy katalazy, nie jest zatem w stanie wyeliminować ze środowiska toksycznego dla niej nadtlenu wodoru [29].

*P. bivia* moduluje ekspresję prozapalnych cytokin, aktywuje produkcję lizosomalnych enzymów i zwiększa fagocytozę. Oprócz tego produkuje sjalidazy, które degradują mucyny i zwiększają adherencję bakterii, a także uszkadzają odpowiedź zależną od przeciwciał IgA, skierowaną przeciwko wydzielanym przez bakterie cytotoksynom [30]. Zwykle jest wrażliwa na klindamycynę, metronidazol, imipenem i amoksycylinę z kwasem klawulonowym [24].

#### 1.4.2. *Parabacteroides distasonis*

*P. distasonis* jest gramujemną, obligatoryjnie beztlenową pałeczką, oporną na żółć, niesporulującą. Występuje w jelicie grubym człowieka, jako naturalna mikroflora, jest jednym z dwóch (obok *B. thetaiotamicron*) dominujących gatunków

beztlenowych gatunków gram ujemnych [4]. Po dostaniu się do krwiobiegu może powodować stany patologiczne, zarówno bakteriemię, jak i ropnie wewnętrzne (w jamie brzusznej, mózgu, wątrobie, płucach) [31]. Jego wzrost stymulowany jest przez 20% żółć. Posiada zdolność hydrolizy eskuliny [4, 24].

*P. distasonis* jest fenotypowo podobny do *Bacteroides sensu stricto*, ale filogenetyczne różnice dotyczące budowy metachinonu (jedna z form witaminy K, produkowana przez bakterie w jelitach, niezbędna w procesie tworzenia skrzepów) spowodowały zaklasyfikowanie go do rodzaju *Parabacteroides*, a nie *Bacteroides* [31]. *P. distasonis* wywołuje zapalne stany jelit (np. choroba Leśniowskiego-Crohna, wrzodziejące zapalenie okrężnicy), a także infekcje krwi [11].

### 1.5. HYDROKSYAPATYTY I ICH BIOFUNKCJONALIZACJA ORAZ POTENCJALNE ZASTOSOWANIE

Minerał apatyt jest fosforanem wapnia (ang. *calcium phosphate*, CaP), tworzącym agregaty mineralne, zwane fosforytami. Światowe zasoby fosforytów są duże, choć nierównomiernie rozmieszczone. W zależności od stężenia jonów  $\text{OH}^-$ ,  $\text{F}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ , mamy do czynienia odpowiednio z: hydroksy-, fluoro- oraz chlorapatytami [32].



Rysunek 2. Schemat przedstawiający zastosowania hydroksyapatytów w medycynie [32]

Figure 2. Schematic illustration of medical applications of hydroxyapatite [32]

Obecnie apatyty wykorzystywane są szeroko w jubilerstwie, rolnictwie, elektrotechnice, kosmetyce i przemyśle [33], rzadziej w genetyce (do transfekcji) [34], jednak



najważniejsze jest ich zastosowanie w medycynie, farmacji i stomatologii [32]. Stanowią obiecujący materiał do zastosowania biomedycznego, ze względu na swoją wysoką specyficzność i czułość; są nietoksyczne [35, 36]. Jednak ze względu na ich słabe właściwości mechaniczne (kruchość i brak elastyczności), stosowanie hydroksyapatytu jako substytutu kości jest ograniczone do miejsc, w których nie będzie on poddany zbyt dużemu naciskowi [32, 37]. Schemat przedstawiający zastosowania hydroksyapatytów w medycynie przedstawiono na Rysunku 2.

Fosforany wapnia są głównym nieorganicznym składnikiem kości oraz szkliwa zębów. Nieorganiczne składniki kości zawierają kryształy hydroksyapatytów (HAp, ang. *hydroxyapatite*) o wzorze sumarycznym:  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , o długości 100 nm, szerokości 20–30 nm i grubości 3–6 nm [38]. HAp stanowią ok. 60-70% składu kości [39]. Naturalne HAp i syntetyczne HAp różnią się strukturą chemiczną i właściwościami. Większość syntetycznych HAp jest stechiometryczna, a bioapatyty cechują się występowaniem innych jonów, głównie  $\text{CO}_3^{2-}$  (także  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{F}^-$ ). Stosunek Ca/P (atomów wapnia do atomów fosforu) w kościach jest niższy, w porównaniu do syntetycznych HAp. Wartość ta ma znaczenie jeśli chodzi o adhezję komórek, proliferację oraz remodelowanie i formowanie kości [40].

Bioapatyty stanowią nawet do 98% szkliwa zębów (pozostałe składniki to woda i związki organiczne, stanowiące 1–3% szkliwa) i aż do 50% dentyny (oraz ok. 30% związków organicznych i ok. 20% wody) [34]. Ponieważ HAp powstają w trakcie biomineralizacji w organizmie człowieka, wprowadzone do organizmu z zewnątrz nie wywołują nadmiernej reakcji immunologicznej. Dzięki tej biokompatybilności z tkankami człowieka, stosowane są jako nośniki leków [35], elementy plomb, implantów czy protez [32]. Znajdują zastosowanie w inżynierii tkankowej, planuje się także użycie ich jako markerów, np. w obrazowaniu fluorescencyjnym, przy udziale jonów europu [38].

Oprócz biokompatybilności i zdolności do biodegradacji, HAp wykazują się także optymalne dla zastosowania w nanomedycynie właściwości mechaniczne (Tab. 3), zwłaszcza jeśli chodzi o ich sztywność i twardość, podatność na biodegradację oraz wchłanianie (bioresorpcja, ang. *bioresorbability*). Tempo ich bioresorpcji może być zaprojektowane w zależności od rozpuszczalności lub warunków pH w organellach komórkowych, co np. umożliwi stopniowe uwalnianie aktywnej substancji, którą są one domieszkowane. Nanomateriały HAp mają porowatą strukturę, co jest korzystne przy domieszkowaniu, ze względu na większą powierzchnię oraz obecność nanokanalików, które mogą pomieścić dużą ilość substancji aktywnej, a następnie ją stopniowo uwalniać, np. pod wpływem zmian pH [38].

HAp są w stanie poprawiać właściwości metalowych implantów. Użycie takich materiałów ma swoje ograniczenia ze względu na możliwość uwalniania toksycznych jonów metali wskutek korozji; formowanie słabych wiązań chemicznych z kośćmi; ich kruchość i nieoptymalne właściwości mechaniczne. Hydroksyapatyty zapobiegają korozji poprzez tworzenie bariery ochronnej przeciwko rozpuszczeniu jonów metali, a mocne wiązania z kośćmi sprzyjają ich regeneracji [41]. Metalowe

implanty, w przeciwieństwie do HAp, nie są wchłaniane ani aktywne biologicznie, a po pewnym czasie się zużywają i należy je wymienić chirurgicznie [42]. Aktywność biologiczna HAp polega na tym, że w warunkach *in vivo* tworzą bezpośrednie wiązanie pomiędzy implantem a kością (osseointegracja), co wspomaga odbudowę kości w celu ułatwienia procesu gojenia [34, 43]. Właściwości cząstek fosforanów w wymiarze nano i mikro/makro porównano w Tabeli 3.

Tabela 3. Porównanie właściwości cząstek fosforanów wapnia nano-, mikro- i makrowymiarze [34, 44]  
Table 3. Comparison of the hydroxyapatite properties in nano, micro and macro scales [34, 44]

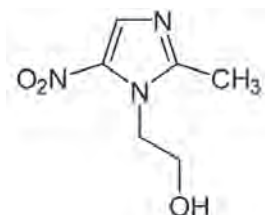
Nanocząstki CaP	Mikro-, makrocząstki CaP
Resorpcja podobna jak u bioapatytów obecnych w kościach	Resorpcja różni się od resorpcji kości
Może inhibować demineralizację	Nie ma wpływu na demineralizację
Duży stosunek powierzchni do objętości dzięki porowatej strukturze	Niewielki stosunek powierzchni do objętości
Większa bioaktywność (zwiększona osseointegracja i większa adhezja osteoblastów)	Mniejsza bioaktywność
Większa rozpuszczalność, a tym samym bioresorpcja <i>in vivo</i>	Mniejsza rozpuszczalność i bioresorpcja
Możliwość rozwoju w roztworze (np. dojrzewanie) podobne do rozwoju kości	Stabilność
Wyższa spiekalność	Mniejsza podatność na spiekanie
Bardziej szorstkie	Mniej chropowate
Lepsze zwilżanie (mniejszy kąt zwilżania)	Słabe zwilżanie (większy kąt zwilżania)
Średnica porów ok. 6,6 Å	Średnica porów ok. 19,8–31 Å
Większa adsorpcja substancji	Mniejsza adsorpcja substancji

Ostatnie badania wykazują, że hydroksyapatyty mogą inhibować wzrost komórek nowotworowych [37]. Mechanizm działania przeciwnowotworowego nie jest jeszcze dobrze poznany, ale uważa się, że ma on związek z endocytozą przez komórki nowotworowe, a także z inhibicją syntezy białek poprzez akumulację HAp w retikulum endoplazmatycznym [38]. Nanocząsteczki HAp (w przeciwieństwie do mikrocząsteczek) mogą silnie indukować apoptozę komórek wątrobiaka, stąd rozważa się jego potencjalne zastosowanie jako środka przeciwnowotworowego [45]. Hydroksyapatyty nie posiadają właściwości antybakteryjnych, dlatego po znalezieniu się nanomateriałów hydroksyapatytowych w organizmie może nastąpić adhezja biofilmu do powierzchni HAp [43]. Związki te jednak mogą łatwo ulec nasyceniu różnymi antybakteryjnymi substancjami (np. lekami, antybiotykami) lub jonami srebra, dzięki swojej mikroporowatej strukturze [32]. Apatyty mogą akceptować zarówno kationowe, jak i anionowe domieszki [37]. Implanty o właściwościach antybakteryjnych zmniejszają czas leczenia pacjenta i zwiększają wydajność terapii przez zmniejszanie środków ubocznych leczenia [43]. W inżynierii biomateriałowej stosuje się także jony magnezu, w celu polepszenia osseointegracji (zespoleńca wszczepu z kością), z kolei jony manganu sprzyjają proliferacji osteoblastów i zwiększają

szają biokompatybilność związku [32]. Aby poprawić siłę mechaniczną hydroksyapatytów, domieszkuje się je cynkiem, strontem, tytanem [37].

### 1.5.1. Antybiotyki w inżynierii biomateriałowej: metronidazol i tinidazol

Właściwości bakteriobójcze może nadać hydroksyapatytom domieszkowanie czynnikami o charakterze antybakteryjnym, np. antybiotykami, takimi jak metronidazol i tidazol z grupy 5-nitroimidazoli (strukturę chemiczną metronidazolu przedstawiono na Rysunku 3.) [46]. Jest to antybiotyk znany od lat 50. XX w., początkowo wykorzystywany do leczenia zakażeń pierwotniakami. Dopiero po 10 latach zorientowano się, że ma on także szerokie działanie bójcze wobec bakterii beztlenowych [47]. Wynika to z tego, że substancja ta jest aktywna tylko przy niskim potencjale oksydoredukcyjnym w środowisku [7]. Jest jednym z najczęściej używanych antybiotyków w periodontologii, w leczeniu chorób przyzębia [23], a także w przypadku chorób zapalnych jelit [47], a także profilaktycznie - w zabiegach chirurgicznych jelit (ochrona przed oportunistycznymi zakażeniami składnikami mikroflory) [7].



Rysunek 3. Chemiczna struktura metronidazolu  
Figure 3. Chemical structure of metronidazole

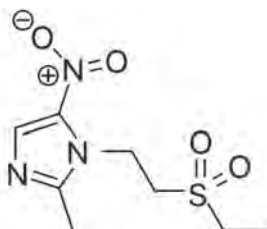
Metronidazol wnika do komórki bakteryjnej, gdzie następuje jego aktywacja i rozpad na mniejsze cząsteczki przez proces redukcji grupy nitrowej leku. Proces ten przeprowadzają składniki transportu elektronów, np. ferredoksyny. Powstające w ten sposób cytotoksyczne pochodne działają destrukcyjnie na materiał genetyczny, wprowadzając cięcia w DNA lub RNA, co powoduje śmierć komórki [7, 48].

Oporność na metronidazol wynika z syntezy przez bakterie pomp efflux lub z rozkładu antybiotyku, ale nie na cytotoksyczne pochodne lecz na nietoksyczne dla komórki bakteryjnej cząsteczki. Oporność na metronidazol wiąże się z obecnością genów *nim* (*nimA*, *nimB*, *nimC*, *nimD*), które kodują reduktazę nitroimidazolu [23]. Przeprowadza ona redukcję 5-nitroimidazolu do 5-amino pochodnych [48].

Innym antybiotykiem z grupy 5-nitroimidazoli, stosowanym zamiennie z metronidazolem, jest tinidazol (strukturę chemiczną przedstawiono na Rysunku 4). Używany jest w leczeniu chorób jamy ustnej zarówno pierwotniaczych, jak i bakteryjnych – skuteczny wobec *Bacteroides spp.*, *G. vaginalis*, *Prevotella spp.* [46].

Jego mechanizm działania jest taki sam jak u innych 5-nitroimidazoli, tzn. *in vivo* następuje rozpad związku na mniejsze cząsteczki o właściwościach cytotok-

sycznych. Efektem działania tych pochodnych jest kowalencyjne ich przyłączenie do DNA, co skutkuje utratą struktury helisy, a tym samym utratą funkcji i przerwaniem nici, w efekcie powodując śmierć komórki [49].



Rysunek 4. Chemiczna struktura tinidazolu  
Figure 4. Chemical structure of tinidazole

Tinidazol, w porównaniu do metronidazolu, jest lepiej tolerowany przez pacjentów, ma dwa razy dłuższy okres półtrwania (12–14 h, dzięki czemu wystarczy zażywać go raz dziennie [50]) i ma mniej szkodliwe skutki uboczne (metronidazol może powodować ataksję, zawroty głowy, konwulsje, neuropatię obwodową, nudności, wymioty, metaliczny posmak, anoreksję, biegunkę [18]). Ze względu na farmakokinetykę tinidazolu, rozważa się stosowanie go jako leku pierwszego wyboru, mając przy tym na uwadze badania pokazujące wyższy wskaźnik wyleczeń pacjentów w terapii tinidazolem (w porównaniu do metronidazolu), np. w leczeniu bakteryjnych waginoz [49, 51]. Tinidazol potencjalnie może być stosowany w leczeniu infekcji szczepami opornymi na metronidazol [49].

### 1.5.2. Jony i nanocząstki srebra w inżynierii biomateriałowej

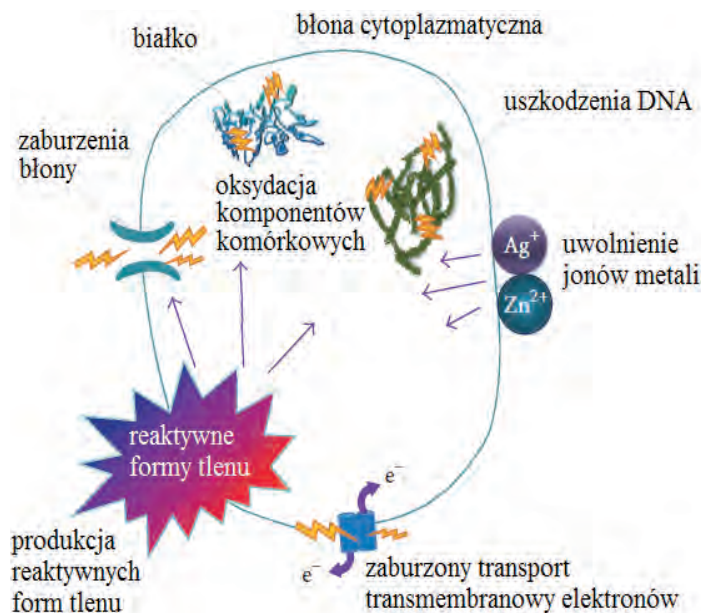
W celu nadania materiałom właściwości bakteriobójczych, wykorzystuje się jony srebra, cynku lub miedzi, jako składników domieszkujących apatyty [32, 35]. Substytuty jonowe mogą wpływać na strukturę kryształów, krystaliczność, ładunek powierzchniowy, rozpuszczalność i inne właściwości, prowadząc do zmian w wydajności [37].

Zaletą stosowania srebra jest fakt, że nie obserwuje się występowania reakcji alergicznej na srebro, w przeciwieństwie do antybiotyków. Także pojawienie się wśród bakterii oporności na srebro nie jest tak częste, jak w przypadku antybiotyków, zwłaszcza jeśli stosuje się jego biokompozyty [53]. Obecność srebra na powłoce HAp zapobiega adhezji bakterii do implantów, co jest kluczowe, zwłaszcza w ciągu pierwszych tygodni od zabiegu chirurgicznego, kiedy ryzyko zakażenia jest największe. Potem właściwości bakteriobójcze materiału znacznie maleją [52].

Mechanizm działania wymienionych jonów polega na wnikanii do wnętrza komórki bakteryjnej i wpływu na syntezę ATP oraz zaburzenie syntezy DNA. Inny mechanizm polega na gromadzeniu jonów w ścianie komórkowej bakterii, w efekcie

zmienia się jej przepuszczalność – stopniowe uwalnianie białek i lipopolisacharydów. Zaburzenie transportu substancji ostatecznie prowadzi do śmierci komórki. Trzeci mechanizm działania tych jonów opiera się na indukcji ROS, które łączą się z elementami błony i ściany komórkowej, a także organelli wewnętrznych, prowadząc do nieodwracalnych zmian [32].

Jony srebra wykazują działanie hamujące wzrost bakterii przez wiązanie z grupami tiolowymi –S-H w białkach, prowadząc do powstania wiązania –S-Ag. W efekcie dochodzi do denaturacji białek ważnych pod względem funkcjonalnym i strukturalnym. Ponadto jony srebra hamują replikację DNA w komórce, zwiększając produkcję ROS. W efekcie ich działania ściana komórkowa ulega obkurczeniu, a jednocześnie zwiększa się jej przepuszczalność, co doprowadza do wypływu zawartości komórki i powoduje jej śmierć. Ze względu na różnice w budowie ściany komórkowej bakterii, Ag:HAp działają efektywniej na bakterie gram-ujemne niż na gram-dodatnie. Badania wykazały, że Ag:HAp mogą być toksyczne nie tylko w stosunku do mikroorganizmów, ale i wobec komórek ssaków hamując ich wzrost. Należy zatem tak dobrać stężenie jonów, aby wykazały jak najwyższą skuteczność wobec patogenów i jak najmniejszą toksyczność dla człowieka [32, 54].

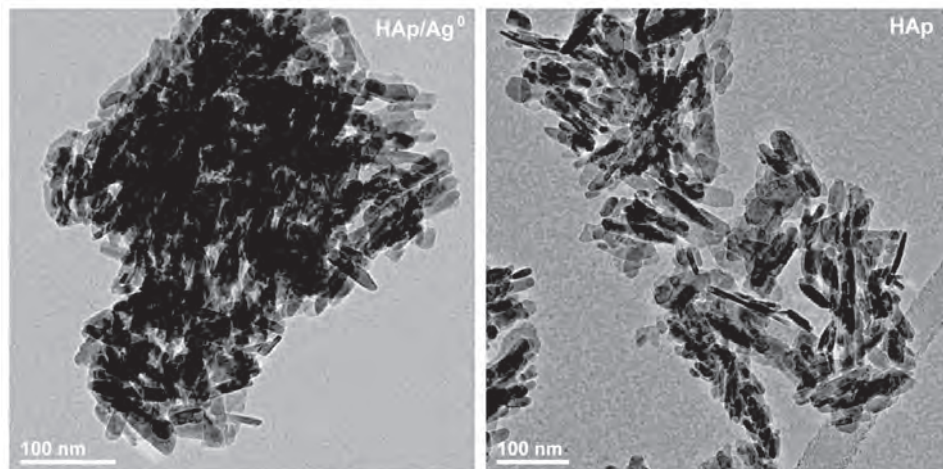


Rysunek 5. Schemat antybakteryjnego działania nanocząstek i jonów [32]

Figure 5. Proposed mode of antimicrobial activity of nanoparticles and metal ions [32]

Hydroksyapatyty można domieszkować nie tylko jonami, ale pokrywać je nanocząsteczkami srebra [55]. Takie biokompozyty cechują się większą rozpuszczalnością. Podobnie jak jony srebra, mają one aktywność bakteriobójczą, a dodatkowo przyspieszają gojenie ran. Nanocząsteczki srebra (AgNPs), w porównaniu do jonów

srebra, mają mniejszą toksyczność dla człowieka, większy stosunek powierzchni do objętości i cechują się wyższą bakteriobójczością. Niektóre badania jednak sugerują, że AgNPs mogą wchodzić w interakcje z mitochondriami lub szlakiem indukcji apoptozy, co może być cytotoksyczne [56].



Rysunek 6. Zdjęcia z transmisyjnego mikroskopu elektronowego, przedstawiające hydroksyapatyt (HAp) oraz próbkę hydroksyapatytu z imobilizowanym srebrem (HAp/Ag<sup>0</sup>) [55]

Figure 6. TEM images of hydroxyapatite (HAp) and hydroxyapatite immobilised with silver (HAp/Ag<sup>0</sup>) [55]

Badania zarówno na gramujemnych, jak i na gramodatnich bakteriach wykazały, że AgNPs są bardziej wydajne (jeśli chodzi o właściwości antybakteryjne); mają ok. 1,4–1,9 razy silniejsze działanie antybakteryjne niż jony srebra [53].

Właściwości antybakteryjne AgNPs opierają się na niszczeniu błon bakteryjnych, inhibicji replikacji DNA (poprzez powodowanie jego kondensacji), inhibicji syntezy białek lub ich właściwości enzymatycznych (poprzez interakcję srebra z grupami tiolowymi), oraz przez zmiany w reakcjach oddychania komórkowego [53]. Mechanizmy te działają synergicznie, co skutkuje niewielką opornością bakterii na AgNPs; co więcej: AgNPs mogą z tego względu stanowić skuteczną metodę eradykacji biofilmów. Ponadto, AgNPs mają działanie przeciwwirusowe i przeciwzapalne, co jest kolejną zaletą w porównaniu z antybiotykami [56]. Schemat antybakteryjnego działania nanosrebra przedstawiono na Rysunku 6.

Rozmiar i kształt AgNPs mają duży wpływ na ich aktywność bakteriobójczą. Im mniejsza jest cząsteczka, tym większy jest jej stosunek powierzchni do objętości, tym samym są one bardziej efektywne w działaniu przeciwbakteryjnym. AgNPs o kształcie trójkątnym (ang. *triangular*) inhibują wzrost bakterii w mniejszych stężeniach niż sferyczne AgNPs (ang. *spherical*), a najslabszą aktywnością cechują się cząsteczki o kształcie rurek (ang. *nanorods*) [53].

Nanocząsteczki znajdują obecnie zastosowanie w produkcji implantów naczyniowo-sercowych, cewników do wkłucia centralnego, cewników neurochirurgicznych, cementu kostnego i opatrunków [56]. Badania wykazały, że cement kostny zawierający nanosrebro ma największą aktywność bakteriobójczą, w porównaniu do cementu domieszkowanego gentamycyną i cementu niedomieszkowanego. Wykazano również, że dobrym materiałem stabilizującym nanocząsteczki srebra jest tiopronina, która ani nie wpływa na właściwości cementu, ani na cytotoksyczność [52].

## 2. MATERIAŁY I METODY

### 2.1. PODŁOŻA I WARUNKI HODOWLI

Do izolacji i hodowli bakterii beztlenowych, ze względu na ich wysokie wymagania odżywcze, zostały użyte podłoża firmy Biomerieux: Agar Brucella (BBA) z krwią, SCS Agar Schaedlera z 5% krwi baraniej, bulion Schaedlera z witaminą K3 oraz używany do izolacji i hodowli bakterii tlenowych Columbia Agar z krwią (COS), których skład przedstawiono w Tabelach 4–7. Do wzbogacenia bulionu SCS użyto 50% lizatu krwi końskiej (LHB 50%), przygotowanego z jałowej krwi końskiej otrzymanej z firmy ProAnimali.

Tabela 4. Skład podłoża stałego SCS wg danych producenta

Table 4. Composition of SCS medium

Składnik	Zawartość
Pepton kazeinowy (wołowy)	5,7 g
Pepton sojowy	1 g
Pepton mięsny (wołowy lub wieprzowy)	5 g
Wyciąg drożdżowy	5 g
Dekstroza	5,83 g
Chlorek sodu	1,7 g
Tris (hydroksymetylo) aminometan	3 g
Hemina (wołowa lub wieprzowa)	0,01 g
L-cystyna	0,40 g
Witamina K3 (menadion)	0,0005 g
Agar	13,5 g
Krew (barania)	50 ml
Oczyszczona woda	1 l

Tabela 5. Skład podłoża stałego BBA wg danych producenta  
Table 5. Compositions of BBA medium

Składnik	Zawartość
Pepton kazeinowy (wołowy)	10 g
Pepton mięsny (wołowy lub wieprzowy)	10 g
Wyciąg drożdżowy	2 g
Glukoza	1 g
Chlorek sodu	5 g
Wodorosiarczyn sodu	0,1 g
Hemina (wieprzowa)	0,005 g
Witamina K1	0,001 g
Agar	15 g
Krew (barania)	50 ml
Oczyszczona woda	1 l

Tabela 6. Skład podłoża stałego COS wg danych producenta  
Table 6. Composition of COS medium

Składnik	Zawartość
Pepton mięsny i kazeinowy (wołowy lub wieprzowy)	10 g
Hydrolizat białek zwierzęcych (wołowy lub wieprzowy)	10 g
Wyciąg sercowy (wołowy lub wieprzowy)	3 g
Skrobia kukurydziana	1 g
Chlorek sodu	5 g
Agar	13,5 g
Krew (barania)	50 ml
Oczyszczona woda	1 l

Tabela 7. Skład bulionu SCS wg danych producenta  
Table 7. Composition of SCS broth

Składnik	Zawartość
Pepton kazeinowy (wołowy)	8,2 g
Glukoza	5,8 g
Wyciąg drożdżowy	5 g
Tris (hydroksymetylo) aminometan	3 g
Pepton mięsny (wołowy lub wieprzowy)	2,5 g
Chlorek sodu	1,7 g
Pepton sojowy	1 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,8 g
L-cysteina	0,4 g
Hemina (wieprzowa)	0,01 g
Witamina K3	0,5 g
Oczyszczona woda	1 l

W celu uzyskania atmosfery beztlenowej, posłużono się generatorami do hodowli bakterii beztlenowych firmy Biomerieux: GENboxanaer i GENbox CO<sub>2</sub> (Tab. 8), umieszczanych w GENbagach firmy Biomerieux. Hodowla odbywała się w cieplarni laboratoryjnej, w temperaturze 36°C ±1.



Tabela 8. Teoretyczny skład atmosfery uzyskiwanej w GENbagu dzięki zastosowaniu GENboksów w oparciu o dane producenta

Table 8. Composition of the atmosphere after GENbag usage

	Stężenie tlenu	Stężenie dwutlenku węgla
GENboxanaer	< 0,1% po 2,5 h	> 15% po 24 h
GENbox CO <sub>2</sub>	Nie występuje	Od 3,5 do 9% po 24 h

Przechowywanie hodowli w zamrożeniu odbywało się w probówkach CRYO-BILLES firmy Biomerieux, przy użyciu zamrażarek laboratoryjnych RevCo, utrzymujących temperaturę  $-70^{\circ}\text{C}$ .

## 2.2. TESTOWANE GATUNKI BAKTERII

Badane gatunki bakterii beztlenowych *Prevotella bivia* i *Parabacteroides distasonis* to szczepy kliniczne, wyizolowane z kanałów zębowych.

*Prevotella bivia* na podłożu BBA rośnie w postaci drobnych, białych, okrągłych kolonii, o średnicy około 0,5 do 1,5 mm, równym brzegu i kruchej konsystencji. Powierzchnia kolonii jest gładka i błyszcząca, lekko wzniesiona ponad powierzchnię płytki.

*Parabacteroides distasonis* tworzy na podłożu BBA bardzo drobne, nieprzejrzyste, gładkie i błyszczące kolonie o średnicy ok. 0,3 mm, nieprzekraczającej 1 mm, i charakterystycznym nieprzyjemnym zapachu.

## 2.3. TESTOWANE ZWIĄZKI ANTYBAKTERYJNE

Związki chemiczne, na których działanie wystawiano bakterie, zostały zsyntezowane w Instytucie Niskich Temperatur i Badań Strukturalnych Państwowej Akademii Nauk we Wrocławiu. Ich nazwy oraz charakterystykę makroskopową zebrano w Tabeli 9.

Tabela 9. Związki antybakteryjne zastosowane w badaniach  
Table 9. The tested antibacterial compounds

Nazwa związku	Opis wyglądu
Metronidazol	Biały proszek
Tinidazol	Biały proszek
Metronidazol + HAp	Biały proszek
Tinidazol + HAp	Biały proszek
Ag <sub>0</sub> + HAp	Brązowo-szary proszek
Ag <sup>+</sup> + cytrynian sodu + HAp	Szary proszek
Ag 5% + HAp	Biały proszek
Ag 5% + Eu 1% + HAp	Biały proszek

Oznaczenia: HAp – hydroksyapatyt; Ag – srebro, Eu<sup>3+</sup> – jon europu.

#### 2.4. LIZA KRWI KOŃSKIEJ

Krew końska została użyta w badaniach w celu wzbogacenia bulionu SCS i poprawienia warunków hodowli bakterii bezwzględnie beztlenowych. Przygotowana była według procedury CLSI (M7, sekcja 7.1 z 2007r.). Krew (100 ml) pobraną od zwierzęcia do chwili przystąpienia do przygotowywania lizatu przechowywano w temperaturze 4°C. W celu optymalizacji procesu lizy komórek, krew przeniesiono w objętości 20 ml do pięciu jałowych falkonów i zamrożono w -20°C na 24 h. Następnie przeprowadzono lizę elementów morfotycznych krwi przez naprzemienne rozmrażanie (2–4 h) i ponowne zamrażanie (24 h). Procedurę przeprowadzono siedmiokrotnie.

Efektywność lizy sprawdzono mikroskopowo przygotowując preparat mokry i obserwując pod mikroskopem świetlnym. Brak widocznych elementów morfotycznych (erytrocytów) pozwolił na zakończenie procesu lizy. W kolejnym kroku do każdego falkonu dodano 50 ml wody miliQ, w celu rozcieńczenia krwi w stosunku 1:1. Tak otrzymany roztwór przemieszano kilkukrotnie poprzez inwersję. Po szczelnym zamknięciu, falkony zwirowano w 5000 rpm przez 30 minut. Następnie ostrożnie, nie naruszając osadu, rozlano supernatant po 4 ml do jałowych próbek. Tak przygotowane próby przechowywano w temperaturze -20°C. Pozostały we falkonach osad został zutyliczowany zgodnie z procedurą utylizacji materiałów medycznych.

#### 2.5. PRZECHOWYWANIE SZCZEPÓW BAKTERII

Po inokulacji świeżej (18–24 godzinnej) hodowli do próbówki CRYO-BILLES i ich zawieszeniu i adhezji (przez kilkakrotne odwrócenie próbówki) do porowatych kulek polistyrenowych, usunięto nadmiar obecnego w niej płynu kriokonserwacyjnego. Po szczelnym zamknięciu próbówki, szczepy przechowywano w temperaturze -70°C. W warunkach aseptycznych, po otwarciu próbówki, pobierano zęą od

jednej do pięciu kulek polistyrenowych bezpośrednio na podłoża stałe lub płynne. Po rozproszaniu bakterii po podłożu BBA lub SCS, płytki inkubowano w 37°C przez 48–72 h w warunkach beztlenowych, zapewnionych obecnością GENboxu w szczelnie zamkniętym GENbagu. W celu weryfikacji czystości szczepu i aseptyczności pracy, równolegle zakładano hodowlę kontrolną w warunkach tlenowych, tj. na pożywce COS, którą inkubowano w 37°C przez 24–72 h; brak wzrostu bakterii na pożywce COS potwierdzał brak zanieczyszczeń bakteriami tlenowymi lub względnymi beztlenowcami. Analogicznie do wyżej opisanej procedury, hodowlę odmładzano także z powodzeniem z płytek przechowywanych w GENbagu, w temperaturze 4°C.

## 2.6. PRZYGOTOWANIE SZEREGU MIKROROZCIEŃCZEŃ ZWIĄZKÓW ANTYBAKTERYJNYCH

Metodyka pracy opiera się na normie CLSI M11-A8 [19], która opisuje referencyjne procedury dla określenia minimalnego stężenia hamującego wzrost (MIC) dla bakterii beztlenowych metodą rozcieńczeń w agarze lub mikrorozcieńczeń w bulionie. Pierwszym krokiem jest odważenie badanej substancji tak, aby stworzyć roztwór w bulionie o dwukrotnie wyższym stężeniu niż pożądane. Tak przygotowany roztwór może być użyty do utworzenia kolejnych rozcieńczeń w postępie geometrycznym (schemat postępowania przedstawiony w Tabeli 10 i 11).

Tabela 10. Schemat szeregu rozcieńczeń

Table 10. Schematic prepared dilution

Nr próbówki	Początkowa objętość [ml]	Pobrana ze źródła objętość roztworu [ml]	Końcowa objętość [ml]	Źródło	Końcowe rozcieńczenie
0 (stock)	3	Nd.	3	Nd.	Nd.
1	1	1	2	Stock	1:1
2	1,5	0,5	2	Stock	1:3
3	3,5	0,5	4	Stock	1:7
4	1	1	2	Próbówka 3	1:1
5	1,5	0,5	2	Próbówka 3	1:3
6	3,5	0,5	4	Próbówka 3	1:7
7	1	1	2	Próbówka 6	1:1
8	1,5	0,5	2	Próbówka 6	1:3
9	3,5	0,5	4	Próbówka 6	1:7
10	1	1	2	Próbówka 9	1:1
11	1,5	0,5	2	Próbówka 9	1:3
12	3,5	0,5	4	Próbówka 9	1:7

Przygotowane 12 probówek odpowiada 12 kolumnom płytki titracyjnej; numer probówki odpowiada numerowi kolumny na płytce, do której roztwór będzie dodany. Tak przygotowane rozcieńczenia związku w bulionie zostały przeniesione do dołków A-G za pomocą pipety, po 180  $\mu$ l do każdego dołka. Rząd H przypisano kontrolom dodatnim i ujemnym hodowli. Kontrolę dodatnią stanowiła pożywka (180  $\mu$ l bulionu + 20  $\mu$ l LHB 50%) oraz szczep (20  $\mu$ l). Kontrole ujemne stanowiły: kontrola jałowości krwi (180  $\mu$ l bulionu + 20  $\mu$ l LHB 50%) oraz kontrola jałowości bulionu (180  $\mu$ l bulionu).

Tabela 11. Schemat płytki titracyjnej, gotowej do inkubacji  
Table 11. Schematic preparation of microplate for incubation

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Szereg rozcieńczeń związku w bulionie SCS + LHB 50%											
B	Szereg rozcieńczeń związku w bulionie SCS + LHB 50% + <i>Prevotella bivia</i>											
C	Szereg rozcieńczeń związku w bulionie SCS + LHB 50% + <i>Prevotella bivia</i>											
D	Szereg rozcieńczeń związku w bulionie SCS + LHB 50% + <i>Prevotella bivia</i>											
E	Szereg rozcieńczeń związku w bulionie SCS + LHB 50% + <i>Parabacteroides distasonis</i>											
F	Szereg rozcieńczeń związku w bulionie SCS + LHB 50% + <i>Parabacteroides distasonis</i>											
G	Szereg rozcieńczeń związku w bulionie SCS + LHB 50% + <i>Parabacteroides distasonis</i>											
H	Bulion SCS + LHB 50%			Bulion SCS + LHB 50% + <i>P. bivia</i>			Bulion SCS + LHB 50% + <i>P. distasonis</i>			Bulion SCS		

## 2.7. INOKULACJA I INKUBACJA PŁYTKI TITRACYJNEJ

W celu inokulacji płytki testowanymi bakteriami i próbami, konieczne jest ustalenie odpowiedniej gęstości optycznej (OD) roztworu bakterii w płynie fizjologicznym za pomocą skali McFarlanda (McF). Z czystej hodowli pobierano jałową wymazówką lub eżą kolonie i przygotowywano zawiesinę bakterii w płynie fizjologicznym (min. 2 ml). Po ustaleniu gęstości optycznej na poziomie 0,5 McF, odpowiadającej  $1,5 \cdot 10^8$  cfu/ml, przygotowaną zawiesinę bakteryjną rozcieńczano dziesięciokrotnie, a następnie inokulowano odpowiednie dołki na płytce titracyjnej 20  $\mu$ l zawiesiny bakterii. Płytkę następnie inkubowano przez 48 h w cieplarni z temperaturą 37°C, w warunkach beztlenowych, zapewnionych szczelnym GENbagiem z GENboksem.

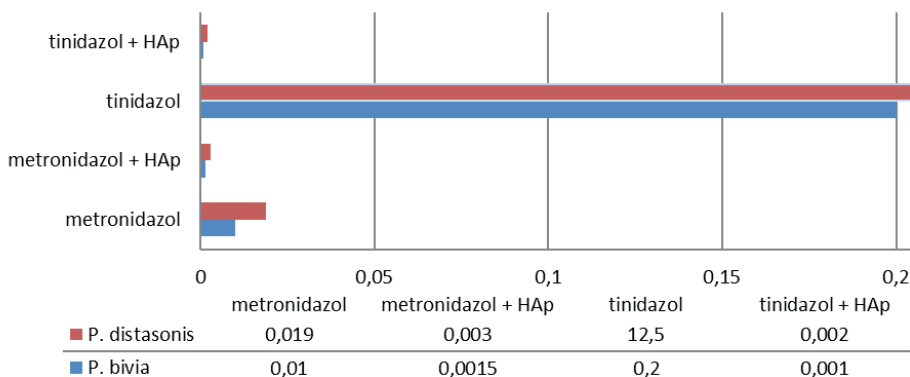
## 2.8. ODCZYT WYNIKÓW

Odczytu dokonano wizualnie, po 48 h inkubacji w temperaturze 37°C, zgodnie z wytycznymi normy M11-A8 CLSI [19]. Minimalne stężenie hamujące wzrost (MIC) odpowiada najniższemu stężeniu środka bakteriobójczego, przy którym już nie obserwuje się wzrostu bakterii. Minimalne stężenie bójcze (MBC) odpowiada najniższemu stężeniu, przy którym ginie 99,9% drobnoustrojów.

W celu określenia wartości MBC, posiewano po 10  $\mu$ l hodowli na podłoże BBA lub SCS (zamiennie). Następnie po 48h inkubacji w 37°C, liczono wyrosłe kolonie. MBC odpowiada 99,9% zabitych komórek bakterii.

### 3. WYNIKI I DYSKUSJA

W efekcie przeprowadzonych doświadczeń wyznaczono zakres wrażliwości bakterii beztlenowych na testowane kompozyty hydroksyapatytowe. Z otrzymanych rezultatów wynika, że obecność hydroksyapatytu podnosi skuteczność zastosowanych antybiotyków (metronidazolu i tynidazolu) wobec *Prevotella bivia* i *Parabacteroides distasonis*. Tinidazol immobilizowany na HAp jest ponad 6 tysięcy razy skuteczniejszy wobec *P. distasonis*, niż sam wolny antybiotyk. Wobec *P. bivia* nieimmobilizowany tinidazol okazał się 200 razy mniej skuteczny niż bionanokompozyt tinidazolu (Rys. 7). Wyniki uzyskane dla metronidazolu potwierdzają, że hydroksyapatytowy bionanokompozyt metronidazolu jest bardziej aktywny bakteriobójczo niż wolny antybiotyk, zarówno wobec *P. distasonis* i *P. bivia*. Ridi i in. [38] tłumaczą ten fakt unikalnymi właściwościami nanomateriałów, które rzutują na wysoką biologiczną skuteczność i specyficzność. Bionanokompozyty hydroksyapatytowe domieszkowane srebrem wykazują skuteczność wobec testowanych bakterii beztlenowych w bardzo wysokich stężeniach (powyżej 40 mg/ml, w zależności od zastosowanej formy kompozytu i rodzaju bakterii), co w praktyce oznacza wartości niemożliwe do osiągnięcia w warunkach *in vivo*.



Rysunek 7. Wartości MIC dla wolnych metronidazolu i tinidazolu oraz kompozytów immobilizowanych tymi antybiotykami [mg/ml]

Figure 7. MIC values for metronidazole, tinidazole and compounds immobilised with them [mg/ml]

Obecnie jednym z głównym problemów medycyny jest narastanie oporności bakterii na antybiotyki. Wiele czynników przyczynia się do powstania szczepów opornych; jednym z głównych jest wysoka plastyczność genetyczna bakterii – łatwo nabywają mutacje, ponadto mają możliwość przekazywania genów oporności poprzez horyzontalny transfer genów, nie tylko pomiędzy osobnikami tego samego

gatunku, ale nawet pomiędzy różnymi rodzajami. Wilson zauważa, że narastanie oporności na antybiotyki jest ściśle związane z ich nadużyciami – są stosowane w rolnictwie jako suplement dla zwierząt, a w medycynie nadmiernie przepisywane pacjentom w terapii antibakteryjnej [9]. Według badań prowadzonych przez Konde i wsp. wynika, że stomatolodzy przepisują swoim pacjentom 7–11% wszystkich powszechnie stosowanych antybiotyków; 66% dentystów dziecięcych przepisuje antybiotyki dla schorzeń jamy ustnej, dla których nie potrzeba rutynowej antybiotykoterapii [16].

Z kolei Wilson i Napora wykazują zasadność stosowania profilaktyki antibakteryjnej, w przypadkach, gdy zapobiega to poważnym chorobom bakteryjnym (tj. bakteriemia, sepsa, zapalenie wsierdza), których niebezpieczeństwo niosą ze sobą różnorodne zabiegi dentystyczne, zwłaszcza u osób z grupy wysokiego ryzyka [9, 17], czyli:

- chorujących przewlekle (np. miażdżyca, marskość wątroby, AIDS);
- po inwazyjnych zabiegach chirurgicznych z ryzykiem wystąpienia bakteriemii, np. u pacjentów po wszczepieniu zastawki;
- z niedoborami odporności (dzieci, osoby starsze, kobiety w ciąży lub osoby po immunosupresji czy chemioterapii).

Ze statystyki zabiegów dentystycznych (Napora i in.) wynika, że bakteriemia może wystąpić nawet w 100% przypadków podczas ekstrakcji mnogich, w ponad połowie przypadków podczas ekstrakcji pojedynczych, a także w co trzecim przypadku leczenia endodontycznego [17]. Autorzy jednak zwracają uwagę na to, że u osób z grupy niskiego ryzyka bakteriemia po zabiegach stomatologicznych trwa do 30 minut i nie zagraża wystąpieniu powikłań.

Soares wykazuje wzrost zainteresowania wykorzystaniem hydroksyapatytów w medycynie. Pełnią one ważną rolę w stomatologii przy leczeniu miazgi zębowej oraz nadwrażliwości zębiny, są związane z ekspozycją kanalików zębowych [48]. Hydroksyapatyt jest obecny w paście do zębów i w żelach dentystycznych. Zmniejsza odkładanie złogów w jamie ustnej. Używany jest jako składnik wypełnień zębowych i cementów dentystycznych.

Kolmas wskazuje na łatwość modyfikacji właściwości fizykochemicznych hydroksyapatytów, a także możliwość domieszkowania ich jonami, nanocząstkami lub bardziej złożonymi związkami, np. antybiotykami, które zapobiegać mogą adhezji bakteryjnych biofilmów do plomby czy implantu [32]. Według badań przeprowadzonych przez Koukos, w jamie ustnej tworzą się biofilmy złożone nawet z ponad tysiąca gatunków bakterii, w tym z rodzaju *Prevotella* i *Parabacteroides*. [23]. Alternatywę dla antybiotykoterapii mogą zatem stanowić hydroksyapatyty domieszkowane metronidazolem lub tinidazolem. Jak podają badacze [23, 46, 47], są to powszechnie stosowane antybiotyki w zwalczaniu infekcji jamy ustnej, skuteczne np. wobec rodzajów *Prevotella sp.* czy *Bacteroides sp.*

Lim zwraca uwagę na fakt, że hydroksyapatyty stanowią doskonałą powierzchnię do adhezji bakterii i tworzenia biofilmu [43]. Codzienne czynności higieny jamy

ustnej, np. szczotkowanie zębów, mogą stać się przyczyną powstania zadrapań lub ran, które otwierają bakteriom obecnym w biofilmie drogę do układu krwionośnego. Potencjalnie u 40% przypadków może to skutkować przejściową bakteremią. Istotnym elementem badań było zatem użycie 50% LHB, w celu przybliżenia warunków panujących w środowisku bakterii, jakim jest organizm wyższy. Lizat stanowił jednocześnie wzbogacenie warunków pożywki dla wymagających gatunków bakterii.

W Tabeli 12 zebrano wartości MIC lub MIC<sub>90</sub> wolnego metronidazolu dla rodzaju *Prevotella* spp. i *Parabacteroides* spp. na podstawie danych literaturowych. Badania Rasmussena i in. [57] z lat 1989–91, z Europy, podają wartość MIC<sub>90</sub> dla grupy *B. fragilis* w zakresie 0,5–1 µg/ml. Podobne wartości podaje Ackerman – MIC<sub>90</sub> metronidazolu dla obu ATCC *P. distasonis* określa jako 1 µg/ml, a dla *Prevotella* spp. jako 0,25 µg/ml [58]. Ednie podaje MIC<sub>90</sub> dla *P. bivia* jako wartość 4 µg/ml, a dla *P. distasonis* – 1 µg/ml [59]. Hedberg określa MIC<sub>90</sub> dla *P. distasonis* jako 2 µg/ml [60]. Badania Liebetau wykazały, że stężenie hamujące wzrost większości pozyskanych szczepów to dla *Prevotella* spp. 0,25–1 µg/ml, dla grupy *B. fragilis* 0,5–1 µg/ml. [61]. Liu podaje wartości dla *Bacteroides* spp. jako MIC<sub>90</sub> wynoszący 4 µg/ml, dla *Prevotella* spp. 8 µg/ml [62]. Peric podaje MIC<sub>90</sub> *P. bivia*: 4 µg/ml, a *B. distasonis*: 1 µg/ml [63].

Tabela 12. Porównanie wartości MIC lub MIC<sub>90</sub> wolnego metronidazolu wobec bakterii z rodzaju *Prevotella* sp. i *Bacteroides* sp. na podstawie danych literaturowych

Table 12. Comparison of the MIC and MIC<sub>90</sub> values for metronidazole against *Prevotella* spp. according to published data

<i>Prevotella</i>	<i>Parabacteroides</i>	Źródło literaturowe
b.d.	0,51 µg/ml	57
0,25 µg/ml	1 µg/ml	58
4 µg/ml	1 µg/ml	59
b.d.	2 µg/ml	60
0,25–1 µg/ml	0,5–1 µg/ml	61
8 µg/ml	4 µg/ml	62
4 µg/ml	1 µg/ml	63

Objaśnienia: b.d. – brak danych.

Według danych CLSI, 100% (173) izolatów *Prevotella* sp. oraz 100% (111) szczepów *P. distasonis* okazało się wrażliwymi na metronidazol. Pokazuje to, że metronidazol jest bardzo skuteczny wobec beztlenowców, a jednocześnie podkreśla zasadność tworzenia domieszkowanych nim bionanokompozytów [19]. Jak zaznacza Brook, ponad 90% obligatoryjnych beztlenowców jest wrażliwych na stężenia metronidazolu mniejsze niż 2 µg/ml [18].

Powyższe dane literaturowe różnią się od otrzymanych wyników wrażliwości na metronidazol, testowanych w nieniejszej pracy szczepów bakterii (*P. bivia* 10 µg/ml, *P. distasonis* 19 µg/ml). Należy jednak zwrócić uwagę na fakt, że większość wyników nie dotyczy konkretnego gatunku, ale uogólnia je do rodzaju lub też grupy. Ponadto wiele odniesień literaturowych podaje MIC<sub>90</sub>. Wartości także różnią

się, w zależności od miejsca geograficznego pozyskania próbki, a najnowsze dane pochodzą sprzed dziewięciu lat (2009 r.).

Porównanie otrzymanych w badaniach wyników dla tinidazolu zmusza do przemyśleń, czy rzeczywiście metronidazol można zastąpić tinidazolem [49, 51] – zwraca uwagę fakt, że w przeprowadzonych badaniach metronidazol wykazywał 20-krotnie większą bakteriobójczość wobec *P. bivia* i był ponad 650-krotnie bardziej skuteczny wobec *P. distasonis* niż tinidazol. Jak sugerował Nigro, tinidazol potencjalnie mógłby być użyty w leczeniu infekcji bakteriami opornymi na metronidazol [49], mimo że niektórzy badacze wykazują małe prawdopodobieństwo występowania szczepów opornych na metronidazol [18, 19].

W ramach niniejszej pracy zostały zbadane także nanobiokompozyty apatytowe, zawierające jony i nanocząstki srebra, stanowiące również potencjalną alternatywę dla antybiotyków; jednak, jak podaje Kędzióra, coraz częściej obserwuje się u bakterii narastanie oporności na metale ciężkie, w tym także na związki srebra [64]. Uzasadnia to przeprowadzone w niniejszej pracy zbadanie działania nanobiokompozytów srebra, a w przyszłości także przeprowadzenie porównania ze srebrem nieimmobilizowanym.

W literaturze nie znaleziono informacji nt. badania skuteczności związków i kompozytów srebra wobec badanych gatunków, bardzo nieliczne są też dane dla bakterii beztlenowych. Badania Lu i wsp. na bakteriach wyizolowanych z jamy ustnej wskazują, że bakterie tlenowe były bardziej wrażliwe na 5 nm nanocząstki srebra, niż beztlenowe patogeny [65]. Lu wskazuje także, że porównując działanie nanocząstek srebra o wielkości 5 nm, 15 nm i 50 nm, najskuteczniejsze wobec bakterii beztlenowych były cząsteczki 5 nm. Wyniki Lu potwierdzają, że AgNPs można zastosować w celu zahamowania wzrostu mikroorganizmów.

Badania Kawahary na związkach srebra w postaci jonów określają MIC wobec beztlenowych patogenów jamy ustnej w zakresie 4,8–38,4 µg/ml [66]. W niniejszej pracy określono MIC kompozytów domieszkowanych srebrem jonowym na większy niż 8–9 µg/m [66].

## PODZIĘKOWANIA

Badania ujęte w tej pracy zostały wykonane w Instytucie Niskich Temperatur i Badań Strukturalnych im. W. Trzebiatowskiego PAN, we Wrocławiu, oraz Zakładzie Mikrobiologii Instytutu Genetyki i Mikrobiologii Wydziału Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego. Badania zostały zrealizowane w ramach projektu „Otrzymywanie i badanie właściwości nanoapatytów domieszkowanych jonami ziem rzadkich i ich biokompozytów”, Narodowe Centrum Nauki, UMO-2012/05/E/ST5/03904. Autorzy składają podziękowania dr Kamili Korzekwie za udostępnienie do badań szczepów bakterii *P. bivia* i *P. distasonis* oraz dr Katarzynie Szyszka za przygotowanie materiałów do badań mikrobiologicznych.



## PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] H.G. Schlegel, *Mikrobiologia ogólna*, PWN, Warszawa 2003.
- [2] Z. Markiewicz, Z.A. Kwiatkowski, J. Baj, *Bakterie, antybiotyki, lekooporność*, Wydawnictwo Naukowe PWN, 2008.
- [3] N.W. Yang, J.M. Kim, G.J. Choi, S.J. Jang, *Korean J. Lab. Med.*, 2010, **30**, 133.
- [4] P.R. Murray, K.S. Rosenthal, M.A. Pfaller, A. Przondo-Mordarska, G. Martirosian, A. Szkaradkiewicz, *Mikrobiologia*, Elsevier Urban & Partner, 2011.
- [5] J. Baj, Z. Markiewicz, E.K. Jagusztyn-Krynicka, A. Piekarowicz, M. Włodarczyk, D. Bartosik, Ł. Dziewit, K.I. Wolska, Wydawnictwo Naukowe PWN, *Biologia molekularna bakterii*, Wydawnictwo Naukowe PWN, 2015.
- [6] M.T. Madigan, J.M. Martinko, P. Dunlap, D. Clarke, *Brock Biology of Microorganisms*, 2009.
- [7] P. Singleton, *Bakterie w Biologii, Biotechnologii i Medycynie*, Wydawnictwo Naukowe PWN, 2000.
- [8] W. Kunicki-Goldfinger, J. Baj, Z. Markiewicz, S. Kobyliński, *Życie bakterii*, Wydawnictwo Naukowe PWN, 2008.
- [9] B.A. Wilson, A.A.S.D.D. Whitt, M.E. Winkler, *Bacterial Pathogenesis: A molecular Approach*, ASM Press, 2011.
- [10] M.J. Bull, N.T. Plummer, *Integr. Med. (Encinitas)*, 2014, **13**, 17.
- [11] M. Kverka, Z. Zakostelska, K. Klimesova, D. Sokol, T. Hudcovic, T. Hrnrcir, P. Rossmann, J. Mrazek, J. Kopečný, E.F. Verdu, H. Tlaskalova-Hogenova, *Clin. Exp. Immunol.*, 2011, **163**, 250.
- [12] A. Damms-Machado, S. Mitra, A.E. Schollenberger, K.M. Kramer, T. Meile, A. Königsrainer, D.H. Huson, S.C. Bischoff, *Biomed Res. Int.*, 2015, **2015**, 1.
- [13] K.E. Aldridge, D. Ashcraft, K. Cambre, C.L. Pierson, S.G. Jenkins, J.E. Rosenblatt, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2001, **45**, 1238.
- [14] Y. Park, J.Y. Choi, D. Yong, K. Lee, J.M. Kim, *Korean J. Intern. Med.*, 2009, **24**, 13.
- [15] J.G. Bartlett, *Clin. Infect. Dis.*, 2005, **40**, 923.
- [16] S. Konde, L. Jairam, P. Peethambar, S. Noojady, N. Kumar, *J. Indian Soc. Pedod. Prev. Dent.*, 2016, **34**, 145.
- [17] M. Napora, *Nowa Stomatol.*
- [18] I. Brook, H.M. Wexler, E.J.C. Goldstein, *Clin. Microbiol. Rev.*, 2013, **26**, 526.
- [19] D.W. Hecht, D.M. Citron, J. Dzink-Fox, W.W. Gregory, N.V. Jacobus, G.S. Jenkins, J.E. Rosenblatt, A.N. Svhuetz, H. Wexler, *M11A8: Anaerobic Bacteria Antimicrobial Susceptibility*, 8th edn., 2012.
- [20] S. Taniguchi, M. Fujimori, T. Sasaki, H. Tsutsui, Y. Shimatani, K. Seki, J. Amano, *Cancer Sci.*, 2010, **101**, 1925.
- [21] A. Di Marco Berardino, R. Inchingolo, A. Smargiassi, A. Re, R. Torelli, B. Fiori, T. D'Inzeo, G.M. Corbo, S. Valente, M. Sanguinetti, T. Spanu, *J. Clin. Microbiol.*, 2014, **52**, 1284.
- [22] A. Mirza, J. Bove, J. Litwa, G. Appelbe, *J. Hand Microsurg.*, 2016, **04**, 77.
- [23] G. Koukos, A. Konstantinidis, L. Tsalikis, M. Arsenakis, T. Slini, D. Sakellari, *Open Dent. J.*, 2016, **10**, 89.
- [24] S. Nalmas, E. Bishburg and T. Chan, *ScientificWorldJournal.*, 2007, **7**, 1631.
- [25] H. Mikamo, K. Kawazoe, K. Izumi, K. Watanabe, K. Ueno and T. Tamaya, *Infect. Dis. Obstet. Gynecol.*, 1998, **6**, 61.
- [26] A. Aroutcheva, Z. Ling, S. Faro, *Anaerobe*, 2008, **14**, 256–260.
- [27] S.N. Hsu, S. Yonekura, C.Y. Ting, H.M. Robertson, Y. Iwai, T. Uemura, C.H. Lee, A. Chiba, *PLoS Genet.*, 2009, **5**, e1000441.
- [28] A. Machado, K.K. Jefferson, N. Cerca, *Int. J. Mol. Sci.*, 2013, **14**, 12004.
- [29] C.A. Spiegel, *Clin. Microbiol. Rev.*, 1991, **4**, 485.

- [30] S. Cauci, S. Driussi, R. Monte, P. Lanzafame, E. Pitzus, F. Quadrifoglio, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1998, **178**, 511.
- [31] J.A. Al-Tawfiq, *Intern. Med.*, 2008, **47**, 69.
- [32] J. Kolmas, E. Groszyk, D. Kwiatkowska-Rózycka, *Biomed Res. Int.*, 2014, **2014**, 178123.
- [33] S. Pujari-Palmer, S. Chen, S. Rubino, H. Weng, W. Xia, H. Engqvist, L. Tang, M.K. Ott, *Biomaterials*, 2016, **90**, 1.
- [34] S.V. Dorozhkin, *Acta Biomater.*, 2010, **6**, 715.
- [35] J. Dong, S. Zhang, J. Ma, H. Liu, Y. Du, Y. Liu, *PLoS One*, 2014, **9**, e94937.
- [36] K.R. Mohamed, H.H. Beherei, Z.M. El-Rashidy, *J. Adv. Res.*, 2014, **5**, 201.
- [37] M. Šupová, *Ceram. Int.*, 2015, **41**, 9203.
- [38] F. Ridi, I. Meazzini, B. Castroflorio, M. Bonini, D. Berti, P. Baglioni, *Adv. Colloid Interface Sci.*, 2017, **244**, 281.
- [39] S.R. Dutta, D. Passi, P. Singh, A. Bhuibhar, *Ir. J. Med. Sci.*, 2015, **184**, 101.
- [40] M. Šupová, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 2009, **20**, 1201–1213.
- [41] R.I.M. Asri, W.S.W. Harun, M.A. Hassan, S.A.C. Ghani, Z. Buyong, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, 2016, **57**, 95.
- [42] R. Yunus Basha, S.K. Sampath, M. Doble, *Mater. Sci. Eng. C*, 2015, **57**, 452.
- [43] P.N. Lim, L. Chang, E.S. Thian, *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, 2015, **11**, 1331.
- [44] M. Sadat-Shojai, M.T. Khorasani, E. Dinpanah-Khoshdargi, A. Jamshidi, *Acta Biomater.*, 2013, **9**, 7591.
- [45] W. Yanhua, H. Hao, Y. Li, S. Zhang, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, 2016, **140**, 297.
- [46] H. Kauser, M. Qadir, W. Anwar, *J. Fam. Med. Prim. care*, 2014, **3**, 467.
- [47] S. Löfmark, C. Edlund, C.E. Nord, *Clin. Infect. Dis.*, 2010, **50**, S16.
- [48] G.M.S. Soares, L.C. Figueiredo, M. Faveri, S.C. Cortelli, P.M. Duarte, M. Feres, *J. Appl. Oral Sci.*, 2012, **20**, 295.
- [49] M.M. López Nigro, M.A. Carballo, *Toxicol. Lett.*, 2008, **180**, 46.
- [50] L. Alou, M.J. Giménez, F. Manso, D. Sevillano, M. Torrico, N. González, J.J. Granizo, A. Bascones, J. Prieto, J.R. Maestre, L. Aguilar, *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2009, **33**, 449.
- [51] J.R. Schwebke, R.A. Desmond, [w:] *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, NIH Public Access, 2011, vol. 204, str. 211.e1-6.
- [52] S.A. Brennan, C.N. Fhoghlú, B.M. DeVitt, F.J. O'Mahony, D. Brabazon, A. Walsh, *Bone Jt. J.*, 2015, **97-B**, 582.
- [53] L. Actis, L. Gaviria, T. Guda, J. L. Ong, *J. Korean Assoc. Oral Maxillofac. Surg.*, 2013, **39**, 43.
- [54] M.J. Hajipour, K.M. Fromm, A. Akbar Ashkarran, D. Jimenez de Aberasturi, I.R. de Larramendi, T. Rojo, V. Serpooshan, W.J. Parak, M. Mahmoudi, *Trends Biotechnol.*, 2012, **30**, 499.
- [55] R.J. Wiglusz, A. Kedziora, A. Lukowiak, W. Doroszkiewicz, W. Strek, *J. Biomed. Nanotechnol.*, 2012, **8**, 605.
- [56] H. Lu, Y. Liu, J. Guo, H. Wu, J. Wang, G. Wu, *Int. J. Mol. Sci.*, 2016, **17**, 334.
- [57] B.A. Rasmussen, K. Bush, F.P. Tally, *Clin. Infect. Dis.*, 1997, **24 Suppl 1**, S110-20.
- [58] G. Ackermann, R. Schaumann, B. Pless, M.C. Claros, A.C. Rodloff, *J. Antimicrob. Chemother.*, 2000, **46**, 115.
- [59] L.M. Ednie, P.C. Appelbaum, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2009, **53**, 2163.
- [60] M. Hedberg, *K. Institutet, Methods*, 2003, **9**, 475.
- [61] A. Liebetrau, A.C. Rodloff, J. Behra-Miellet, L. Dubreuil, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2003, **47**, 3667.
- [62] C.Y. Liu, Y.T. Huang, C.H. Liao, L.C. Yen, H.Y. Lin, P.R. Hsueh, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2008, **52**, 3161.
- [63] M. Peric, M.R. Jacobs, P.C. Appelbaum, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2004, **48**, 3188.

- [64] A. Kędziora, K. Sobik, *Probl. Nauk Biol.*, 2013, **62**, 557.
- [65] Z. Lu, K. Rong, J. Li, H. Yang, R. Chen, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 2013, **24**, 1465.
- [66] K. Kawahara, K. Tsuruda, M. Morishita, M. Uchida, *Dent. Mater.*, 2000, **16**, 452.

Praca wpłynęła do Redakcji 3 czerwca 2018



**TIOSEMIKARBAZONY – WŁAŚCIWOŚCI  
KOORDYNACYJNE W ASPEKCIE AKTYWNOŚCI  
BIOLOGICZNEJ**

THIOSEMICARBAZONES – COORDINATION  
PROPERTIES IN RELATION TO BIOLOGICAL  
ACTIVITY

**Małgorzata Ostrowska<sup>1</sup>, Yuliya Toporivska<sup>1</sup>,  
Monika Pyrkosz-Bulska<sup>2</sup>,  
Elżbieta Gumienna-Kontecka<sup>\*1</sup>**

<sup>1</sup>Uniwersytet Wrocławski, Wydział Chemii  
ul. Joliot-Curie 14, 50-383 Wrocław

\*e-mail: elzbieta.gumienna-kontecka@chem.uni.wroc.pl

<sup>2</sup>Uniwersytet Śląski w Katowicach  
Instytut Chemii, Zakład Chemii Organicznej  
ul. Szkolna 9, 40-006 Katowice

---

*Pracę dedykujemy pamięci Pani Profesor Małgorzaty Jeżowskiej-Bojczuk*

---

Abstract

Wykaz stosowanych skrótów

Wprowadzenie

1. Charakterystyka tiosemikarbazonów
  - 1.1. Budowa i otrzymywanie
  - 1.2. Właściwości koordynacyjne tiosemikarbazonów
  - 1.3. Aktywność biologiczna
  - 1.4. Aktywność przeciwnowotworowa

Podsumowanie i wnioski

Piśmiennictwo cytowane

---

**Mgr inż. Małgorzata Ostrowska** ukończyła studia pierwszego i drugiego stopnia na Wydziale Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego oraz studia pierwszego stopnia na Wydziale Inżynierjno-Ekonomicznym Uniwersytetu Ekonomicznego we Wrocławiu. Obecnie jest doktorantką w Zespole Biologicznej Chemii Nieorganicznej Wydziału Chemii UWr. Jej zainteresowania dotyczą badań właściwości koordynacyjnych niskocząsteczkowych ligandów względem jonów metali bloku d. Szczególną uwagę poświęca badaniom dotyczącym wpływu struktury ligandów hydroksamowych na właściwości termodynamiczne metalakoronowych kompleksów  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  oraz  $\text{Zn}^{2+}$ .

**Mgr Yuliya Toporivska** pochodzi z Ukrainy, w roku 2011 została studentką Uniwersytetu Wrocławskiego, gdzie w roku 2016 zdobyła stopień magistra. Aktualnie kontynuuje studia III stopnia na Wydziale Chemii UWr w Zespole Biologicznej Chemii Nieorganicznej. Prowadzi badania nad kompleksami ligandów wielodonorowych z jonami metali przejściowych. Szczególną uwagę poświęca właściwościom koordynacyjnym jonu  $\text{Zr}^{4+}$  z ligandami hydroksamowymi.

**Dr Monika Pyrkosz-Bulska** ukończyła studia na Wydziale Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego, tu także uzyskała stopień doktora nauk chemicznych. Swoją pracę doktorską realizowała w Zespole Chemii Bionieorganicznej i Biomedycznej zajmując się badaniem oddziaływań ligandów aminobisfosfonowych z jonami  $\text{Cu}^{2+}$  i  $\text{Ni}^{2+}$ . Obecnie, przy współpracy z Uniwersytetem Wrocławskim, prowadzi badania nad specyfiką koordynacyjną ligandów tiosemikarbazonowych z metalami aktywnie biologicznymi.

**Dr hab. Elżbieta Gumienna-Kontecka, prof. UWr**, ukończyła jednolite studia magisterskie na Wydziale Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego. Obecnie pracuje na stanowisku profesora Uniwersytetu Wrocławskiego na Wydziale Chemii, zajmując stanowisko kierownika Zespołu Biologicznej Chemii Nieorganicznej. Stopień doktora habilitowanego uzyskała w roku 2013. W swojej pracy badawczej zajmuje się strukturą i termodynamiką układów bionieorganicznych, ze szczególnym uwzględnieniem procesów transportu i homeostazy jonów metali (m.in. żelaza i miedzi) u patogenów. Tematyka jej badań koncentruje się wokół zależności struktura-funkcja sideroforów i ich układów biomimetycznych. Elżbieta Gumienna-Kontecka prowadzi także badania wielojądrowych związków koordynacyjnych i polimerów koordynacyjnych.

## ABSTRACT

Thiosemicarbazones are considered to be potential therapeutics, because they possess a broad range of biological properties including antitumor, antimalarial and antimicrobial activity. Generally, the thiosemicarbazones coordinate to the metal centre by means of an (N,S) bidentate mode, and when an additional coordinating group is present, more diversified binding modes can occur such as a tridentate (X,N,S) coordination fashion. The stability of the metal complexes formed with the thiosemicarbazones strongly depends on the character of the metal ion, the X-donor atom of the additional functional group and the position and type of the substituents at the thiosemicarbazones.

The most prominent representative of this family is the  $\alpha$ (N)-heterocyclic Triapine (3-aminopyridine-2-carbaldehyde thiosemicarbazone; 3-AP), which is currently undergoing different phase-I and -II clinical trials as an antitumor agent, and demonstrates promising activity. Triapine is a very strong inhibitor of ribonucleotide reductase, the rate determining enzyme in the supply of deoxyribonucleotides for DNA synthesis required for cell proliferation. The mechanism of action involves most probably the formation of an iron(II)–Triapine complex, which reacts with molecular oxygen to result in the generation of reactive oxygen species. Subsequently, these reactive oxygen species are responsible for the quenching of the active-site tyrosyl radical of ribonucleotide reductase required for the enzymatic activity. As a result, the coordination chemistry of iron complexes of thiosemicarbazones has been receiving considerable attention.

This review describes the coordination chemistry of thiosemicarbazones, in particular analogs of Triapine. The coordination compounds of d-block elements are discussed with respect to their bonding and structures. Several of complexes are mononuclear, with distorted tetrahedral, square planar, square pyramid or octahedral as their common geometries. The metal-binding ability of STSC at physiological pH was compared and shown.

Further, various biological applications with emphasis an anticancer activity of the ligands/complexes are discussed in brief so as to indicate the importance of ligands under consideration.

Keywords: thiosemicarbazones, antitumor agents, biological activity, stability constants, transition metals

Słowa kluczowe: tiosemikarbazony, czynniki przeciwnowotworowe, aktywność biologiczna, stałe trwałości, metale przejściowe

---

---

## WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

IUPAC	– Międzynarodowa Unia Chemii Czystej i Stosowanej (ang. <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i> )
FTSC	– 2-formylopirydylotiosemikarbazon
PSTC	– pirydyl-2-karboksyaldehydo $N^4, N^4$ -dimetylotiosemikarbazon
APSTC	– 3-aminopirydylo-2-karboksyaldehydo $N^4, N^4$ -dimetylotiosemikarbazon
FaTSC	– 2-pirydyloformamid tiosemikarbazon
AcTSC	– 2-acetylpirydylotiosemikarbazon
Morph-dm-FTSC	– morfolino-dimetylo-2-formylopirydylotiosemikarbazon
mPip-dm-FTSC	– metylopipezazyno-dimetylo-2-formylopirydylotiosemikarbazon
STSC	– salicylaldehydotiosemikarbazon
BpT	– 2-benzylopirydylotiosemikarbazon
DpT	– di-2-pirydyloketono-3-tiosemikarbazon
DP44mT	– 2-(di-2-pirydylometyleno)- $N, N$ -dimetylohydrazono-karbotioamid
DPC	– di(2-pirydylo)ketono-4-cydoheksylo-4-metylo-3-tiosemikarbazon
DMSO	– dimetylosulfotlenek
WHO	– Światowa Organizacja Zdrowia
AChE	– acetylocholinoesteraza
AD	– choroba Alzheimera
RR	– reduktaza rybonukleotydomowa
RFT	– reaktywne formy tlenu



## WPROWADZENIE

W czasach gdy nowotwory, choroby neurodegeneracyjne oraz infekcje są bardzo poważnym problemem zdrowia publicznego, poszukiwanie innowacyjnych rozwiązań terapeutycznych oraz nowych środków leczniczych stanowi ogromne wyzwanie dla naukowców wielu dziedzin.

Pomimo ogromnego postępu w dziedzinie medycyny, wiele schorzeń pozostaje wciąż poza zasięgiem współczesnych metod leczenia. Jest to spowodowane, m.in. pojawiającymi się z roku na rok nowymi przypadkami chorobowymi, niejednorodnością nowotworów oraz ich wyjątkową odpornością terapeutyczną. W związku z tym, bardzo ważne jest poszukiwanie nowych, aktywnych biologicznie związków zdolnych do zwalczania chorób XXI wieku.

Poszukiwanie innowacyjnych i selektywnych terapeutyków opiera się w dużej mierze na projektowaniu i syntezie związków zdolnych do chelatacji jonów metali przejściowych zaangażowanych w procesy biologiczne. Przy planowaniu i modyfikacji kolejnych związków, w celu poprawienia ich możliwości aplikacyjnych, niezbędne jest szczegółowe zrozumienie chemii koordynacyjnej. Poprzez odpowiedni dobór struktury związku, geometrii oraz rozmieszczenia atomów donorowych, możemy regulować powinowactwo ligandów wobec jonów metali oraz trwałość powstających kompleksów tak, aby wywołać oczekiwane działanie biologiczne. Wprowadzanie dodatkowych grup funkcyjnych do cząsteczki wpływa na szybkość jej przenikania przez błony komórkowe, a także może zmniejszać niepożądane skutki uboczne.

Jedną z klas związków intensywnie badanych jako potencjalne terapeutyki o działaniu przeciwnowotworowym, są tiosemikarbazony. Są to łatwe w syntezie ligandy organiczne, które swoje szerokie spektrum aktywności biologicznej zawdzięczają zdolności chelatacji jonów metali. Łatwość modyfikacji tiosemikarbazonów sprzyja poszukiwaniom ligandów tworzących trwałe kompleksy. Kluczowym etapem projektowania nowych związków jest poznanie ich właściwości fizykochemicznych, zdolności koordynacyjnych, określenie miejsc koordynacyjnych oraz trwałości kompleksów jakie tworzą z jonami metali.

Celem niniejszej pracy jest podsumowanie wiedzy na temat związków tiosemikarbazonowych oraz scharakteryzowanie ich oddziaływań z jonami metali przejściowych w świetle ich aktywności biologicznej.

W pracy scharakteryzowano oddziaływanie ligandów tiosemikarbazonowych z jonami metali przejściowych, ze szczególnym uwzględnieniem jonów miedzi  $\text{Cu}^{2+}$  oraz żelaza  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ .

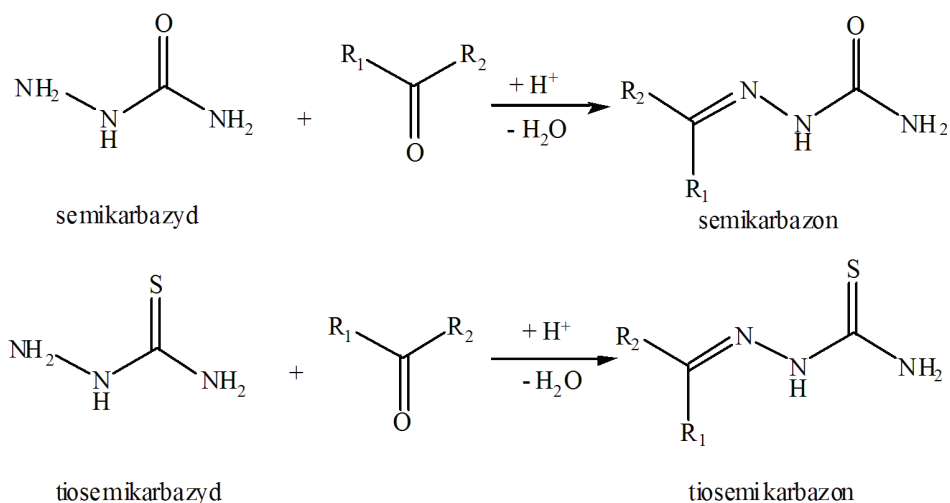
Kolejno dokonano krótkiej charakterystyki tiosemikarbazonów, ich budowy, metod syntezy oraz aktywności biologicznej. Szczególną uwagę poświęcono ich aktywności przeciwnowotworowej. Następnie przedstawiono przykładowe ligandy tiosemikarbazonowe, dla których wykonywane były badania dotyczące ich właściwości koordynacyjnych względem różnych jonów, a w szczególności kationów  $\text{Cu}^+$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ , oraz  $\text{Fe}^{2+}$  i  $\text{Fe}^{3+}$ .

## 1. CHARAKTERYSTYKA TIOSEMİKARBAZONÓW

Tiosemikarbazony stanowią klasę związków znajdujących szerokie zastosowanie w analizie chemicznej, m.in. spektrofotometrii oraz spektrofluorymetrii do wykrywania jonów metali. Znajdują także szeroki zakres zastosowań farmaceutycznych; wykazują właściwości przeciwmalaryczne, przeciwbakteryjne oraz przeciwnowotworowe [1]. Aktywność biologiczna tiosemikarbazonów jest szeroko opisywana od roku 1940, jednak mechanizm, któremu zawdzięczają swoją efektywność, wciąż pozostaje nie do końca wyjaśniony. Głównym czynnikiem umożliwiającym zastosowanie tiosemikarbazonów jest ich zdolność chelatowania jonów metali o istotnym znaczeniu biologicznym [2].

### 1.1. BUDOWA I OTRZYMYWANIE

Tiosemikarbazony są siarkowymi analogami semikarbazonów, należących do pochodnych iminowych, otrzymywanych w wyniku kondensacji pomiędzy semikarbazydem oraz odpowiednim związkiem karbonylowym – ketonem lub aldehydem (Rys. 1) [3].



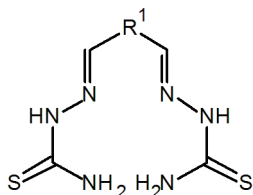
$\text{R}_1, \text{R}_2 = \text{H}, \text{alkil}, \text{aryl}$

Rysunek 1. Schematyczne przedstawienie struktury i syntezy tiosemikarbazonów [4]

Figure 1. Schematic representation of structures and synthesis of thiosemicarbazones [4]

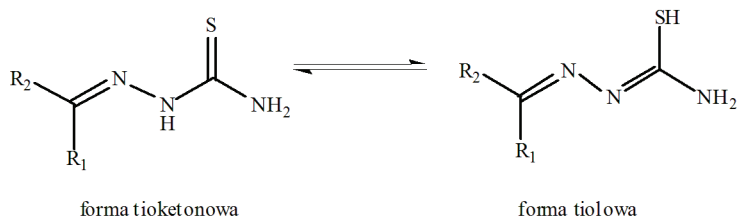
Zgodnie z nomenklaturą IUPAC, omawiane związki stanowią osobną klasę, a ich nazwy tworzy się od nazwy skondensowanego aldehydu czy ketonu,

po czym dodawane jest słowo „tiosemikarbazon” [5]. W zależności od rodzajów podstawników, można wyróżnić różne podklasy tiosemikarbazonów. Jedną z popularnych podklas są bis(tiosemikarbazony), których charakterystyczną cechą struktury są dwie molekuly tiosemikarbazonu, połączone poprzez pierścień aromatyczny albo wiązania C-C pomiędzy C<sup>2</sup> każdej cząsteczki (Rys. 2).



Rysunek 2. Struktura bis(tiosemikarbazonów), gdzie R1 = pierścień heterocykliczny, -CH<sub>2</sub>-  
Figure 2. Structure of bis(thiosemicarbazones), R1 = heterocyclic ring, -CH<sub>2</sub>-

Obecność w strukturze tiosemikarbazonów ugrupowania C = N umożliwia występowanie tych związków w postaci dwóch stereoizomerów: E i Z (*trans* i *cis*). W ciele stałym występują w postaci formy tioketonowej i charakteryzują się zazwyczaj płaską geometrią, z atomem siarki skierowanym w pozycję *trans* względem azotu grupy azometinowej, co w rezultacie tworzy konfigurację E [6]. W roztworach wodnych tiosemikarbazonów obserwowane jest zjawisko tautomerii keto-enolowej, w wyniku której obecne są dwie równowagowe formy – tioketonowa oraz tienolowa (Rys. 3). Wskutek wewnątrzcząsteczkowego transferu protonu dochodzi do deprotonacji grupy hydrazonowej i protonacji atomu siarki [7].



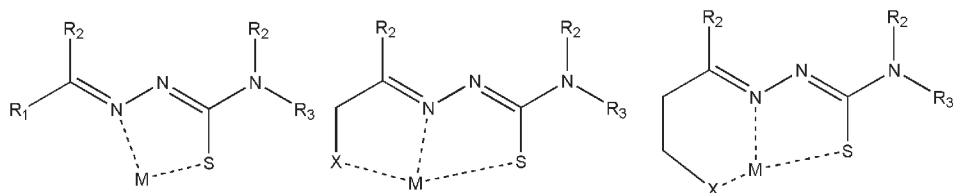
Rysunek 3. Tautomeryczne formy tiosemikarbazonów [7]  
Figure 3. Tautomeric forms of thiosemicarbazones [7]

## 1.2. WŁAŚCIWOŚCI KOORDYNACYJNE TIOSEMIKARBAZONÓW

Badania dotyczące właściwości koordynacyjnych tiosemikarbazonów od dawna cieszą się dużą popularnością. Pierwszy przegląd dotyczący tej tematyki został opublikowany w roku 1974 [8]. Od tego czasu zanotowano szereg kompleksów tiosemikarbazonowych zawierających jony metali, takich jak wanad, cynk, kobalt, złoto, nikiel, srebro, pallad, gal, miedź oraz żelazo [9, 10]. Zdolność do chelatowania tak szerokiej gamy jonów metali zawdzięczają obecności w swojej strukturze bogatego

zestawu atomów donorowych. Obok imponującej liczby metali, z którymi tiosemikarbazony zdolne są tworzyć trwałe kompleksy, interesujący jest również fakt, że stabilizują one różne, często mniej powszechne, stopnie utlenienia tych metali [7].

Najczęściej występującymi typami koordynacyjnymi ligandów tiosemikarbazonowych jest koordynacja dwu- i trójkleszczowa. W przypadku koordynacji dwukleszczowej, atomami donorowymi są atomy azotu oraz siarki (N, S) ugrupowania azometynowego, natomiast trójkleszczowy typ koordynacji wykorzystuje następujące kombinacje atomów donorowych: (N, N, S); (O, N, S) oraz (C, N, S) (Rys. 4). Właściwości koordynacyjne tiosemikarbazonów mogą być odpowiednio dostosowywane poprzez wykorzystanie do ich syntezy aldehydów lub ketonów posiadających dodatkowe grupy funkcyjne, zawierające atomy donorowe (X) w pozycjach umożliwiających chelatowanie jonów metali. Pozwala to na trójkleszczowe wiązanie jonów metali przez cząsteczki tiosemikarbazonów i utworzenie dwóch pierścieni pięcioczłonowych lub pierścienia pięcio- i sześcioczłonowego [7]. Zwiększanie liczby pierścieni chelatowych zwiększa trwałość kompleksu. Należy jednak pamiętać, że wzrost rozmiarów tych pierścieni wpływa negatywnie na trwałość kompleksów [11]. Z kolei wprowadzenie do liganda tiosemikarbazonowego pierścienia aromatycznego z dodatkowymi atomami donorowymi (X) wpływa pozytywnie na zdolności chelatujące cząsteczki [6, 12].



Rysunek 4. Schematy koordynacji tiosemikarbazonów, gdzie R oznacza grupę funkcyjną, X oznacza dodatkowy atom donorowy [13]

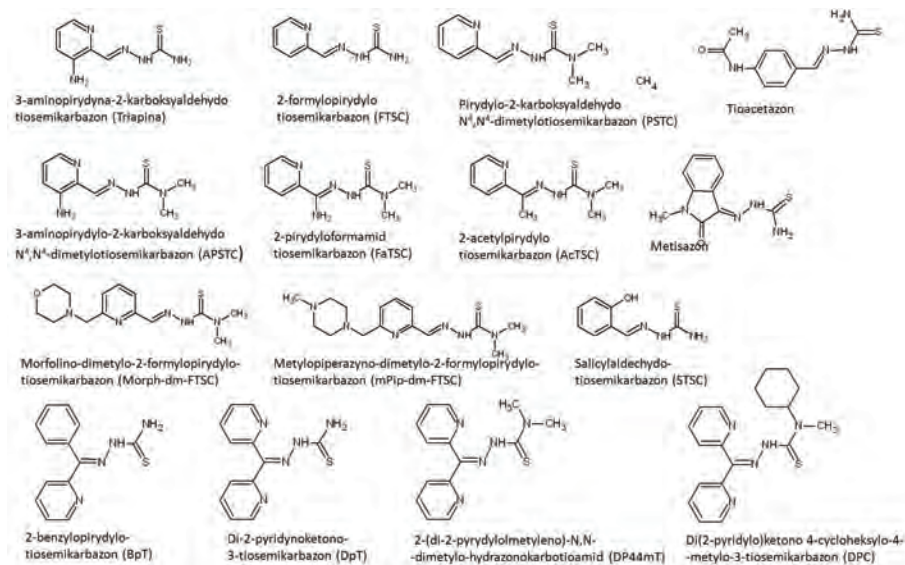
Figure 4. Coordination modes of thiosemicarbazones, R – functional group, X – additional donor atom [13]

Stabilność kompleksów tiosemikarbazonowych w znacznym stopniu zależy od jonu metalu, a także od rodzaju dodatkowego atomu donorowego X i miejsca jego podstawienia [13]. Zgodnie z teorią miękkich i twardych kwasów i zasad Pearsona (HSAB), wprowadzenie w miejscu X grupy –OH, twardej zasady, powoduje zwiększenie trwałości kompleksów z twardymi kwasami, takimi jak Fe(III), Al(III), Na(I), K(I), Mg(II), Ca(II); zamiana donorowego atomu tlenu na atom azotu (np. w pierścieniu pirydynowym) lub grupę tiolową powoduje powstanie trwałych kompleksów z metalami o bardziej miękkim charakterze, np. Pb(II), Cu(II), Fe(II) – dla azotu, czy Cu(I), Au(I), Ag(I) dla grupy tiolowej.

W ostatnich latach znacznie wzrosła liczba nowych publikacji dotyczących badań oddziaływań tiosemikarbazonów z jonami metali przejściowych. Zdecydowana większość opisuje kompleksy z jonami  $\text{Cu}^{2+}$  i  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ , co wynika z właściwości redoks danych metali, mniej z jonami  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Pt}^{2+}$ ,  $\text{Ga}^{3+}$ ,

$Al^{3+}$  [1, 10, 14, 15]. Jest to wywołane poszukiwaniem efektywnych chelatorów tych kationów, w celu zbadania ich potencjalnej aktywności biologicznej, w szczególności przeciwnowotworowej.

Triapina należy do klasy  $\alpha(N)$ -pirydyłowych pochodnych i jest jednym z najlepiej zbadanych związków tiosemikarbazonów. W roztworze triapina z jonami metali dwuwartościowymi  $Fe^{2+}$  i  $Cu^{2+}$  zachowuje się bardzo podobnie: monomeryczne kompleksy zaczynają się tworzyć już w  $pH < 2$ , gdzie biskompleksy powstają w  $pH > 2$ , a w  $pH$  zasadowym powstają hydrokso-formy kompleksowe. Jedyną różnicą jest powstanie dwujądrowej formy kompleksowej  $[Cu_2^{2+}L_3]$  w układzie  $Cu^{2+}$ -Triapina w zakresie  $pH$  6–9 [1]. Dla układu  $Fe^{3+}$ -Triapina zaobserwowano tylko dwie formy kompleksowe  $Fe^{3+}L$  oraz  $Fe^{3+}L_2$ , przy czym dominacja biskompleksu następuje prawie w całym zakresie  $pH$  3–10. W przypadku jonów metali dwu- i trójwartościowych, utworzenie kompleksów następuje z zaangażowaniem do sfery koordynacyjnej dwóch atomów azotu ( $N_{(pirydynowy)}$ ,  $N_{(azometynowy)}$ ) oraz atomu siarki ( $S_{(hydrazonowa)}$ ) [14].



Rysunek 5. Wzory strukturalne wybranych ligandów tiosemikarbazonowych (pochodnych triapiny) omawianych w pracy

Figure 5. Structures of selected thiosemicarbazones (derivatives of Triapine) discussed in this review

W latach 2011–2015, zbadano właściwości koordynacyjne dla serii ligandów tiosemikarbazonowych będących *N*-heterocyklicznymi analogami triapiny [1, 10, 14, 15] (Rys. 5, Tabela 1).

W Tabeli 1 zaprezentowano dane dotyczące stałych trwałości oraz wartości  $pM$  dla związków koordynacyjnych  $\alpha(N)$ -pirydyłowych tiosemikarbazonów (FTSC, PTSC, APTSC, FaTSC, AcTSC) i ich pochodnych (mPip-dm-FTSC i Morph-dm-FTSC) oraz salicylaldehydtiosemikarbazonu (STSC) z jonami  $Cu^{2+}$  i  $Fe^{2+}$  oraz  $Fe^{3+}$ .

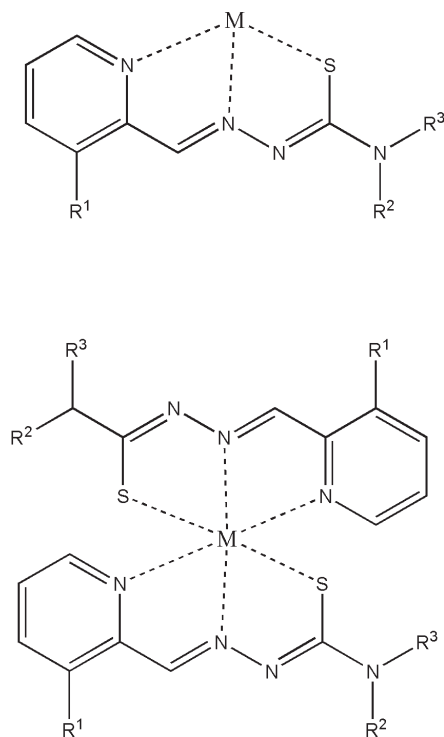
Tabela 1. Porównanie stałych trwałości oraz wartości pM dla ligandów tiosemikarbazonowych, pochodnych triapiny, z jonami metali  $\text{Cu}^{2+}$  i  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$   
 Table 1. Comparison of stabilities constants and pM values for  $\text{Cu}^{2+}$  i  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$  complexes of selected thiosemicarbazones

	Triapina	FTSC	PSTC	APSTC	FaTSC	AcTSC	mPip-dm-FTSC	Morph-dm-FTSC	STSC
$\log\beta[\text{CuLH}_2]$	–		–	–	–	–	27.5 <sup>d</sup>	–	–
$\log\beta[\text{CuLH}]$	–		–	–	–	–	26.47 <sup>d</sup>	20.3 <sup>d</sup>	23.03 <sup>c</sup>
$\log\beta[\text{CuL}]$	13.89 <sup>a</sup>		13.57 <sup>a</sup>	13.95 <sup>a</sup>	–	–	20.26 <sup>d</sup>	18.86 <sup>d</sup>	19.02 <sup>c</sup>
$\log\beta[\text{CuLH}_{-1}]$	5.89 <sup>a</sup>		–	7.20 <sup>a</sup>	–	–	8.4 <sup>d</sup>	7.2 <sup>d</sup>	8.75 <sup>c</sup>
$\log\beta[\text{CuLH}_{-2}]$	–5.98 <sup>a</sup>		–	–	–	–	–	–	–
$\log\beta[\text{CuL}_2\text{H}]$	27.16 <sup>a</sup>		27.49 <sup>a</sup>	28.11 <sup>a</sup>	–	–	–	–	–
$\log\beta[\text{CuL}_2]$	20.32 <sup>a</sup>		21.23 <sup>a</sup>	21.90 <sup>a</sup>	–	–	–	–	–
$\log\beta[\text{Cu}_2\text{L}_3]$	38.79 <sup>a</sup>		39.00 <sup>a</sup>	41.12 <sup>a</sup>	–	–	–	–	–
pCu <sup>2+</sup>	11.56		11.49	12.82			17.80	17.02	18.48
$\log\beta[\text{Fe}^{2+}\text{LH}]$	15.91 <sup>a</sup>	–	–	–	15.96 <sup>b</sup>	–			21.00 <sup>c</sup>
$\log\beta[\text{Fe}^{2+}\text{L}]$	12.29 <sup>a</sup>	12.48 <sup>b</sup>	13.27 <sup>a</sup>	14.37 <sup>a</sup>	11.23 <sup>b</sup>	14.37 <sup>b</sup>			13.56 <sup>c</sup>
$\log\beta[\text{Fe}^{2+}\text{LH}_{-1}]$	–	–	–	8.92 <sup>a</sup>	–	–			–
$\log\beta[\text{Fe}^{2+}\text{L}_2\text{H}]$	27.70 <sup>a</sup>	26.2 <sup>b</sup>	27.54 <sup>a</sup>	29.09 <sup>a</sup>	27.41 <sup>b</sup>	28.35 <sup>b</sup>			32.73 <sup>c</sup>
$\log\beta[\text{Fe}^{2+}\text{L}_2]$	22.55 <sup>a</sup>	22.31 <sup>b</sup>	23.37 <sup>a</sup>	24.16 <sup>a</sup>	21.59 <sup>b</sup>	23.75 <sup>b</sup>			24.73 <sup>c</sup>
$\log\beta[\text{Fe}^{2+}\text{L}_2\text{H}_{-1}]$	10.83 <sup>a</sup>	–	–	–	10.44 <sup>b</sup>	12.97 <sup>b</sup>			16.12 <sup>c</sup>
pFe <sup>2+</sup>	11.60	10.51	12.90	14.61	9.03	11.57			17.96
$\log\beta([\text{Fe}^{3+}\text{LH}]$	14.03 <sup>b</sup>	14.48 <sup>b</sup>	17.5 <sup>b</sup>	15.48 <sup>b</sup>	16.77 <sup>b</sup>	16.69 <sup>b</sup>			22.26 <sup>c</sup>
$\log\beta([\text{Fe}^{3+}\text{L}]$	–	–	–	–	–	–			18.68 <sup>c</sup>
$\log\beta[\text{Fe}^{3+}\text{L}_2\text{H}]$	–	–	–	–	–	–			39.14 <sup>c</sup>
$\log\beta([\text{Fe}^{3+}\text{L}_2]$	26.25 <sup>b</sup>	25.44 <sup>b</sup>	30.89 <sup>b</sup>	28.59 <sup>b</sup>	30.51 <sup>b</sup>	29.70 <sup>b</sup>			34.02 <sup>c</sup>
$\log\beta[\text{Fe}^{3+}\text{L}_2\text{H}_{-1}]$	–	–	–	–	–	–			22.72 <sup>c</sup>
pFe <sup>3+</sup>	15.29	13.59	20.41	18.61	17.90	17.26			26.82

Stałe trwałości zostały wyznaczone w DMSO/H<sub>2</sub>O 30%, T = 298K, I = 0,1 KCl. Wartości pM = –log [M] zostały policzone w pH 7,40; dla C<sub>L</sub>/C<sub>M</sub> = 10; C<sub>M</sub> = 1 μM. (A) [1], (b) [14] (c) [10] (d) [15].

Dla α(N)-pirydylowych tiosemikarbazonów, analogów Triapiny, również zaobserwowano tworzenie mono- i bis-kompleksów z jonami Fe<sup>2+</sup> oraz Fe<sup>3+</sup>. Monomeryczne kompleksy z jonami Fe<sup>2+</sup> zaczynają się tworzyć w pH poniżej 2, a w wyniku ich powstania na widmach UV-Vis można zaobserwować wzrost pasma absorpcji przy 450–500 nm, dla biskompleksów zaobserwowano pasmo przy 610–620 nm w zakresie pH od 2–10 jest to pasmo z przeniesieniem ładunku z jonu metalu na ligand [1, 15]. Sugerowanym sposobem koordynacji dla kompleksów [Fe<sup>2+</sup>L] i [Fe<sup>2+</sup>L<sub>2</sub>] jest model trójkleszczowy przy

zaangażowaniu w sferze koordynacyjnej jonu metalu atomów  $N_{(\text{pirydynowy})}$ ,  $N_{(\text{azometynowy})}$  i  $S_{(\text{hydrazonowa})}$  (Rys. 6). Dla  $Fe^{3+}$  sugerowano analogiczny sposób koordynacji, co dodatkowo potwierdzono krystalograficznie [16].



Rysunek 6. Schemat proponowanych struktur kompleksów ligandów tiosemikarbazonowych [1, 10]  
Figure 6. Proposed structures for metal complexes of thiosemicarbazones [1, 10]

Kolejne formy kompleksów z jonami  $Fe^{2+}$  ( $[Fe^{2+}L_2H_{-1}]$  oraz  $[Fe^{2+}LH_{-1}]$ ) powstają na skutek deprotonacji cząsteczki wody zaangażowanej w koordynację lub na skutek wymiany skoordynowanej grupy funkcyjnej na jon hydroksylowy [15].

Ligand STSC został zmodyfikowany w stosunku do struktury Triapiny poprzez zastąpienie pierścienia pirydynowego pierścieniem fenolowym. Modyfikacja ta doprowadziła do zmiany sfery koordynacyjnej jonów  $Fe^{2+}$  oraz  $Fe^{3+}$  z  $N_{(\text{pirydynowy})}$ ,  $N_{(\text{azometynowy})}$ ,  $S_{(\text{hydrazonowa})}$  na  $O_{(\text{fenolanowy})}$ ,  $N_{(\text{azometynowy})}$ ,  $S_{(\text{hydrazonowa})}$ . Wprowadzenie atomu tlenu jako grupy funkcyjnej w kompleksach  $Fe^{3+}$  przyczyniło się do zwiększenia stałych trwałości związków koordynacyjnych, w porównaniu do kompleksów  $\alpha(N)$ -pirydynowych o około 4 rzędy (Tab. 1), ale nie zmieniło stechiometrii związków w roztworach wodnych. Ponadto kompleks  $[Fe^{3+}(STSC)_2]$  został wyizolowany w postaci kryształu [17]. Podobnie jak w przypadku  $\alpha(N)$ -pirydynowych tiosemikarbazonów, tworzenie się monomerycznych kompleksów  $Fe^{2+}$  skutkuje pojawieniem się pasm absorpcji przy 430–480 nm, a biskompleksów – pasm przy około 600–620 nm [1, 10].

Geometria związków kompleksowych jonów  $\text{Cu}^{2+}$  wyróżnia się ze względu na wpływ efektu Jahn-Tellera, i co za tym idzie: odkształcenia od geometrii tetraedrycznej. Kompleksy  $\text{Cu}^{2+}$   $\alpha(N)$ -pirydynowych TSCs charakteryzują się tą samą sferą koordynacji co jony  $\text{Fe}^{2+}$  oraz  $\text{Fe}^{3+}$ . Przy użyciu technik badawczych, takich jak paramagnetyczny rezonans elektronowy oraz spektrometria mas, dwujądrowe formy kompleksów z jonami  $\text{Cu(II)}$  zaobserwowano tylko dla Triapiny, PTSC oraz APTSC; forma  $[\text{Cu}_2\text{L}_3]$  również została uwzględniona i zaakceptowana w modelu potencjometrycznym [1].

Dla pochodnych  $\alpha(N)$ -pirydynowych, wydłużonych o ugrupowanie morfolinowe czy metylo-piperazynowe (Morph-dm-FTSC i mPip-dm-FTSC odpowiednio), zaobserwowano tylko monomeryczne kompleksy  $\text{Cu}^{2+}$ . W zakresie pH od 5 do 8 tworzy się kompleks cztero-kleszczowy z zaangażowaniem trzech atomów azotu pochodzących z ugrupowania morfolinowego/piperazynowego, pirydynowego oraz azometynowego ugrupowań i jednego atomu siarki z grupy hydrazonowej. Taki model koordynacji potwierdzono krystalograficznie [15]. Ze zwiększeniem zasadowości roztworu tworzy się forma kompleksowa  $[\text{CuLH}_{-1}]$ , która odzwierciedla formowanie hydroksokompleksów, gdzie donorowy atom azotu, pochodzący od grupy morfolinowej/piperazynowej, został zastąpiony anionem hydroksylowym. Dla układu  $\text{Cu}^{2+}$ -mPip-dm-FTSC zaobserwowano dodatkowy krok deprotonacji w pH 6,26, który świadczy o deprotonacji terminalnego atomu azotu ugrupowania piperazynowego [15].

Mimo że stałe trwałości są wiarygodnym wskaźnikiem trwałości kompleksów, to nie zawsze odzwierciedlają efektywność wiązania jonu metalu w określonych warunkach. Procesy protonacji liganda, ale też liczba i charakter grup wiążących oraz różnice molowego stosunku metalu do liganda, mają bardzo duży wpływ na powstawanie form kompleksowych w różnym pH. Wobec powyższego, w celu porównania siły wiązania jonów metalu przez ligandy tiosemikarbazonowe, obliczamy stężenie wolnych jonów metalu w określonych warunkach stężeń metalu i liganda oraz w konkretnym pH. Im wyższa wartość pM (dla miedzi oznaczane jako  $\text{pCu}^{2+}$ , dla jonów żelaza  $\text{pFe}^{2+}/\text{pFe}^{3+}$ , tym skuteczniej ligand wiąże jony metalu w zadanych warunkach, Równanie (1).

$$pM(\text{II/III}) = -\log[M(\text{II/III})]_{aq} \quad (1)$$

Stężenie wolnych jonów metalu wyznaczono dla  $c_{\text{ligand}} = 1 \cdot 10^{-5} \text{ M}$  i  $c_{\text{M}} = 1 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ , w warunkach pH 7,4 i 25°C. Obliczone wartości pM przedstawione są w Tabeli 1.

Z wyliczonych danych wynika, że w zadanych warunkach najmocniej jony  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$  oraz  $\text{Cu}^{2+}$  wiążą ligand STSC,  $\text{pFe}^{2+} = 17,96$ ,  $\text{pFe}^{3+} = 26,82$ ,  $\text{pCu}^{2+} = 18,48$ . Wysoką wartość  $\text{pCu}^{2+}$  wykazują również mPip-dm-FTSC oraz Morph-dm-FTSC, które charakteryzują się czterokleszczowym sposobem koordynacji. Z omówionych danych wynika, że *N*-dimetylowane ligandy są silniejszymi chelatorami jonów metali przejściowych, w porównaniu do Triapiny, a czterokleszczowy sposób wiązania zwiększa stabilność kompleksów  $\text{Cu}^{2+}$ -tiosemikarbazon. Dane literaturowe pokazują



również, że większa stabilność kompleksów ligandów z grupami metylowymi przekłada się na ich zwiększoną aktywność biologiczną. Potwierdza to ogólną zależność, że aktywność biologiczna związków jest ściśle związana z ich strukturą i poprzez jej odpowiednie modyfikacje można zmieniać właściwości badanych związków [1, 10].

Wybór rozpuszczalnika DMSO/H<sub>2</sub>O 30% w/w podyktowany jest niską rozpuszczalnością kompleksów w środowisku wodnym, w stężeniach potrzebnych do fizyko-chemicznej analizy kompleksów, rzędu 10<sup>-3</sup> M. Niska rozpuszczalność związków koordynacyjnych nie jest przeszkodą w warunkach eksperymentów biologicznych, wykonywanych w stężeniach 10<sup>-6</sup> M. W takich warunkach kompleksy tiosemikarbazonów są dobrze rozpuszczalne w wodzie.

### 1.3. AKTYWNOŚĆ BIOLOGICZNA

Aktywność biologiczna tiosemikarbazonów jest ściśle związana z ich zdolnością do chelatowania jonów metali przejściowych. W większości zanotowanych przypadków kompleksy tiosemikarbazonów wykazują znacznie wyższą aktywność w porównaniu do wolnych ligandów. Badania kompleksów Fe<sup>2+</sup>/Fe<sup>3+</sup> oraz Cu<sup>2+</sup> wykazały, że są one wyraźnie bardziej aktywne w procesie niszczenia komórek lub hamowania syntezy DNA, niż nieskompleksowane ligandy [18]. W ciągu ostatnich lat intensywnie badano możliwość biologicznego zastosowania wielu kompleksów omawianych ligandów. W wyniku prowadzonych na przełomie kilkudziesięciu lat badań udowodniono, że tiosemikarbazony oraz ich kompleksy mogą być stosowane jako środki przeciwnowotworowe, przeciwbakteryjne, przeciwgrzybiczne, a także przeciwwirusowe. Niektóre z nich są stosowane jako leki o wyżej wymienionym działaniu [19].

Pierwsze prace donoszące o zastosowaniu tiosemikarbazonów jako leków przeciwko trądowi oraz gruźlicy zostały opublikowane w połowie lat 90. [20, 21]. W tym czasie odkryto przeciwbakteryjne działanie tiosemikarbazonów, które zostało potwierdzone również *in vivo*. Znanym od roku 1954 środkiem stosowanym przeciwko *Mycobacterium spp.* jest indolo-3-tiosemikarbazon [22].

Jeden ze znanych prekursorów leków należący do grupy tiosemikarbazonów, tioacetazon (Rys. 5) – jest stosowany jako środek wspomagający leczenie gruźlicy. Jako prolek, czyli forma nieaktywna farmakologicznie, podawany jest on w połączeniu z substancją zwiększającą jego aktywność. Wykazuje on działanie przeciwko opornym szczepom *Mycobacterium tuberculosis*. Niestety, tioacetazon okazał się szczególnie toksyczny dla pacjentów zakażonych wirusem HIV, w związku z czym Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) zajęła stanowisko sprzeciwiające się stosowaniu leku u pacjentów z tej grupy [23]. Konieczne było opracowanie analogów tioacetazonu, które okazały się bardziej aktywne biologicznie od swojego prekursora [24].

Badania dotyczące przeciwwirusowych właściwości tiosemikarbazonów zaowocowały odkryciem isatyno-β-tiosemikarbazonu, stanowiącego substancję

czynną leku Metisazon (Rys. 5), stosowanego m.in. w leczeniu ospy. Działanie tego leku opiera się na hamowaniu syntezy wirusowego mRNA [25, 26].

W literaturze zanotowano hamujący wpływ tiosemikarbazonów na wzrost pasożytniczych pierwotniaków, będących przyczyną malarii. Uważa się, że omawiane związki mają wpływ na proces trawienia hemoglobiny w wakuoli żywieniowej pasożytów. Przepuszczalnie istnieje kilka mechanizmów tego procesu, z których wszystkie mają niekorzystny wpływ na zdolność pasożyta do rozkładu hemoglobiny gospodarza, wymaganego dla syntezy odpowiednich białek. W jednym z mechanizmów opisuje się, że jako chelatory metali mogące wiązać jony  $\text{Fe}^{3+}$ , tiosemikarbazony mogą hamować wzrost malarii poprzez blokowanie dostępności tego metalu dla enzymów zaangażowanych w szlak biosyntezy hemu [27, 28]. Znalaziono również nieliczne przykłady kompleksów tiosemikarbazonów z jonami  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  oraz  $\text{Fe}^{2+}$ , wykazujących działanie antymalaryczne [9].

Najnowsze doniesienia literaturowe dowodzą, że związki tiosemikarbazonowe były badane w kierunku leczenia choroby Alzheimera (AD) [29, 30]. Pomocne w leczeniu choroby AD okazały się również kompleksy bis(tiosemikarbazonowe), szczególnie kompleksy  $\text{Cu}^{2+}$ . Jedną z przyczyn powstawania tej choroby jest zaburzona homeostaza jonów miedzi oraz cynku w mózgu. Bis(tiosemikarbazony), które z łatwością mogą przedostać się przez błony komórkowe, mogą przyczyniać się do modulowania stężenia tych jonów, których zaburzona homeostaza przyczynia się do powstawania AD, a tym samym regulować tworzenie się płytek  $\beta$ -amyloidowych. Dokładny mechanizm zaangażowania tych kompleksów w hamowanie patogenezy choroby Alzheimera jest nadal w trakcie badań [31]. Opracowano serię związków, które w strukturze zawierają farmakofor 1-benzylpiperydyny z Donepezilu (klinicznie używanego inhibitora acetylocholinoesterazy AChE) oraz resztę tiosemikarbazonu chelatującego metal. Tak zaprojektowane związki miały umożliwić: (1) chelowanie metali aktywnych redoks (zapobieganie wytwarzania RFT oraz agregatów białkowych); (2) hamowanie aktywności acetylocholinoesterazy (w celu zwiększenia poziomu ACh); i (3) indukcję autofagii (w celu usunięcia toksycznych agregatów białkowych). Ponadto unikalna grupa tiosemikarbazonów wykazała ogólnie niską cytotoksyczność, która jest inną kluczową właściwością w leczeniu AD. Spośród badanych tiosemikarbazonów wiodący okazał się związek 4-*N*-(1-benzylpiperydin-4-yl) tiosemikarbazon pirydoksalu (PBPT). Środek ten wykazał najbardziej obiecującą wielokierunkową aktywność, podkreślając potencjał liganda wiodącego, PBPT, jako obiecującego wielofunkcyjnego środka do leczenia AD [32].

Znalaziono również inne zastosowanie dla kompleksów bis(tiosemikarbazonowych) z jonami  $\text{Cu}^{2+}$ . Prowadzone są badania nad wykorzystywaniem tych kompleksów jako radiofarmaceutyków do obrazowania cząsteczkowego procesów metabolicznych i fizjologicznych [33].

#### 1.4. AKTYWNOŚĆ PRZECIWNOWOTWOROWA

W literaturze opisywane jest kilka mechanizmów oddziaływania tiosemikarbazonów i ich kompleksów w terapii przeciwnowotworowej. Wszystkie z nich oparte są na zdolności omawianej grupy ligandów do trwałego kompleksowania jonów miedzi lub żelaza [18]. Najszerzej opisywane mechanizmy dotyczą hamowania aktywności reduktazy rybonukleotydowej (RR), Fe-zależnego enzymu odpowiedzialnego za dostarczanie – prekursorów niezbędnych do syntezy DNA, odpowiedzialnych za namnażanie komórek [34]. RR składa się z dwóch podjednostek (R1 i R2). Podjednostka aktywna enzymu (R2), której kofaktorem jest rodnik tyrozynowy, stabilizowana jest przez jon żelaza [35]. Ze względu na wzmożony podział i większą aktywność RR, komórki nowotworowe mają zwiększone zapotrzebowanie na jony żelaza. Hamowanie aktywności RR spowalnia szybkość namnażania się komórek nowotworowych. W latach 60. sugerowano, że obniżenie aktywności RR jest powodowane przez wiązanie i dezaktywację jonów żelaza niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania enzymu, przez wprowadzane do komórki chelatory tego metalu [36]. Drugim mechanizmem hamującym działanie RR i wpływającym destrukcyjnie na komórkę nowotworową jest zainicjowany przez kompleksy tiosemikarbazonowe wzrost produkcji reaktywnych form tlenu (RFT) wpływających destabilizująco na rodnik tyrozynowy, niezbędny do aktywności enzymu [12]. Mechanizm działania jednego z przedstawicieli tiosemikarbazonów, Triapiny (Rys. 5), będącej obecnie w II fazie badań klinicznych, opiera się na hamowaniu RR poprzez generowanie RFT [37, 38]. Aktywność ta została zanotowana zarówno *in vitro*, jak i *in vivo* [39]. Triapina wykazuje wysokie powinowactwo wobec jonów  $Fe^{2+}$ , a tworzone kompleksy reagują z cząsteczkowym tlenem, czego wynikiem jest wzmożona produkcja RFT [14]. Mimo że Triapina podczas wieloletnich badań klinicznych wykazywała szereg skutków ubocznych, takich jak zmęczenie, nudności czy wymioty, a nawet niedotlenienie i niedociśnienie, badania wciąż są kontynuowane [40]. Dotyczą one wykorzystania synergicznego działania Triapiny w połączeniu z powszechnie stosowanymi lekami przeciwnowotworowymi. W układzie takim Triapina ma za zadanie opóźnić procesy naprawcze DNA po uszkodzeniach wywołanych podanymi wcześniej środkami [41].

Kolejnym, opisywanym w literaturze mechanizmem antynowotworowej aktywności tiosemikarbazonów, jest ich zdolność do hamowania ATP-zależnego enzymu topoizomerazy IIa. Enzym ten odpowiedzialny jest za zmiany w strukturze przestrzennej DNA. Ułatwia on zachodzenie takich procesów, jak replikacja, transkrypcja oraz rekombinacja, w związku z czym zahamowanie aktywności tego enzymu uszkadza DNA oraz zatrzymuje cykl komórki [42, 43].

Aktywność tiosemikarbazonowych kompleksów  $Cu^{2+}$  opiera się na dostarczaniu jonów  $Cu^{2+}$  do komórek nowotworowych w postaci kompleksów. Po wprowadzeniu kompleksu do wnętrza komórki, w cytozolu, jony  $Cu^{2+}$  zredukowane są do jonów  $Cu^{+}$ , wobec których ligandy tiosemikarbazonowe wykazują znacznie niższe powinowactwo. W związku z tym, na skutek dysocjacji,  $Cu^{+}$  odłącza się od

liganda, który w postaci niezwiązanej opuszcza komórkę. Dostarczana w ten sposób do komórki neoplastycznej  $\text{Cu}^+$  zatrzuwa ją, w wyniku czego hamuje jej czynności życiowe – syntezę DNA oraz fosforylację oksydacyjną [44, 45].

Wielotorowy charakter aktywności przeciwnowotworowej tiosemikarbazonów jest inspiracją przy projektowaniu nowych związków, jako potencjalnych leków przeciwnowotworowych. Oprócz opisanej powyżej Triapiny, będącej najbardziej obiecującym związkiem z grupy tiosemikarbazonów, należy wspomnieć również o pochodnych zawierających dwa pierścienie pirydylowe (DpT) (Rys. 5), wykazujących aktywność przeciwnowotworową, zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo* [46]. Najskuteczniejszym chelatorem tej grupy jest Dp44mT, który został przebadany na 28 liniach nowotworowych, m.in. białaczki, szpiczaka mnogiego, raka piersi, wykazując w większości przypadków aktywność na poziomie nanomolowym [46]. Porównując jego aktywność antyproliferacyjną oraz indeks terapeutyczny z Triapiną oraz doxorubicyną, Dp44mT jest najbardziej aktywną substancją na poziomie *in vitro*. Kolejne badania biologiczne na modelu mysim potwierdziły wysoką aktywność tego chelatora, prowadząc do całkowitego zaniku guza [47]. Niestety badania *in vivo* ujawniły również kardiotoksyczność, która zdyskwalifikowała Dp44mT z dalszych badań klinicznych [46]. W wyniku intensywnych badań otrzymano kolejny bardzo skuteczny analog – DpC. Związek ten wykazał w badaniach *in vivo* i *in vitro* o wiele wyższą skuteczność oraz tolerancję niż jego poprzednik Dp44mT [48]. Najnowsze doniesienia podkreślają szczególną skuteczność DpC względem ludzkiego raka trzustki na modelu *in vivo*, wyższą niż stosowany powszechnie w medycynie lek gemcytabina [49].

Podstawowym mechanizmem działania obu związków, Dp44mT oraz DpC jest ich zdolność do chelatowania jonów żelaza oraz miedzi, co może spowodować tzw. „podwójne uderzenie” (ang. *double punch*). W pierwszej kolejności, poprzez związanie wewnątrzkomórkowego żelaza następuje zatrzymanie cyklu komórkowego. Następnie tworzące się kompleksy z żelazem lub miedzią uczestniczą w reakcji Fentona, generując reaktywne formy tlenu (RFT), w szczególności rodnik hydroksylowy, który działa cytotoksycznie na komórki [50, 51].

Co więcej, ze względu na dobrą tolerancję pacjentów na lek, podawany drogą dożylną oraz doustną, brak większych skutków ubocznych w optymalnych dawkach, a także dobry profil farmakokinetyczny, DpC w 2016 roku wszedł w I fazę badań klinicznych (NCT02688101) [52].

Inspirując się silną aktywnością przeciwnowotworową ligandów z klasy DpT (Rys. 5), skonstruowano nową klasę związków, poprzez zastąpienie jednego pierścienia pirydylowego pierścieniem fenolowym, otrzymując związki z serii BpT [53]. Modyfikacja ta zwiększyła ich liofilowość, ułatwiając tym samym wnikanie do wnętrza komórek [54]. Obie grupy ligandów charakteryzują się szerokim zakresem aktywności. Obok hamowania RR, oddziałują one również na inne cząsteczki istotne podczas przebiegu cyklu komórkowego, np. topoizomerazę  $\text{II}\alpha$  [55, 56].

Podczas projektowania nowych tiosemikarbazonów o potencjalnym działaniu antyneoplastycznym należy pamiętać, że na ich aktywność ma wpływ przede wszystkim struktura wpływająca na ich zdolności koordynacyjne, liofilowość oraz rozpuszczalność w wodzie. Poprzez wprowadzanie odpowiednich grup funkcyjnych, można modyfikować wymienione cechy tak, by zoptymalizować aktywność związków i ich kompleksów oraz zmniejszać skutki uboczne, jakie mogą wywoływać podczas testów *in vivo*.

## PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Przegląd literatury wyraźnie wskazuje, że tiosemikarbazony stanowią grupę związków o znacznym potencjale aktywności biologicznej, dzięki zdolności ligandów do silnego chelatowania jonów metali przejściowych, w szczególności  $\text{Cu}^{2+}$  i  $\text{Fe}^{3+}$ . Tym właściwościom zawdzięczają one, m.in. swoją aktywność przeciwnowotworową.

Badane dotychczas tiosemikarbazony tworzą trwałe kompleksy z omawianymi kationami metali. Jak dotąd, najbardziej obiecującym związkiem okazała się Triapina, która obecnie znajduje się w fazie badań klinicznych. Poprzez wprowadzanie dodatkowych lub nowych grup, możliwa jest znaczna modyfikacja właściwości uzyskanych związków. Duże znaczenie ma wprowadzanie do struktury tiosemikarbazonu dodatkowych atomów donorowych, które mogą brać bezpośredni udział w wiązaniu jonów metali. Jest to szczególnie istotne, ponieważ umożliwia zmianę trwałości tworzonych przez nie kompleksów oraz ma bezpośredni wpływ na ich aktywność biologiczną. Kolejne modyfikacje mają na celu uzyskanie najbardziej efektywnych ligandów, które będą skutecznie działały terapeutycznie, nie wywierając przy tym negatywnych skutków ubocznych. W pracy przedstawiono szereg ligandów będących pochodnymi Triapiny, charakteryzujących się wyższą trwałością kompleksów tworzonych z jonami  $\text{Cu}^{2+}$  oraz  $\text{Fe}^{3+}$ , a także większą aktywnością biologiczną. Najbardziej efektywne okazały się *N*-heterocykliczne ligandy, zawierające w swojej strukturze podstawniki metylowe.

Mimo że chemia tiosemikarbazonów jest znana od lat i od dawna przykładą się dużą uwagę do ich aktywności biologicznej, to dopiero ostatnio zaczęto szczegółowo badać ich właściwości koordynacyjne względem jonów metali przejściowych. Pozwoliło to na odkrycie związku pomiędzy strukturą tworzonych kompleksów, a ich funkcją i aktywnością *in vivo*. Prowadzone obecnie badania dotyczące tiosemikarbazonów dają obiecujące wyniki, które zostaną wkrótce opublikowane w czasopiśmie z listy filadelfijskiej.

## PIŚMIENICTWO CYTOWANE

- [1] E.A. Enyedy, N.V. Nagy, E. Zsigo, C.R. Kowol, V.B. Arion, B.K. Keppler, T. Kiss, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2010, 1717.
- [2] D.S. Kalinowski, P. Quach, D.R. Richardson, *Future Med. Chem.*, 2009, **1**, 1143.
- [3] X.H. Du, C. Guo, E. Hansell, P.S. Doyle, C.R. Caffrey, T.P. Holler, J.H. McKerrow, F.E. Cohen, *J. Med. Chem.*, 2002, **45**, 2695.
- [4] R.B. de Oliveira, E.M. de Souza-Fagundes, R.P.P. Soares, A.A. Andrade, *Eur. J. Med. Chem.*, 2008, **43**, 1983.
- [5] *IUPAC Nomenclature of Organic Compounds*, R. Panico, W.H. Powell, J.C. Richer (Red.), Blackwell, London 1993.
- [6] J.S. Casas, M.S. Garcia-Tasende, J. Sordo, *Coord. Chem. Rev.*, 2000, **209**, 197.
- [7] A.I. Matesanz, P. Souza, *Mini-Rev. Med. Chem.*, 2009, **9**, 1389.
- [8] M.A. Ali, S.E. Livingstone, *Coord. Chem. Rev.*, 1974, **13**, 101.
- [9] P. Chellan, S. Nasser, L. Vivas, K. Chibale, G.S. Smith, *J. Organomet. Chem.*, 2010, **695**, 2225.
- [10] E.A. Enyedy, E. Zsigo, N.V. Nagy, C.R. Kowol, A. Roller, B.K. Keppler, T. Kiss, *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2012**, 4036.
- [11] F.A. Cotton, *Chemia nieorganiczna*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2002.
- [12] Y. Yu, D.S. Kalinowski, Z. Kovacevic, A.R. Siafakas, P.J. Jansson, C. Stefani, D.B. Lovejoy, P.C. Sharpe, P.V. Bernhardt, D.R. Richardson, *J. Med. Chem.*, 2009, **52**, 5271.
- [13] T.S. Lobana, R. Sharma, G. Bawa, S. Khanna, *Coord. Chem. Rev.*, 2009, **253**, 977.
- [14] E.A. Enyedy, M.F. Primik, C.R. Kowol, V.B. Arion, T. Kiss, B.K. Keppler, *Dalton Trans.*, 2011, **40**, 5895.
- [15] F. Bacher, O. Domotor, A. Chugunova, N.V. Nagy, L. Filipovic, S. Radulovic, E.A. Enyedy, V.B. Arion, *Dalton Trans.*, 2015, **44**, 9071.
- [16] C.R. Kowol, R. Trondl, P. Heffeter, V.B. Arion, M.A. Jakupec, A. Roller, M. Galanski, W. Berger, B.K. Keppler, *J. Med. Chem.*, 2009, **52**, 5032.
- [17] W.S. Wu, Y.L. Feng, *Z. Kristallogr. New Cryst. Struct.*, 2003, **218**, 529.
- [18] H. Beraldo, D. Gambino, *Mini-Rev. Med. Chem.*, 2004, **4**, 31.
- [19] J. Shim, N.R. Jyothi, N.A.M. Farook, *Asian J. Chem.*, 2013, **25**, 5838.
- [20] O. Koch, G. Stuttgen, *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmakol. Exp. Pathol.*, 1950, **210**, 409.
- [21] E.M. Bavin, R.J.W. Rees, J.M. Robson, M. Seiler, D.E. Seymour, D. Suddaby, *J. Pharm. Pharmacol.*, 1950, **2**, 764.
- [22] L.E. Weller, H.M. Sell, R.Y. Gottshall, *J. Am. Chem. Soc.*, 1954, **76**, 1959.
- [23] P. Nunn, J. Porter, P. Winstanley, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1993, **87**, 578.
- [24] G.D. Coxon, D. Craig, R.M. Corrales, E. Viialla, L. Gannoun-Zaki, L. Kremer, *Synthesis, Plos One*, 2013, 8.
- [25] D.J. Bauer, Stvincen, C.H. Kempe, P.A. Young, A.W. Downie, *Am. J. Epidemiol.*, 1969, **90**, 130.
- [26] D.C. Quenelle, K.A. Keith, E.R. Kern, *Antiviral Res.*, 2006, **71**, 24.
- [27] A. Walcourt, M. Loyevsky, D.B. Lovejoy, V.R. Gordeuk, D.R. Richardson, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2004, **36**, 401.
- [28] A. Chipeleme, J. Gut, P.J. Rosenthal, K. Chibale, *Bioorg. Med. Chem.*, 2007, **15**, 273.
- [29] S. Ayton, P. Lei, A.I. Bush, *Free Radic. Biol. Med.*, 2013, **62**, 76.
- [30] P.T. Francis, A.M. Palmer, M. Snape, G.K. Wilcock, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 1999, **66**, 137.
- [31] C. Lambert, H. Beraldo, N. Lievre, A. Garnier-Suillerot, P. Dorlet, M. Salerno, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2013, **18**, 59.
- [32] D. Palanimuthu, R. Poon, S. Sahni, R. Anjum, D. Hibbs, H.Y. Lin, P.V. Bernhardt, D.S. Kalinowski, D.R. Richardson, *Eur. J. Med. Chem.*, 2017, **139**, 612.

- [33] L. Wei, J. Easmon, R.K. Nagi, B.D. Muegge, L.A. Meyer, J.S. Lewis, *J. Nucl. Med.*, 2006, **47**, 2034.
- [34] J.M. Shao, B.S. Zhou, A.J. Di Bilio, L.J. Zhu, T.L. Wang, C. Qi, J. Shih, Y. Yen, *Mol. Cancer Ther.*, 2006, **5**, 586.
- [35] M. Kolberg, K.R. Strand, P. Graff, K.K. Andersson, *Biochim. Biophys. Acta - Proteins and Proteomics*, 2004, **1699**, 1.
- [36] A.C. Sartorelli, B.A. Booth, *Cancer Res.*, 1967, **27**, 1614.
- [37] C.M. Nutting, C.M.L. van Herpen, A.B. Miah, S.A. Bhide, J.P. Machiels, J. Buter, C. Kelly, D. de Raucourt, K.J. Harrington, 2009, **20**, 1275.
- [38] J. Kolesar, R.C. Brundage, M. Pomplun, D. Alberti, K. Holen, A. Traynor, P. Ivy, G. Wilding, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 2011, **67**, 393.
- [39] R.A. Finch, M.C. Liu, S.P. Grill, W.C. Rose, R. Loomis, K.M. Vasquez, Y.C. Cheng, A.C. Sartorelli, *Biochem. Pharm.*, 2000, **59**, 983.
- [40] S. Wadler, D. Makower, C. Clairmont, P. Lambert, K. Fehn, M. Sznol, *J. Clin. Oncol.*, 2004, **22**, 1553.
- [41] C.A. Kunos, T. Radivoyevitch, J. Pink, S.M. Chiu, T. Stefan, J. Jacobberger, T.J. Kinsella, *Radiat. Res.*, 2010, **174**, 574.
- [42] J.C. Yalowich, X. Wu, R. Zhang, R. Kanagasabai, M. Hornbaker, B.B. Hasinoff, *Biochem. Pharmacol.*, 2012, **84**, 52.
- [43] S. Padhye, Z. Afrasiabi, E. Sinn, J. Fok, K. Mehta, N. Rath, *Inorg. Chem.*, 2005, **44**, 1154.
- [44] K.A. Price, P.J. Crouch, I. Volitakis, B.M. Paterson, S. Lim, P.S. Donnelly, A.R. White, *Inorg. Chem.*, 2011, **50**, 9594.
- [45] K.Y. Djoko, P.S. Donnelly, A.G. McEwan, *Metallomics*, 2014, **6**, 2250.
- [46] M. Whitnall, J. Howard, P. Ponka, D.R. Richardson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2006, **103**, 14901.
- [47] J. Yuan, D.B. Lovejoy, D.R. Richardson, *Blood*, 2004, **104**, 1450.
- [48] D.B. Lovejoy, D.M. Sharp, N. Seebacher, P. Obeidy, T. Prichard, C. Stefani, M.T. Basha, P.C. Sharpe, P.J. Jansson, D.S. Kalinowski, P.V. Bernhardt, D.R. Richardson, *J. Med. Chem.*, 2012, **55**, 7230.
- [49] Z. Kovacevic, S. Chikhani, D.B. Lovejoy, D.R. Richardson, *Mol. Pharmacol.*, 2011, **80**, 598.
- [50] N.A. Seebacher, D.R. Richardson, P.J. Jansson, *Br. J. Pharmacol.*, 2015, **172**, 2557.
- [51] D.B. Lovejoy, P.J. Jansson, U.T. Brunk, J. Wong, P. Ponka, D.R. Richardson, *Cancer Res.*, 2011, **71**, 5871.
- [52] P.J. Jansson, D.S. Kalinowski, D.J.R. Lane, Z. Kovacevic, N.A. Seebacher, L. Fouani, S. Sahni, A.M. Merlot, D.R. Richardson, *Pharmacol. Res.*, 2015, **100**, 255.
- [53] D.S. Kalinowski, Y. Yu, P.C. Sharpe, M. Islam, Y.T. Liao, D.B. Lovejoy, N. Kumar, P.V. Bernhardt, D.R. Richardson, *J. Med. Chem.*, 2007, **50**, 3716.
- [54] D.R. Richardson, D.S. Kalinowski, S. Lau, P.J. Jansson, D.B. Lovejoy, *Biochim. Biophys. Acta – General Subjects*, 2009, **1790**, 702.
- [55] N.T.V. Le, D.R. Richardson, *Blood*, 2004, **104**, 2967.
- [56] B.A. Yoshida, M.M. Sokoloff, D.R. Welch, C.W. Rinker-Schaeffer, *J. Natl. Cancer Inst.*, 2000, **92**, 1717.





## WYJAŚNIENIE ELEMENTÓW HOMEOSTAZY NIKLU(II) I CYNKU(II) U BAKTERII I GRZYBÓW

### EXPLAINING ELEMENTS OF NICKEL(II) AND ZINC(II) HOMEOSTASIS IN BACTERIA AND FUNGI

**Magdalena Rowinska-Żyrek**

*Wydział Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego  
ul. Joliot-Curie 14, 50-383 Wrocław  
e-mail: magdalena.rowinska-zyrek@chem.uni.wroc.pl*

---

*Pracę dedykuję pamięci Pani Profesor Małgorzaty Jeżowskiej-Bojczuk*

---

Abstract

Wprowadzenie

1. Wychwyt jonów  $Zn^{2+}$  przez bakterie i grzyby
2. Rola jonów  $Zn^{2+}$  w tworzeniu złogów amyloidowych przeciwdrobnoustrojowej amyliny
3. Bakteryjne białka magazynujące jony  $Ni^{2+}$
4. Transport metali

Uwagi końcowe

Podziękowanie

Piśmiennictwo cytowane

---

---

**Magdalena Rowińska-Żyrek**, po ukończeniu biotechnologii na Politechnice Wrocławskiej (2008) i fizyki w paryskiej École Normale Supérieure de Cachan (2008), podjęła słuszną decyzję o kontynuowaniu pracy naukowej. W 2011 roku obroniła doktorat na Wydziale Chemii UWr (z którym jest związana do dziś), a w latach 2012–2015 pracowała na Uniwersytecie w Zurychu. Po powrocie na UWr zajęła się tematyką chemii bionieorganicznej patogenów i peptydów przeciwdrobnoustrojowych. Poniższa praca jest podsumowaniem jej dorobku habilitacyjnego.

## ABSTRACT

In the last 30 years, no new class of antibiotic was developed, and resistance to these already existing has increased dramatically. It seems reasonable to search for new classes therapeutics, targeting metabolic pathways, which standard therapies do not aim at.

One of the biggest obstacles in finding effective and specific antibacterial and antifungal agents, which do not cause serious side effects in patients, is due to the fact that micro-organisms share many basic metabolic pathways with their human hosts. One of the significant differences may be the transport system and homeostasis of  $Zn^{2+}$  and  $Ni^{2+}$ .

The review sheds new light on the homeostasis of the two metals in bacteria and fungi. The main points are: (i) determination of  $Zn^{2+}$  binding sites on the *C. albicans* Pra1 zincophore and in the N-terminal domain of the *C. albicans* Zrt1 zinc transporter; description of the geometry and thermodynamics of such binding (Fig. 5 and 6); (ii) understanding of the bioinorganic chemistry of zincophore based  $Zn^{2+}$  transport (understanding Pra1-Zrt1 interactions); suggesting how  $Zn^{2+}$  is delivered from the zincophore to the zinc transporter (Fig. 7); (iii) defining the specificity of zincophore-based transport; showing that they can also transport  $Ni^{2+}$  ions; (iv) pointing out  $Zn^{2+}$  binding sites on amylin<sub>1-19</sub> and pramlintide – amylin's non-aggregating analogue; describing the thermodynamics of the process (Fig. 10) and suggesting the potential effect of  $Zn^{2+}$  coordination on the antimicrobial effectiveness of amylin (Fig. 11 and 12); (v) defining how the non-coordinating poly-Gln region affect the structure and how it increases the thermodynamic stability of nickel complexes of the N-terminal region Hpn-like, a microbial  $Ni^{2+}$  storage protein (Fig. 13); (vi) indicating the specific regions of proteins with polyHis and polyGln regions, which are most likely to bind  $Ni^{2+}$  and  $Zn^{2+}$ ; (vii) explaining the effect of pH and  $Ni^{2+}$  binding to the N-terminal domain of HypA, a bacterial protein involved in the maturation of hydrogenase (Fig. 14 and 15); (viii) explaining the average efficiency and selectivity of HupE, a bacterial  $Ni^{2+}$  transporter (Fig. 16 and 17).

This new piece of knowledge is an interesting contribution to the beautiful, basic bioinorganic chemistry, which allows for a better understanding of basic mechanisms in biology and can be the basis in the design of effective, specific and selective drugs to be used in anti-microbial therapy, e.g. of traditional drugs combined with a part of a zincophore, which is specifically recognized by the fungus. First biological studies, which show that *Candida albicans* recognizes the C-terminal region Pra1, have already been carried out (see Figure 8 and its description).

**Keywords:**  $Zn^{2+}$  and  $Ni^{2+}$  transport, microbial metal homeostasis, metal-peptide structure and thermodynamics

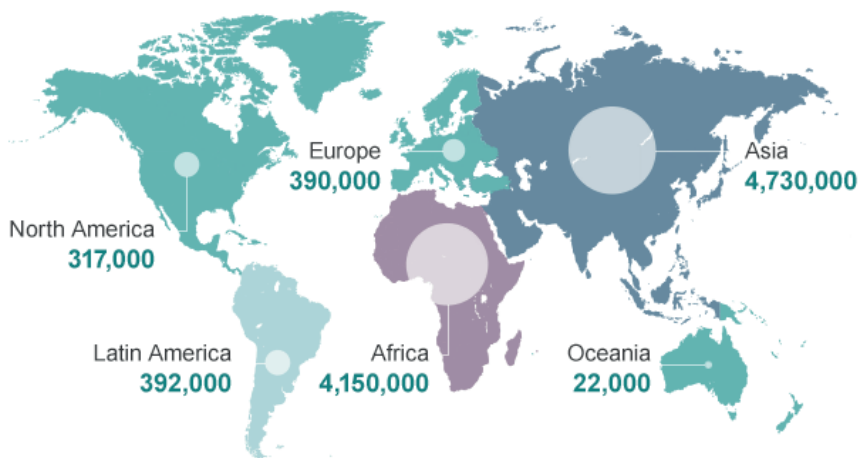
**Słowa kluczowe:** transport  $Zn^{2+}$  i  $Ni^{2+}$ , homeostaza metali drobnoustrojach, struktura i termodynamika układów metal-peptyd

---

## WPROWADZENIE

Infekcje wywołane przez lekooporne bakterie zabijają rocznie co najmniej 700 000 osób. W ciągu ostatnich 30 lat nie wynaleziono żadnej nowej klasy antybiotyku, a oporność na te już istniejące dramatycznie wzrosła. Według szacunków Komisji Europejskiej, jeśli obecny stan wiedzy nie ulegnie zmianie, w 2050 roku lekooporne bakterie i grzyby będą przyczyną ponad 10 milionów zgonów (Rys. 1). Nowe terapeutyki i sposoby specyficznego dostarczania ich bezpośrednio do mikroorganizmów są intensywnie poszukiwane.

### Deaths attributable to antimicrobial resistance every year by 2050



Source: Review on Antimicrobial Resistance 2014

Rysunek 1. Szacunki Komisji Europejskiej co do liczby śmiertelnych infekcji spowodowanych lekoopornymi mikroorganizmami [1]

Figure 1. European Commission's Estimates as to the number of fatal infections caused by resistant micro-organisms [1]

Obecnie stosowane antybiotyki celują w szereg jasno określonych punktów metabolizmu bakterii: (I) uszkodzają błonę protoplazmatyczną (polimyksyny, lipopeptydy), (II) blokują syntezę ściany komórkowej (beta-laktamy, cykliczne glikopeptydy), (III) blokują syntezę białek (tetracykliny, aminoglikozydy, makrolidy), (IV) blokują syntezę kwasów nukleinowych (fluorochinolony, rifamycyny) czy (V) innych szlaków metabolicznych (sulfony, sulfonamidy) [2].

Podobnie wygląda sprawa leków przeciwgrzybiczych – wyróżniamy terapeutyki (I) zaburzające funkcje błony komórkowej (polienowe lub pochodne pirydonu), (II) inhibitory biosyntezy ergosterolu (azolowe, triazolowe, pochodne alliloaminy i fenyломorfoliny, (III) inhibitory syntezy kwasów nukleinowych (analogi cytozyny) oraz (IV) inhibitory syntezy ściany komórkowej (echinokandyny) [3].

Rozsądne wydaje się poszukiwanie nowych klas terapeutyków – celowanie w szlaki metaboliczne, w które nie celują jeszcze standardowe terapie, wobec których mikroorganizmy zdążyły nabrać odporności.

Jedną z największych przeszkód w znalezieniu skutecznych i specyficznych leków przeciwbakteryjnych i przeciwgrzybiczych, które nie powodują poważnych skutków ubocznych u pacjentów, wynika z faktu, że mikroorganizmy dzielą wiele podstawowych szlaków metabolicznych ze swoim ludzkim gospodarzem, szczególnie grzyby (oba są eukariotami), o wiele więcej niż z prokariotycznymi bakteriami. Do opracowania specyficznego leku przeciwgrzybicznego lub przeciwbakteryjnego ważne jest, aby zrozumieć różnice w metabolizmie człowieka i drobnoustroju, i w nie celować. Taką znaczącą różnicą może być np. system transportu i homeostaza cynku(II) i niklu(II). Utrzymanie prawidłowej homeostazy tych jonów metali jest jednym z niezbędnych elementów dla przeżycia i wirulencji bakterii i grzybów.

Świat nauki zaczął rozważać tę zależność jako potencjalny cel terapeutyczny około dziesięciu lat temu, zauważając związek między tzw. odpornością odżywczą (ang. *'nutritional immunity'*), a homeostazą jonów metali. Od tego czasu liczba prac, których tematem jest zarówno odporność odżywcza, jak i homeostaza jonów metali, rośnie niemal logarytmicznie (Rys. 2).



Rysunek 2. Wyszukiwanie fraz 'nutritional immunity' i 'metal ions' w ISI Web of Knowledge (1.03.2018)  
 Figure 2. Searched phrases: 'nutritional immunity' and 'metal ions' in ISI Web of Knowledge (1.03.2018)

Cynk to drugi (po żelazie) najbardziej rozpowszechniony metal bloku d w żywych organizmach [4]. Jest także kluczowym czynnikiem wirulencji patogenów. Jest obecny w dysmutazie ponadtlenkowej (SOD) i innych centralnych enzymach bakterii i grzybów związanych z detoksykacją reaktywnych form tlenu, wytwarzanych przez komórki gospodarza podczas interakcji gospodarz-patogen [5]. Metalo-

proteiny wiążące cynk uczestniczą w inwazji patogenu; są to np. metaloproteiny ADAM lub deuterolizyna (z dwoma histydynami wiążącymi cynk i katalitycznym glutaminianem w jego centrum katalitycznym) [6, 7]. Warto wspomnieć, że jedną z grup enzymów, które wymagają jonów  $Zn^{2+}$  jako kofaktora, są metalo-beta-laktamazy (np. New Delhi metalo-beta-laktamazy 1 (NDM-1)), zdolne do dezaktywacji antybiotyków beta-laktamowych, stosowane w leczeniu infekcji wielolekowych [8].

Wychwycenie tego metalu nie jest prostym zadaniem; całkowite stężenie cynku w tkankach gospodarza waha się w zakresie od 11–23  $\mu M$ , a stężenie wolnego  $Zn^{2+}$  to 0,1–1 nM [3]. Organizm gospodarza jakby instynktownie reaguje na niezbędność cynku dla grzybowych patogenów i ogranicza (i tak już skąpy) poziom wolnego  $Zn^{2+}$  ograniczając aktywność własnych transporterów lub poprzez ekspresję białek wiążących cynk, takich jak np. produkowane przez neutrofile kalprotektyny [3].

Jony niklu są kolejnym przykładem jonów metali bloku d, które są niezbędne dla patogenów; są kofaktorami dziewięciu enzymów: ureazy, hydrogenazy, dehydrogenazy tlenu węgla, syntazy acetylo-CoA, dysmutazy ponadtlenkowej, reduktazy metylo-koenzymu-M, dioksygenazy, glioksalazy i racemazy mleczanowej [9]. Z wyjątkiem ureazy, enzymy te występują tylko w mikroorganizmach i dlatego są doskonałym celem terapeutycznym. Warto wspomnieć, że człowiek nie posiada żadnego niklowo-zależnego enzymu i ten pierwiastek byłby całkowicie zbędny, gdyby nie obecność potrzebujących niklu symbiotycznych bakterii w organizmach ssaków.

Opisane niżej prace mają istotny aspekt poznawczy, który ma przełożenie na rozwój co najmniej kilku dziedzin: (I) po pierwsze, są wkładem do pięknej, podstawowej chemii bionieorganicznej cynku i niklu – został wyjaśniony sposób koordynacji, wskazane miejsca wiązania i wyjaśniona termodynamiczna stabilność; po drugie (II), uzyskane wyniki pozwalają zrozumieć nieorganiczną biochemię białek uwikłanych w homeostazę i transport  $Zn^{2+}$  i  $Ni^{2+}$ ; po trzecie (III), doniesienia te mogą być pierwszym krokiem w kierunku znalezienia nowych, specyficznych przeciwgrzybowych i przeciwbakteryjnych terapeutyków opartych na fragmentach biologicznie istotnych białek (chaperonów, cynkoforów) połączonych z lekiem przeciwdrobnoustrojowym.

Badania przedstawione w tej publikacji składają się na cykl prac, których ogólnym celem było wyjaśnienie elementów homeostazy niklu(II) i cynku(II) u bakterii i grzybów. Cele szczegółowe to:

- zrozumienie chemii bionieorganicznej transportu  $Zn^{2+}$ , opartego na cynkoforach – wskazanie miejsca koordynacji  $Zn^{2+}$  na cynkoforze Pra1 i cynkowym transporterze Zrt1 z *Candida albicans*; określenie specyficzności tego typu transportu względem jonów  $Zn^{2+}$  i  $Ni^{2+}$ ;
- wytłumaczenie roli koordynacji jonów  $Zn^{2+}$  na przeciwdrobnoustrojową efektywność działania amyliny; określenie geometrii wiązania i parametrów termodynamicznych powstającego kompleksu

- zrozumienie wpływu niekoordynujących reszt aminokwasowych na termodynamiczną stabilność niklowych kompleksów wybranych bakteryjnych białek magazynujących  $\text{Ni}^{2+}$
- określenie roli pH i obecności  $\text{Ni}^{2+}$  na wiązanie się  $\text{Zn}^{2+}$  do tzw. strukturalnego rejonu HypA, bakteryjnego białka uwikłanego w poprawne fałdowanie się hydrogenazy
- wskazanie rejonów i precyzyjnych donorów wiążących jony  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  i  $\text{Zn}^{2+}$  w błonowym niklowym transporterze HupE; określenie termodynamiki wiązania i wyjaśnienie specyficzności transportera.

## 1. WYCHWYT JONÓW $\text{Zn}^{2+}$ PRZEZ BAKTERIE I GRZYBY

Cynk jest jednym z kluczowych składników odżywczych dla gatunków ze wszystkich królestw, będąc strukturalnym lub katalitycznym składnikiem setek enzymów, niezbędnych dla przeżycia zarówno patogennych mikroorganizmów, jak i ich gospodarzy. 9% proteomu bakteryjnego i grzybowego to białka wiążące cynk; ich główną funkcję jest regulacja transkrypcji i innych procesów biologicznych [10]. Jak wspomniano już we wstępie, – białka wiążące cynk(II) są podstawą wirulencji mikroorganizmów i nie ulega wątpliwości, że wychwytywanie  $\text{Zn}^{2+}$  ma zasadnicze znaczenie dla zjadliwości i przeżycia patogenów w organizmie gospodarza. Wychwycenie tego metalu jest skomplikowanym procesem, m.in. ze względu na subnanomolowe stężenie wolnego  $\text{Zn}^{2+}$ .

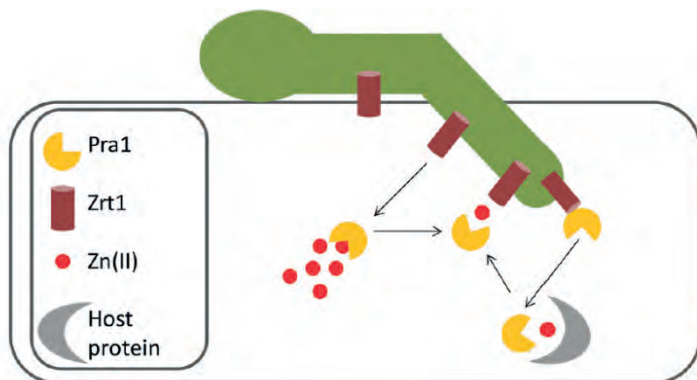
Praca [11] jest przeglądem homeostazy cynku u bakterii i ludzi. Wyjaśnia znaczenie tego składnika odżywczego dla patogenów, opisuje role czujników cynku, regulatorów i transporterów oraz podsumowuje różne systemy pobierania i różne białka zaangażowane w homeostazę cynku – zarówno te używane do przechowywania, buforowania i sygnalizacji wewnątrz komórki, jak i te wydalone w celu uzyskania  $\text{Zn}^{2+}$  od gospodarza. Wyjaśniono ludzką, zależną od cynku odpowiedź układu odpornościowego, ze szczególnym uwzględnieniem ‘cynkowej odporności odżywczej’ (ang.: *zinc nutritional immunity*), procesu opisującego współzawodnictwo między bakteriami lub grzybami, a żywicielem tego mikroorganizmu, podczas którego zarówno patogen, jak i gospodarz próbują kontrolować dostępność cynku(II). Ta wyrafinowana walka o  $\text{Zn}^{2+}$  może być uznana za potencjalny cel dla nowych terapii przeciwbakteryjnych.

W ciągu ostatnich 30 lat, nie tylko antybiotykooporne bakterie, ale i lekooporne grzyby stały się coraz częstszym problemem – nowe terapie i sposoby specyficznego dostarczania ich bezpośrednio do grzyba są intensywnie poszukiwane. Jedną z największych przeszkód w znalezieniu skutecznych i specyficznych leków przeciwgrzybiczych, które nie powodują poważnych skutków ubocznych u pacjentów, wynika z faktu, że grzyby dzielą wiele podstawowych szlaków metabolicznych ze swoim ludzkim gospodarzem (oba są eukariotami), o wiele więcej niż z prokariotycznymi bakteriami. W celu opracowania wysoce specyficznego leku przeciwgrzy-

bicznego ważne jest, aby zrozumieć i celować w różnice w metabolizmie człowieka i grzyba. Znaczącą różnicą między komórkami mikroorganizmów i ssaków jest system transportu cynku, mikroelementu niezbędnego dla prawie wszystkich organizmów [11, 12].

Chorobotwórcze grzyby przystosowały się do nałożonych przez gospodarza cynkowych limitów poprzez rozwój dodatkowych mechanizmów pozyskiwania tego metalu – wydzielając specyficzne białka chelatujące, które wiążą  $Zn^{2+}$  i dostarczają go do grzybowego transportera błonowego (sposób ich działania jest podobny do dobrze znanych sideroforów – sekretowanych przez bakterie lub grzyby niskocząsteczkowych nośników żelaza).

Pojęcie ‘cynkofor’ i odkrycie sposobu jego działania jest relatywną nowością w świecie nauki. Citiulo i współpracownicy wyjaśnili szczegóły tego mechanizmu u *C. albicans* [13]: (I) po inwazji komórek gospodarza, w zasadowym pH i małej ilości wewnątrzkomórkowego cynku wytwarzany jest Pra1 (ang. *pH-regulated antigen 1*, antygen regulowany pH; 299 aminokwasowe białko); (II) Pra1 jest uwalniane z powierzchni strzępeków grzyba; jest to niezbędne dla wzrostu grzyba i powoduje uszkodzenia śródbłonna gospodarza [14]; (III) Pra1 wiąże cynk z otaczających tkanek (wolny  $Zn^{2+}$  lub związany do białek gospodarza) i (IV) wraca do grzyba i za pomocą membranowego transportera Zrt1 przekazuje  $Zn^{2+}$  komórce grzybowej (Rys. 3) [11]. Geny *pra1* i *zrt1* są ko-ekspresjonowane [15]. Delecja genu *pra1* uniemożliwia *C. albicans* wykorzystanie cynku gospodarza i tym samym nie pozwala na wzrost grzyba i uszkodzanie otaczających komórek [11].



Rysunek 3. Schemat pobierania  $Zn^{2+}$  przez *C. albicans* z komórek gospodarza; sekretowany cynkofor Pra1 wiąże wolny lub związany do innych białek gospodarza cynk i wraca na powierzchnię grzyba, gdzie oddziałuje z transporterem Zrt1, w celu przekazania  $Zn^{2+}$  komórce

Figure 3. Schematic model of *C. albicans* zinc scavenging from host cells. After invasion of the host cell, Pra1 is expressed and secreted. It binds zinc, either in the form of free  $Zn^{2+}$  (extremely sparse in the cellular pool) or from zinc-binding proteins of the host. Reassociation with *C. albicans* cell surface and  $Zn^{2+}$  transport into the cell occurs via a Pra1-Zrt1 interaction

Jednym z celów podjętych przeze mnie badań jest zrozumienie interakcji  $Zn^{2+}$  z cynkoforami i transporterami cynku z *Candida albicans*, najczęstszej przyczyny

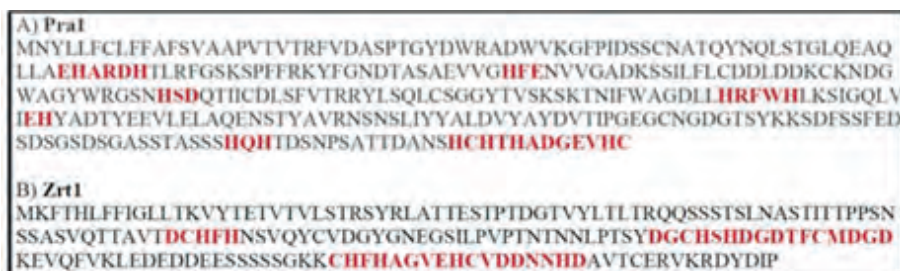


zakażeń grzybiczych u ludzi. Ten zazwyczaj będący komensalem grzyb bywa najczęstszą przyczyną kandydozy – stanu obejmującego infekcje od powierzchniowych, poprzez chroniczne, aż do przewlekłych, systemowych i potencjalnie zagrażających życiu *candidemii*.

Chcieliśmy zrozumieć chemię bionieorganiczną transportu cynku do *C. albicans* opartą o cynkofor Pra1, który dostarcza metal do transbłonowego transportera cynku Zrt1 poprzez (I) wskazanie miejsca wiązania  $Zn^{2+}$  zarówno na Pra1, jak i Zrt1, (II) wyjaśnienie termodynamiki interakcji Pra1- $Zn^{2+}$ -Zrt1 i (III) określenie selektywności tego typu transportu względem jonów  $Zn^{2+}$  i  $Ni^{2+}$ .

Najbardziej popularne miejsca wiązania cynku(II) w białkach są dość dobrze opisane w literaturze [16]. Główne ligandy biorące udział w koordynacji, to reszty His, Cys, łańcuchy boczne reszt kwasowych, cząsteczki wody i, – dużo rzadziej, Tyr, Asn, Ser i Thr. Ze względu na geometrię wiązania i udział koordynujących reszt, można wyróżnić sześć klas miejsc wiążących cynk: (I) wiązanie cynku do przynajmniej 3 reszt His w motywie HEXXHXXGXXH; (II) wiązanie do trzech His, z których dwie są w motywie HXH, a trzecia jest w oddalonej pozycji; (III) wiązanie do donorów His i Cys; (IV) udział dwóch His, reszty kwasowej łańcucha bocznego Asp lub Glu i cząsteczki wody w wiązaniu; (V) wiązanie  $Zn^{2+}$  tylko do kwasowych ligandów oraz (VI) inny skład ligandów [17]. Naturalnie, chemia koordynacyjna cynku w biomolekułach nie jest tak prosta, jak to opisano powyżej; istotna dla stabilności tego typu kompleksów jest druga powłoka interakcji, obejmująca oddziaływanie reszt położonych blisko miejsca wiązania. Dobrym przykładem może być wcześniej opisany sposób oddziaływania kompleksów poliHis i poliGln sekwencji z  $Ni^{2+}$ , w którym region polyGln tworzy sieć kooperatywnych wiązań wodorowych chroniących rdzeń kompleksu przed i innymi kompetycyjnymi ligandami [18].

Zastosowaliśmy wyżej opisane reguły do odnalezienia miejsc wiążących cynk w Pra1 (rejonny zaznaczone – wyróżnione, na Rysunku 4A; nasze przypuszczenia są zgodne z pokazanymi przez Citiulo i in. [11]). Istotnym zagadnieniem jest też struktura białka. Pracowaliśmy z układami modelowymi – peptydami, które są fragmentami Pra1. Struktura Pra1 nie została, jak dotąd, rozwiązana, dlatego posłużyliśmy się programem Phyre2 (wykorzystującym technikę zdalnej homologii do modelowania struktury białek) [19], który pokazał, że Pra1, a w szczególności jego C-końcowa część, jest całkowicie nieustrukturyzowana, a więc idealna do zastosowania naszego eksperymentalnego podejścia. Również struktura Zrt1, transportera cynku, pozostaje nierozwiązana. Użyliśmy Phyre2 do modelowania struktury i przewidywania zewnątrz – i wewnątrzkomórkowych rejonów tego transportera. Okazuje się, że zewnątrzkomórkowa część Zrt1 to N-końiec tego białka (reszty 1-183, Rys. 4B); ponadto, rejon ten jest wysoce nieustrukturyzowany.

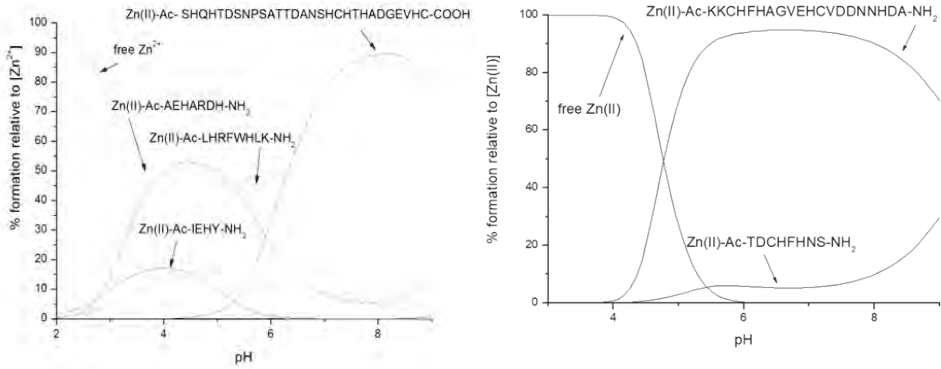


Rysunek 4. A) Sekwencja aminokwasowa cynkoforu Pra1; B) Sekwencja zewnątrzkomórkowej, N-końcowej części transportera Zrt1. Przewidywane miejsca wiązania  $Zn^{2+}$  wyróżniono

Figure 4. A) Sequence of the Pra1 zincophore; B) extracellular sequence of the N-terminal part of the Zrt1 transporter. Predicted  $Zn^{2+}$  binding sites are highlighted

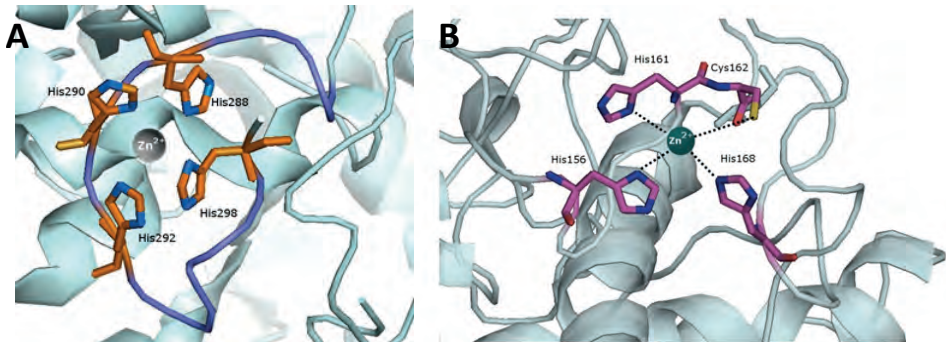
Wyboru odpowiednich fragmentów białek, będących modelowymi miejscami wiązania cynku, dokonano na podstawie dwóch kryteriów: (I) są one w nieustrukturyzowanym rejonie oraz (II) zawierają przewidywane miejsca (bądź kilka miejsc) wiążących cynk. Oparty na cynkoforach system transportu  $Zn^{2+}$  jest bardzo dobrze zachowany również u innych grzybów; u *A. fumigatus*, dwa ko-ekspresjonowane geny, *zrfC* i *aspf2*, są odpowiednikami *zrt1* i *pra1* u *C. albicans* [20]. Wybraliśmy takie fragmenty białek, które prawdopodobnie wiążą  $Zn^{2+}$  i których sekwencja jest ewolucyjnie dobrze zachowana w cynkoforach Pra1 z *C. albicans* i *Aspf2* z *A. fumigatus* (43% homologii).

Na podstawie spektrometrii mas, pokazaliśmy stechiometrię powstających kompleksów; badania potencjometryczne pozwoliły na wyznaczenie częściowych i całkowitych stałych trwałości utworzonych kompleksów; NMR pozwolił wskazać precyzyjnie miejsca wiązania metalu. Porównanie całkowitych stałych tworzenia pokazało, że C-końcowy region Pra1 (Ac-SHQHTDSNPSATTDANSHCHTHAD-GEVHC-COOH) ma największe powinowactwo do jonów  $Zn^{2+}$  (Rys. 5A). Prawdopodobnie to właśnie ten rejon cynkoforu jest odpowiedzialny za wiązanie metalu. Spektroskopia NMR pokazała, że C-końcowy region Pra1 wiąże  $Zn^{2+}$  przez cztery histydylowe imidazole (His288, His290, His292 i His298) (Rys. 6A) [21]. Przypuszczalnie to właśnie miejsce wchodzi w interakcje z transporterem cynku Zrt1.



Rysunek 5 A) Wykres kompetycyjny między fragmentami cynkoforu Pra1: Ac-IEHY-NH<sub>2</sub>; Ac-AEHARDH-NH<sub>2</sub>; Ac-SHQHT-NH<sub>2</sub>; Ac-SHCHTHADGEVHC-COOH i Ac-SHQHTDSNPSATTDANSHCHTHADGEVHC-COOH oraz jonami Zn<sup>2+</sup> oraz B) między fragmentami transportera Zrt1 (Ac-KKCHFHFAGVEHCVDNNHDA-NH<sub>2</sub> i Ac-TDCHFHNS-NH<sub>2</sub>). Na podstawie całkowitych stałych tworzenia opisuje hipotetyczną sytuację, w której zmieszano ekwimolarne ilości ligandów i metalu. Wykres przedstawia tworzenie się kompleksu w różnych wartościach pH, w 298 K,  $i = 0,1 \text{ M}$ ,  $[\text{Zn}^{2+}] = [\text{L}] = 0,001 \text{ M}$

Figure 5 A) Competition plot between the Pra1 zincophore fragments: Ac-IEHY-NH<sub>2</sub>; Ac-AEHARDH-NH<sub>2</sub>; Ac-SHQHT-NH<sub>2</sub>; AC-SHCHTHADGEVHC-COOH and Ac-SHQHTDSNPSATTDANSHCHTHADGEVHC-COOH and Zn<sup>2+</sup> ions and B) between fragments of the Zrt1 transporter (Ac-KKCHFHFAGVEHCVDNNHDA-NH<sub>2</sub> and Ac-TDCHFHNS-NH<sub>2</sub>). On the basis of the calculated stability constants, the graphs describe a hypothetical situation in which equimolar amounts of the ligands and metal are mixed. The graph shows the formation of the complex in different pH values, at 298 K,  $i = 0.1 \text{ M}$ ,  $[\text{Zn}^{2+}] = [\text{L}] = 0.001 \text{ M}$



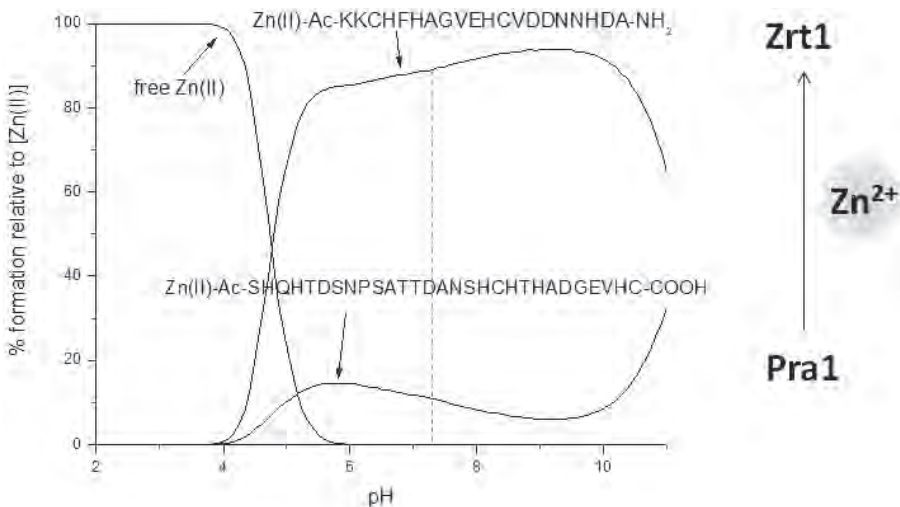
Rysunek 6. Proponowany sposób wiązania Zn<sup>2+</sup> do A) cynkoforu Pra1 i B) transportera Zrt1. Struktura opiera się na koordynatach symulowanych przez program Phyre2.<sup>16</sup>. Rysunek został wygenerowany za pomocą Pymol [22]

Figure 6. The proposed binding Zn<sup>2+</sup> sites on A) the Pra1 zincophore and B) the Zrt1 zinc transporter. Structures are based on coordinates simulated by Phyre2.<sup>16</sup>. The figure was generated with Pymol [22]

Do wskazania precyzyjnych miejsc wiązania Zn<sup>2+</sup> na N-końcowym, zewnątrzkomórkowym rejonie transportera Zrt1 użyliśmy analogicznego podejścia eksperymentalnego. W fizjologicznym pH, rejonem zdolnym do związania Zn<sup>2+</sup> okazał się

rejon KKCHFAGVEHCVDDNNHDA (Rys. 5B). Spektroskopia NMR wskazała imidazolowe azoty reszt His156, His161 i His168 oraz tiolową siarkę Cys162, jako miejsca koordynacji  $Zn^{2+}$  (Rys. 6B) [23].

Czy możemy zatem sugerować, że wyżej opisane rejony Pra1 i Zrt1 przekazują sobie jon  $Zn^{2+}$ ? Biorąc pod uwagę chemię bionieorganiczną obu białek, jest to bardzo prawdopodobne – na podstawie obliczonych stałych trwałości możemy wywnioskować, że w pH 7,4, około 85% dotępnego  $Zn^{2+}$  będzie związane do zewnątrzkomórkowego fragmentu transportera Zrt1, a tylko 15% – do oddziałującego z nim cynkoferu Pra1 (Rys. 7) [23]. Z punktu widzenia termodynamiki umożliwia to efektywny transport  $Zn^{2+}$  do wnętrza komórki grzybowej (naturalnie, musimy pamiętać o tym, że praca na fragmentach białek *in vitro* nie odzwierciedla w pełni ich funkcji *in vivo* – muszą ją potwierdzić badania biologiczne).



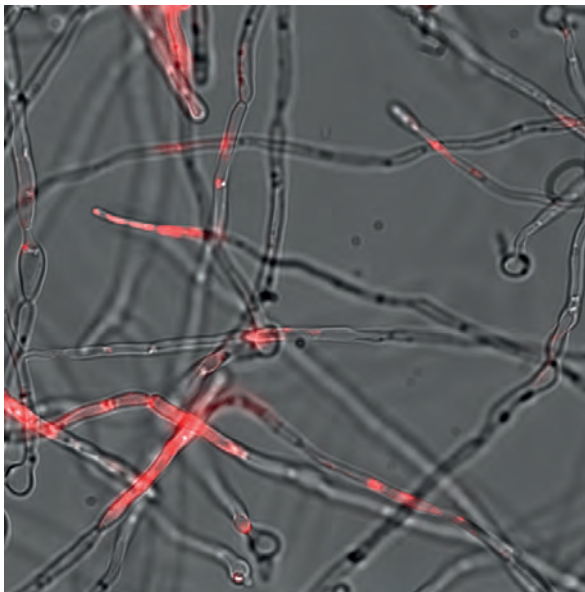
Rysunek 7. Wykres kompetycyjny między wiążącymi  $Zn^{2+}$  fragmentami cynkoferu Pra1 i transportera  $Zn^{2+}$  Zrt1 (odpowiednio Ac-SHQHTDSNPSATTDANSHCHTHADGEVHC-COOH i Ac-KKCHFAGVEHCVDDNNHDA-NH<sub>2</sub>). Na podstawie całkowitych stałych tworzenia opisuje hipotetyczną sytuację, w której zmieszano ekwimolarne ilości ligandów i metalu. Wykres przedstawia tworzenie się kompleksu w różnych wartościach pH, w 298 K,  $i = 0,1$  M,  $[Zn^{2+}] = [Ac-SHQHTDSNPSATTDANSHCHTHADGEVHC-COOH] = [Ac-KKCHFAGVEHCVDDNNHDA-NH_2] = 0.001$  M. Linijką przerywaną zaznaczono pH fizjologiczne

Figure 7. Competition plot between  $Zn^{2+}$  and the  $Zn^{2+}$  binding region from Pra1 and Zrt1 (Ac-SHQHTDSNPSATTDANSHCHTHADGEVHC-COOH and Ac-KKCHFAGVEHCVDDNNHDA-NH<sub>2</sub>). On the basis of the calculated stability constants, the graphs describe a hypothetical situation in which equimolar amounts of the ligands and metal are mixed. The graph shows the formation of the complex in different pH values, at 298 K,  $i = 0.1$  M,  $[Zn^{2+}] = 0.001$  M =  $[Ac-SHQHTDSNPSATTDANSHCHTHADGEVHC-COOH] = [Ac-KKCHFAGVEHCVDDNNHDA-NH_2] = 0.001$  M. The dotted line shows physiological pH

Innym istotnym aspektem funkcjonowania systemu transportu opartego na cynkoferach jest jego specyficzność dla danego jonu metalu. Ogólnie przyjęto, że

Pra1 jest specyficzny dla cynku(II). Czy oznacza to, że nie będzie on przekazywał grzybowi innych niezbędnych dla niego jonów metali, które mają powinowactwo do tych samych reszt aminokwasowych, co  $Zn^{2+}$ ? Określiliśmy sposób wiązania niklu(II), kolejnego niezbędnego dla przeżycia i wirulencji jonu metalu, do badanych fragmentów Pra1 i Zrt1. Okazuje się, że  $Ni^{2+}$ , choć w teorii posiada równie wysokie powinowactwo do grup, do których koordynuje  $Zn^{2+}$ , nie zaburza wiązania się  $Zn^{2+}$  do badanych przez nas fragmentów – w pH fizjologicznym, do Pra1 wiąże się dużo słabiej niż  $Zn^{2+}$  (w pH 7,4 mniej niż 20% Pra1 zwiąże  $Zn^{2+}$ , reszta –  $Ni^{2+}$ ), natomiast jego powinowactwo do Zrt1 jest porównywalne do cynkowego; wynika to prawdopodobnie z faktu, że rejon KKCHFHAGVEHCVDDNNHDA jest w stanie skoordynować dwa jony  $Ni^{2+}$  i tylko jeden jon  $Zn^{2+}$  [23].

Wyniki wyżej opisanych badań mogą mieć znaczenie dla rozwoju co najmniej kilku dziedzin: (I) po pierwsze, jest to wkład do podstawowej chemii bionieorganicznej cynku – wyjaśniony został sposób koordynacji, wskazane miejsca wiązania i wyjaśniona termodynamiczna stabilność; po drugie (II), uzyskane wyniki pozwalają zrozumieć nieorganiczną biochemię cynkoforów, białek, które są naprawdę biologicznie istotne; po trzecie (III), może być krokiem w kierunku znalezienia nowych, specyficznych przeciwgrzybowych terapeutyków, opartych na fragmentach cynkoforów połączonych z lekiem przeciwgrzybicznym.



Rysunek 8. Wychwytywanie fluorescencyjnie znakowanego C-końcowego fragmentu Pra1 (AF647-SHQHTDSNPSATT-DANSHCHTHADGEVHC) przez *C. albicans* (Malavia, Łoboda, Wilson, Rowińska-Żyrek, praca w przygotowaniu)

Figure 8. Uptake of the fluorescently labeled C-terminal region of Pra1 (AF647-SHQHTDSNPSATT-DANSHCHTHADGEVHC) by *C. albicans* (Malavia, Atriplex, Wilson, Rowińska-Żyrek, work in progress)

Przyjrzyjmy się bliżej ostatniemu punktowi – czy nasze rozważania są naprawdę istotne biologicznie i czy C-końcowy rejon Pra1 faktycznie jest rozpoznawany i wychwytywany przez *C. albicans*, i czy są w stanie przenieść cynk do wnętrza grzyba *in vivo*? Odpowiedzi na to pytanie mogliśmy udzielić dzięki współpracy z prof. Duncanem Wilsonem z Uniwersytetu w Aberdeen (jeden z odkrywców Pra1), który zobrazował wychwytywanie znakowanego fluorescencyjnie C-końcowego fragmentu Pra1 (AF647-SHQHTDSNPSATTDANSHCHTHADGEVHC) przez *C. albicans* (Rys. 8, dane nieopublikowane) – okazuje się, że dyskutowany przez nas C-końcowy fragment Pra1 jest rozpoznawany przez *C. albicans* w podobny sposób, co jego pełnej długości, dziesięciokrotnie większy, natywny analog.

Zrozumienie sposobu pozyskiwania  $Zn^{2+}$  przez *C. albicans* otwiera nowe możliwości terapeutyczne, oparte na lekach przeciwgrzybiczych związanych z C-końcowym fragmentem cynkoforu Pra1, który w selektywny sposób dostrzczałby lek do grzyba. Jaki lek powiązać z Pra1? Poza najbardziej popularnymi lekami imidazolowymi lub triazolowymi warto przyrzeć się bliżej lekom opartym na przeciwdrobnoustrojowych peptydach. Przykład jednego z nich opisano w następnym podrozdziale.

## 2. ROLA JONÓW $Zn^{2+}$ W TWORZENIU ZŁOGÓW AMYLOIDOWYCH PRZECIWDROBNOUSTROJOWEJ AMYLINY

Ze względu na generalny brak oporności mikroorganizmów na peptydy przeciwdrobnoustrojowe (ang. *antimicrobial peptides*, AMP), mają one szansę zostać nową, skuteczną klasą terapeutyków. Istnieje wiele sposobów którymi AMP mogą oddziaływać na patogeny: poprzez niszczenie błon komórkowych, wytwarzanie reaktywnych form tlenu, hamowanie syntezy ściany komórkowej, kwasów nukleinowych i białek lub wychwytywanie istotnych dla patogenów jonów metali. Jony  $Zn^{2+}$  mają dwojaki wpływ na aktywność peptydów przeciwdrobnoustrojowych: (I) AMP wiążą je, dzięki czemu mikroorganizmy nie dostają wystarczająco dużo jonów metali istotnych dla ich życia i zjadliwości (wychwytywanie jonów metali, w tzw. ang. *‘nutritional immunity’*) lub (II) AMP potrzebują danego jonu metalu do wzmocnienia ich działania przeciwdrobnoustrojowego (jony metali wpływają na ładunek i/lub strukturę AMP).

Przykładem peptydu przeciwdrobnoustrojowego jest amyлина (znana też jako IAPP, ang. *Islet Amyloid Polypeptide*) [24, 25]; jest ona zarówno peptydem przeciwdrobnoustrojowym, jak i neurohormonem kontrolującym regulację glikemiczną – synergicznym partnerem insuliny. Ten 37 aminokwasowy polipeptyd, wytwarzany przez komórki beta trzustki, w przebiegu cukrzycy typu 2 (popularnej chorobie metabolicznej, na którą choruje ponad 300 mln osób na świecie) tworzy patologiczne amyloidowe depozyty w obrębie wysp Langerhansa trzustki. Patologiczne fibryle amyloidowe występują u ponad 90% cukrzyków i prowadzą do uszkodzeń

i dysfunkcji komórek trzustki, powodując postęp choroby. Ludzka amylna jest wyjątkowo trudno rozpuszczalna i błyskawicznie fibryluje, skutkując stresem oksydacyjnym i uszkodzeniami błon komórkowych [27, 28]. Mechanizm prowadzący do konwersji natywnej postaci peptydu do nierozpuszczalnych fibryli pozostaje niewyjaśniony. Rosnąca ilość doniesień sugeruje udział jonów cynku(II) w procesie tworzenia struktury beta kartki, mikrodepozytów, a następnie fibrylarnych złogów [29,30]. Przeciwdrobnoustrojowa skuteczność amyliny silnie zależy od stopnia jej agregacji, a agregacja z kolei – od obecności jonów  $Zn^{2+}$  [31].

Ludzka postać amyliny ma sekwencję KCNTATCATQRLANFLVHSSNNFGA-ILSSTNVGSNTY, z mostkiem dwusiarczkowym pomiędzy resztami cystein 2 i 7 oraz z amidowanym C-końcem. Obie modyfikacje są konieczne do pełnej aktywności biologicznej amyliny [32].

W reakcji fibrylizacji amyliny, wczesne, tzw. prefibrylarne struktury są ogromnie toksyczne dla komórek beta trzustki. Tworzące się w następnym etapie struktury włókien amyloidu – również prawdopodobnie mają pewien wpływ cytotoksyczny, jednak ta końcowa postać amyloidu jest dużo mniej toksyczna od utworzonych wcześniej struktur prefibrylarnych.

N-terminalna domena amyliny obejmuje umownie aminokwasy od 1 do 19. Pierwsze 16 aminokwasów jest identyczne u wszystkich wymienionych gatunków; na 18 miejscu w amylinie ludzkiej (a także tej występującej u konia, chomika i wieńki) znajduje się histydyna, podczas gdy we wszystkich innych polipeptydach (np. w niefibrylującej szczurzej amylinie) jest ona zastąpiona przez argininę. Substytucja ta wzbudziła szczególne zainteresowanie w kontekście jej roli w procesie fałdowania, fibrylacji i agregacji polipeptydu, sugerując zależność między zdolnością wiązania jonów metali a skłonnością do tworzenia fibryli i toksycznością neurohormonu – fragment 1–19 ludzkiej amyliny, który nie tworzy fibryli, jest tak samo toksyczny jak peptyd o pełnej długości, podczas gdy ten sam fragment szczurzej amyliny nie wykazuje żadnej toksyczności [33–35]. Podobnie ludzki fragment 20–29 amyliny jest w stanie fragmentować błony komórkowe, podczas gdy ten sam fragment szczurzy (w którym trzy aminokwasy podstawione są proliną, która uniemożliwia powstawaniu włókienek amyloidu) nie wykazuje toksyczności komórkowej. C-terminalna część amyliny (30–37), będąc odcinkiem bardzo hydrofobowym, może również wspomagać proces fibrylacji.

Szczurza amylna wykazuje aż 84% homologii sekwencji aminokwasowej z formą ludzką, a mimo to nie tworzy fibryli. Polipeptydy te różni tylko sześć aminokwasów, z których najważniejszymi substytucjami są – jak się wydaje – wspomniane wcześniej trzy proliny (Pro25, 28 i 29) obecne u szczura, a nieobecne u ludzi, oraz reszta histydyny (His18) zastąpiona w amylinie szczurzej resztą argininy. Proliny są resztami, które prawdopodobnie zapobiegają tworzeniu się drugorzędowych struktur, a histydylowy imidazol z dużym prawdopodobieństwem bierze udział w wiązaniu jonów metali. Równie istotny może okazać się związek protonacji histydyny z tworzeniem fibryli – deprotonacja His może prowadzić do szybszego formowania fibryli w porównaniu z warunkami niższego pH (Rys. 9).



Rysunek 9. Sekwencje aminokwasowe pramlintydu oraz ludzkiej i szczurzej amyliny (numery uniprot odpowiednio P10997 i P12969). Kolorami wyróżniono substytucje jakim poddano amylinę ludzką i szczurzą w stosunku do pramlintydu. Histydyna18, która prawdopodobnie bierze udział w wiązaniu jonów cynku i miedzi, wyróżniono w ramce

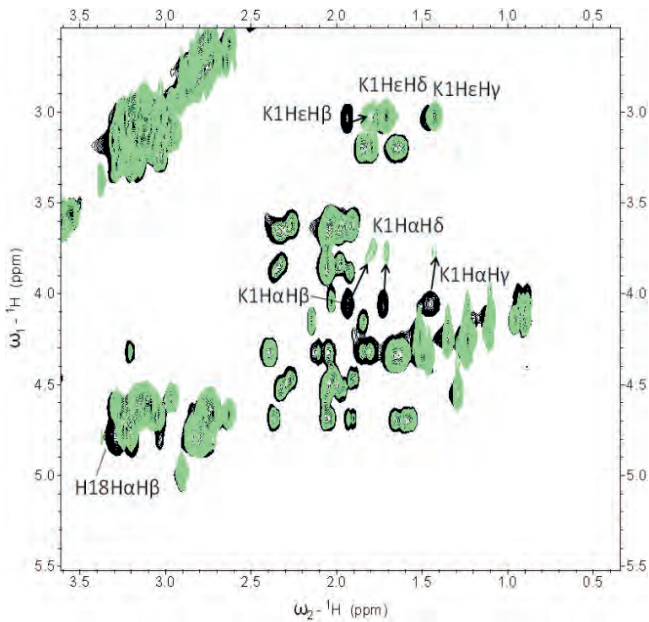
Figure 9. Sequences of pramlintide, human and rat amylin (uniprot respectively numbers P10997 and P12969). Substitutions with respect to pramlintide are marked with color. His18, which most likely interacts with metal ions, is marked with a box

Ciekawym wariantem amyliny jest pramlintyd, jej syntetyczny analog – nowy, dopuszczony w USA w 2006 roku do stosowania w leczeniu cukrzycy hipoglikemiczny lek stosowany u pacjentów, u których leczenie insuliną nie przynosi pożądanych efektów. W sekwencji pramlintydu trzy aminokwasy zastąpiono prolinami (Pro 25, 28 i 29, jak w niefibrylującej sekwencji szczurzej), by zmniejszyć tendencję leku do tworzenia struktur wyższego rzędu i agregowania. Zachowana została natomiast kluczowa dla oddziaływań z metalami histydyna (His18) (Rys. 9) [30].

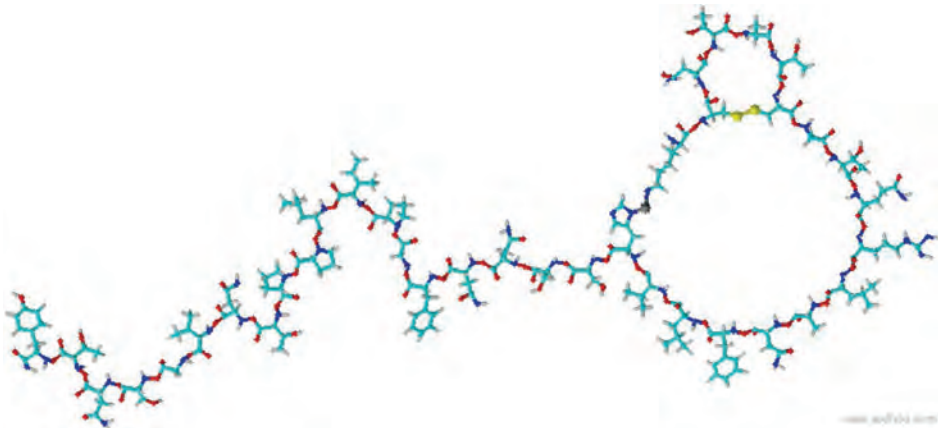
Celem naszych badań było rozwianie kontrowersji narosłych wokół roli  $Zn^{2+}$  w procesie agregacji amyliny, poprzez precyzyjne wskazanie miejsc jego wiązania, określenie termodynamiki tworzącego się kompleksu i zrozumienie wpływu koordynacji  $Zn^{2+}$  na proces agregacji i tworzenia się struktur amyloidowych. Pracowaliśmy na dwóch analogach natywnej, silnie agregującej amyliny: na pramlintydzie i fragmencie 1–19 amyliny.

Pokazaliśmy, że zarówno w przypadku amyliny<sub>1-19</sub> [37], jak i pramlintydu, selektywne przesunięcia sygnałów pochodzących od korelacji  $H\alpha$ - $H\beta$  His18 i wszystkich korelacji  $H\alpha$  Lys1 w obecności jonów cynku(II) (Rys. 10) wskazują na to, że wiąże się on do imidazolu His18 i do grupy *N*-końcowej aminowej Lys1, wymuszając w ten sposób zgięcie głównego łańcucha peptydowego między resztami 1 i 18 (Rys. 11) [38]. Analogiczny sposób koordynacji zaobserwowano w przypadku amyliny<sub>1-19</sub> [37].





Rysunek 10. Widmo TOCSY 3 mM pramlintydu (czarne kontury) i 3 mM pramlintydu w obecności 1 ekwiwalentu  $\text{Zn}^{2+}$  (zielone kontury), pH 7,2, T = 298 K  
 Figure 10. TOCSY spectrum of 3 mM pramlintide (black contours) and 3 mM pramlintide in the presence of 1 equivalent of  $\text{Zn}^{2+}$  (green contours), pH 7.2, T = 298 K

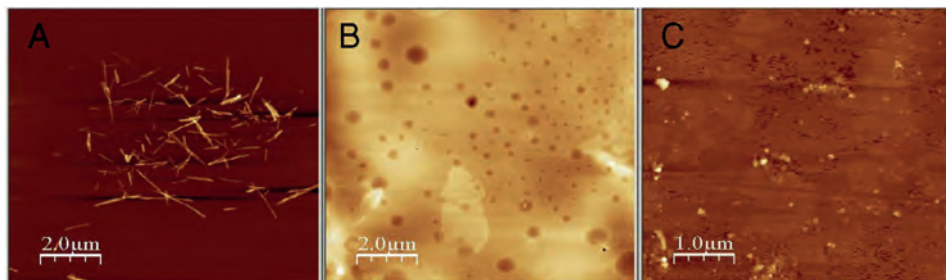


Rysunek 11. Sugerowany sposób koordynacji kompleksu  $\text{Zn}^{2+}$ -pramlintyd [38]  
 Figure 11. Suggested coordination mode of the  $\text{Zn}^{2+}$ -pramlintide complex [38]

Termodynamiczna stabilność kompleksu  $\text{Zn}^{2+}$ -pramlintyd jest dużo wyższa od stabilności  $\text{Zn}^{2+}$ -amylina<sub>1-19</sub> – w pH 7,4, kompleks pramlintydu jest ponad dziesięciokrotnie bardziej stabilny, niż jego krótszy analog, co wskazuje na stabilizującą

rolę rejonu 20–37. Jeszcze bardziej ciekawy jest wpływ tego rejonu na fibrylizację kompleksu  $Zn^{2+}$ -pramlintyd – początkowo dobrze rozpuszczalna, nieagregująca amylna po ok. 20 h od skoordynowania  $Zn^{2+}$ , zaczyna tworzyć oligomeryczne agregaty, podczas gdy sam peptyd pozostaje dobrze rozpuszczalny (Rys. 12) [38].

Takie wywołane koordynacją cynku(II) zgięcie peptydu, prowadzące do opóźnionej w czasie agregacji, może być częściowym wyjaśnieniem procesu tworzenia prefibrylarnych, oligomerycznych form amylny, które są znacznie bardziej toksyczne (zarówno dla mikroorganizmów, jak i dla ludzkich komórek  $\beta$  trzustki) niż, duże złoży amyloidowe.



Rysunek 12. Obrazy z mikroskopu sił atomowych A) kompleksu  $Zn^{2+}$ -pramlintyd, inkubowane przez 24 godziny; B) pramlintyd, inkubowany przez 24 godziny; i C) przezroczystą płytkę z miki

Figure 12. Atomic force microscopy images of A)  $Zn^{2+}$ -pramlintide complex, incubated for 24 hours; B) pramlintide, incubated for 24 hours; and (C) a transparent MICA plate

Błędne fałdowanie się białek jest powszechną cechą wielu chorób. Najbardziej popularnymi przykładami są białka uwikłane w neurodegenerację –  $\alpha$ -synukleina,  $\beta$ -amyloid, huntingtyna lub białko prionowe. Przez prawie dwie dekady byliśmy świadkami toczącej się debaty na temat wpływu jonów metali na molekularne podstawy i, w konsekwencji – na przebieg tych chorób [39]. Niedawno rozpoczęto podobną dyskusję na temat amylny wykazującej liczne podobieństwa do wiążących metal neuro-białek tworzących amyloidy.

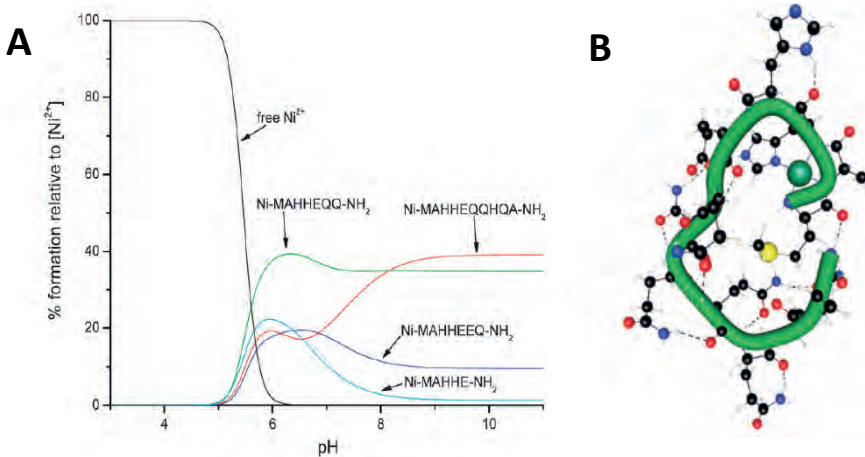
Powyższe, zupełnie nieoczekiwane zjawisko agregacji kompleksu  $Zn^{2+}$ -pramlintyd stawia wiązanie cynku(II) do amylny w zupełnie nowym świetle – zarówno w przebiegu cukrzycy, jak i w terapii przeciwdrobnoustrojowej, wyjaśniając wpływ wiązania metalu na agregację kompleksu.

### 3. BAKTERYJNE BIAŁKA MAGAZYNUJĄCE JONY $Ni^{2+}$

Zrozumienie termodynamiki koordynacji nikiel(II) do jego potencjalnych miejsc wiążących jest ważnym krokiem w kierunku znalezienia ‘słabych punktów’ homeostazy tego metalu. Poszukując specyficznych, racjonalnych celów terapeutycznych dla nowych leków przeciwdrobnoustrojowych, skupiłam się na białkach transportujących i magazynujących nikiel(II) – metal kluczowy dla przeżycia

mikroorganizmów, a zbędny dla funkcjonowania komórek ssaków. Po szczegółowej analizie sekwencji i struktur takich białek (dostępnych odpowiednio w bazach danych uniprot i pdb) okazało się, że wiele z nich jest niezwykle bogatych w reszty histydylowe. Nie dziwi zatem, że histydyny znajdują się w białkach wiążących  $\text{Ni}^{2+}$  – reszta imidazolowa bardzo efektywnie wiąże ten jon metalu; dziwi natomiast duża liczba powtórzeń tej reszty aminokwasowej i/lub długość rejonów typu 'HHHHHH'. Wskazałam również, że większość sekwencji polihistydylowych znajduje się w silnie nieustrukturyzowanych rejonach [40] i, że tego typu powtórzenia wiążą nikiel(II) silniej niż motyw ATCUN, jedna z najsilniej wiążących  $\text{Cu}^{2+}$  i  $\text{Ni}^{2+}$  sekwencji białkowych, ale tylko w pH niższym niż fizjologiczne [41]. Kompleks, w którym nikiel(II) wiąże się do sąsiadujących z sobą cystein (do cysteinylowych tioli i znajdującego się między nimi amidowego atomu azotu) okazał się trwalszy zarówno od niklowego kompleksu sekwencji polihistydylowych, jak i kompleksu z motywem ATCUN [42].

Pokazaliśmy również, w jaki sposób powtórzenia aminokwasów niebiorących bezpośredniego udziału w koordynacji wpływają na stabilność kompleksu peptydu z takim rejonem [18]. Przeanalizowaliśmy szereg niklowych kompleksów N-końcowych rejonów bakteryjnych białek Hpn i Hpn-like (MAHHE-NH<sub>2</sub>, MAHHEEQ-NH<sub>2</sub>, MAHHEQQ-NH<sub>2</sub>, MAHHEQQHQ-NH<sub>2</sub>, MAHHEEQHG-NH<sub>2</sub> i MAHHEQQQQQA-NH<sub>2</sub>), których najbardziej prawdopodobną funkcją jest przechowywanie jonów  $\text{Ni}^{2+}$ . Opierając się na wynikach spektrometrii mas, która pokazała stechiometrię powstających kompleksów, spektroskopii UV-Vis i CD, pokazujących bezpośrednio otoczenie koordynacyjne  $\text{Ni}^{2+}$  oraz miareczkowań potencjometrycznych, które pozwoliły ustalić stałe tworzenia kompleksów tego metalu z analizowanymi fragmentami białek. Pokazaliśmy korelację między liczbą glutamin występujących w badanych sekwencjach, a stabilnością ich niklowych kompleksów. Okazało się, że im więcej glutamin w sekwencji, tym bardziej stabilne okazywały się badane kompleksy (Rys. 13A) – to bardzo ciekawa zależność, ze względu na to, że glutaminy nie biorą bezpośredniego udziału w koordynacji. Jaka jest więc ich funkcja? Obliczenia dynamiki molekularnej pokazały, że niekoordynujące łańcuchy boczne glutamin tworzą sieć wiązań wodorowych, które prawdopodobnie chronią kompleks przed hydrolizą (Rys. 13B) [18]. To odkrycie pozwala spojrzeć na sekwencje poliglutaminowe, nie tylko te występujące w bakteryjnych białkach uwikłanych w homeostazę metali, ale także w niektórych chorobach neurodegeneracyjnych, z zupełnie nowej perspektywy.

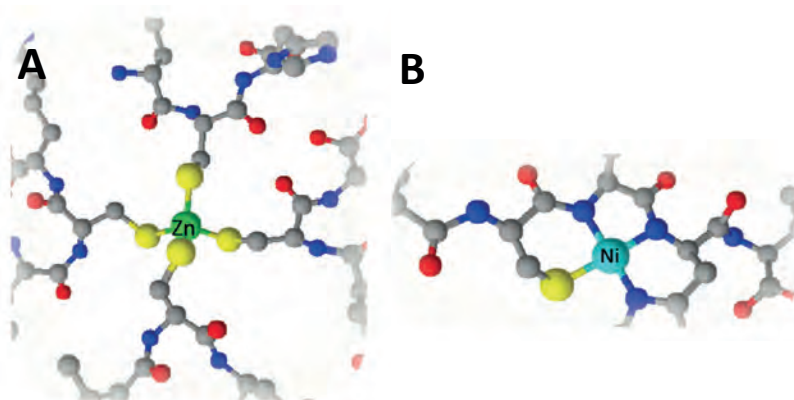


Rysunek 13. A) Wykres kompetycyjny, oparty na całkowitych stałych tworzenia, przedstawiający hipotetyczną sytuację, w której zmieszano równomolew (0,001 M) ilości Ni<sup>2+</sup>, MAHHE-NH<sub>2</sub>, MAHHEEQ-NH<sub>2</sub>, MAHHEQ-Q-NH<sub>2</sub> i MAHHEQ-QHQA-NH<sub>2</sub>; B) Sieć wiązań wodorowych w kompleksie Ni-MAHHEQQQQQA-NH<sub>2</sub> [18]

Figure 13. A) a competition plot, based on the calculated stability constants, describes a hypothetical situation in which equimolar (0.001 M) amounts of Ni<sup>2+</sup>, MAHHE-NH<sub>2</sub>, MAHHEEQ-NH<sub>2</sub>, MAHHEQ-Q-NH<sub>2</sub> and MAHHEQ-QHQA-NH<sub>2</sub> are mixed; (B) a network of hydrogen bonds in the Ni-MAHHEQQQQQA-NH<sub>2</sub> complex [18]

Homeostaza Ni<sup>2+</sup> jest w nierozdzielny sposób powiązana z homeostazą Zn<sup>2+</sup> – oba metale konkurują o podobne miejsca wiązania. Dobrze obrazuje to przykład białka HypA uwikłanego w fałdowanie hydrogenazy (jego rola polega m.in. na dostarczaniu Ni<sup>2+</sup> do hydrogenazy). HypA wiąże jon Zn<sup>2+</sup> w tzw. miejscu strukturalnym – nieustrukturyzowanej pętli, zawierającej w swojej sekwencji dwa motywy CXXC (ELECKDCSHVFKPNALDYGVCEKCHS). Pokazaliśmy, w jaki sposób Zn<sup>2+</sup> wiąże się do tego rejonu HypA i dlaczego Ni<sup>2+</sup>, metal o dużym powinowactwie do reszt tiolowych, nie wypiera cynku z badanego fragmentu. Istnieją bardzo duże różnice w termodynamicznej stabilności obu metali z rejonem pętli HypA – jeśli w fizjologicznym pH (pH = 7,4) zmieszalibyśmy równomolew ilości metali i liganda, to ponad 98% badanego liganda będzie wiązało jony Zn<sup>2+</sup> [43]. Potwierdza to monitorowane za pomocą CD miareczkowanie omawianego kompleksu Ni<sup>2+</sup> jonami Zn<sup>2+</sup> – w miarę dodawania Zn<sup>2+</sup> zanikają charakterystyczne dla niklowych kompleksów pasma.<sup>43</sup> Diametralnie różna stabilność kompleksów wynika z różnych sposobów koordynacji w okołowizjologicznym pH – Ni<sup>2+</sup> wiąże się do tiolowej siarki i poprzedzających ją amidowych atomów azotu, podczas gdy Zn<sup>2+</sup> koordynuje do czterech cysteinyłowych tioli (Rys. 14). Ponadto, sposób koordynacji Zn<sup>2+</sup> do analizowanego rejonu pętli HypA silnie zależy od pH – w pH niższym od 7,4 w wiązaniu biorą udział dwa imidazolowe azoty i dwa cysteinyłowe tiole. Otrzymane wyniki pozwalają zrozumieć (I) dlaczego w biologii miejscem wiązania Zn<sup>2+</sup> w HypA jest nieustrukturyzowana pętla HypA, a naturalnym otoczeniem koordynacyjnym Ni<sup>2+</sup>

jest jego *N*-końcowa domena oraz (II) w jaki sposób pH-zależna koordynacja  $Zn^{2+}$  jest w stanie zmienić konformację białka i sposób wiązania  $Ni^{2+}$  [44].



Rysunek 14. Sposób koordynacji  $Zn^{2+}$  (A) i  $Ni^{2+}$  (B) do rejonu pętli białka HypA [43]  
 Figure 14. The coordination of  $Zn^{2+}$  (A) and  $Ni^{2+}$  (B) to the loop region of HypA [43]

#### 4. TRANSPORT METALI

W większości naturalnych środowisk bakteryjnych dostępność niklu(II) jest bardzo niska (nanomolarna). Bakterie rozwinęły wysoko wyspecjalizowane systemy transportu dla tego metalu, by zapewnić jego dostępność dla niklowo-zależnych enzymów [45]. Importery  $Ni^{2+}$  można podzielić na dwie główne kategorie: (I) pojedyncze polipeptydowe permeazy i (II) złożone transportery z rodziny (ang.) ‘*ATP-binding cassette*’, wykorzystujące energię hydrolizy ATP do transportu  $Ni^{2+}$  [46], które można podzielić na kanoniczne importery ABC i niedawno odkryte czynniki transportujące czynnik energetyczny (ang. *energy-coupling factor (ECF) transporters*) [47]. Pojedyncze polipeptydowe permeazy dzielą się na trzy grupy: transportery niklowo-kobaltowe (NiCoT), UreH i HupE/UreJ. Ostatni z nich, HupE, jest ewolucyjnie dobrze zachowanym niklowym transporterem, obecnym zarówno u patogennych bakterii, jak i u *Rhizobium leguminosarum*, Gram-ujemnej bakterii współżyjącej z roślinami motylkowymi. Według danych biologicznych, rejonami HupE zaangażowanymi w transport  $Ni^{2+}$  są: (I) peryplazmatyczna, *N*-końcowa domena odpowiedzialna za wiązanie metalu ( ${}_{22}HVGLHADGTLA_{35}GLN$ ) i błonowy rejon, który przekazuje metal do wnętrza komórki bakteryjnej ( ${}_{36}HPFSGLDH_{43}$ ) (Rys. 15) [48]. Co ciekawe, pokazano, że transport  $Ni^{2+}$  zaburza obecność jonów  $Cu^{2+}$  [49].

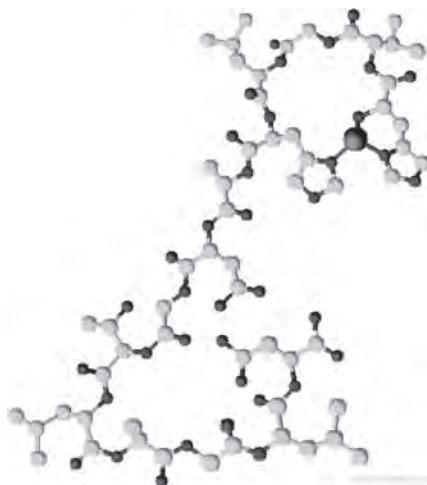


Rysunek 15. Schematyczna budowa transportera HupE z *Rhizobium leguminosarum*. Wskazano sekwencje zaangażowane w transport  $\text{Ni}^{2+}$  [48]

Figure 15. A schematic representation of the HupE transporter from *Rhizobium leguminosarum*. Indicated are the sequences involved in the transportation of  $\text{Ni}^{2+}$  [48].

Określiliśmy specyficzność zarówno peryplazmatycznej, jak i błonowej domeny HupE, względem natywnych jonów  $\text{Ni}^{2+}$  oraz jonów  $\text{Cu}^{2+}$  i  $\text{Zn}^{2+}$ , obecnych w ziemiach, które są naturalnym środowiskiem, w którym występuje *Rhizobium leguminosarum*, i które prawdopodobnie mogą być inhibitorami transportu  $\text{Ni}^{2+}$ , konkurując z nim o miejsca wiążące na HupE.

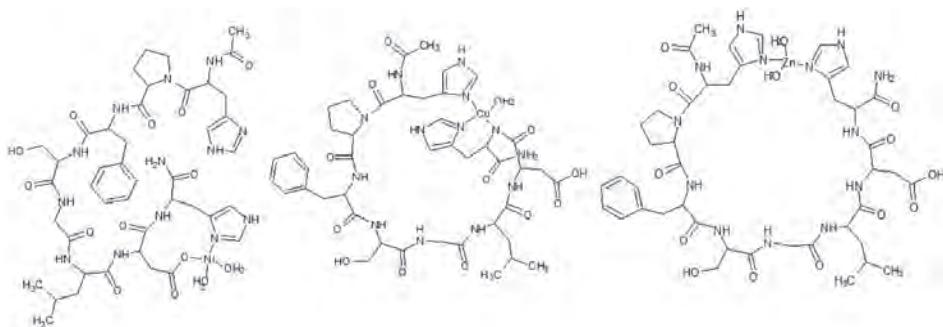
Za pomocą spektroskopii NMR precyzyjnie wskazaliśmy miejsca wiążące  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  i  $\text{Zn}^{2+}$  w peryplazmatycznym i błonowym fragmencie białka. W pH fizjologicznym (pH = 7,4) peryplazmatyczny rejon  ${}_{22}\text{HVGLHADGTLAGLN}_{35}$  wiąże badane metale w analogiczny sposób, angażując w koordynację imidazolowy i aminowy atom azotu His1 (tzw. wiązanie histaminopodobne) i azot z imidazolu His5 (Rys. 16). Z termodynamicznego punktu widzenia,  $\text{Cu}^{2+}$  jest w stanie wyprzeć  $\text{Ni}^{2+}$  z jego miejsca wiązania w peryplazmatycznym fragmencie HupE, podczas gdy  $\text{Zn}^{2+}$  nie jest znaczącym konkurentem dla  $\text{Ni}^{2+}$  ani w stężeniu równomolowym ( $[\text{ligand}] = [\text{Ni}^{2+}] = [\text{Cu}^{2+}] = [\text{Zn}^{2+}] = 0.001 \text{ M}$ ), ani w toksycznym stężeniu metali, przy których liczba *Rhizobium leguminosarum* spada w glebie o kilka rzędów wielkości [ $[\text{ligand}] = [\text{Ni}^{2+}] + [\text{Cu}^{2+}] + [\text{Zn}^{2+}]$ ;  $[\text{Ni}^{2+}] = 0,22 \text{ mM}$ ,  $[\text{Cu}^{2+}] = 0,54 \text{ mM}$ ,  $[\text{Zn}^{2+}] = 2,52 \text{ mM}$ ] [51].



Rysunek 16. Wiązanie jonów  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  i  $\text{Cu}^{2+}$  do peryplazmatycznej, N-końcowej domeny transportera HupE, odpowiedzialnego za wiązanie metali ( $_{22}\text{HVGLHADGTLAGLN}_{35}$ ). W pH 7,4, peryplazmatyczny fragment wiąże badane metale w analogiczny sposób, angażując w koordynację imidazolowy i aminowy atom azotu His1 (tzw. wiązanie histaminopodobne) i azot z imidazolu His5

Figure 16. The binding of  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  and  $\text{Cu}^{2+}$  to the periplasmic N-terminal domain of the HupE transporter, responsible for the binding of metals ( $_{22}\text{HVGLHADGTLAGLN}_{35}$ ). At pH 7.4, the periplasmic region coordinates the studied metals in the same binding mode, engaging the imidazole and the amine nitrogens of His1 (the so-called histamine-like binding) and the nitrogen of imidazole His5

Powinowactwo błonowego fragmentu  $_{36}\text{HPFSGLDH}_{43}$  do jonów  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  i  $\text{Zn}^{2+}$  jest analogiczne do powinowactwa fragmentu peryplazmatycznego względem wymienionych jonów metali (jony  $\text{Cu}^{2+}$  są w stanie wyprzeć z niego jony  $\text{Ni}^{2+}$ , chociaż sposób koordynacji badanych metali do tego rejonu różni się od siebie. W pH fizjologicznym, natywny  $\text{Ni}^{2+}$  koordynuje do azotu imidazolowego His43 i karboksylowej reszty Asp42,  $\text{Cu}^{2+}$  z kolei wiąże się do imidazolowych azotów His36, His43 i poprzedzającego His43 amidu.  $\text{Zn}^{2+}$  wiąże się jedynie do łańcuchów bocznych His36 i His43, a jego sferę koordynacyjną uzupełniają cząsteczki wody (Rys. 17).



Rysunek 17. Schematyczny sposób koordynacji jonów  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  i  $\text{Zn}^{2+}$  do błonowego fragmentu HupE,  ${}_{36}\text{HPFSGLDH}_{43}$ , w pH 7,4 [52]

Figure 17. Coordination of  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$  ions to the membrane region of HupE,  ${}_{36}\text{HPFSGLDH}_{43}$ , pH 7.4 [52]

Termodynamiczne parametry kompleksów utworzonych przez peryplazmatyczny [51] i błonowy [52] fragment HupE okazały się być sporym zaskoczeniem. Spodziewano się, że peryplazmatyczny fragment będzie wiązał  $\text{Ni}^{2+}$  słabiej od fragmentu błonowego, który 'podaje' transportowane jony wgłąb komórki – taki sposób koordynacji czyniłby transport wydajnym. Zaobserwowano odwrotną sytuację – peryplazmatyczny fragment, HupE,  ${}_{22}\text{HVGLHADGTLAGLN}_{35}$ , wiąże  $\text{Ni}^{2+}$  z dużo większym powinowactwem niż transmembranowy rejon  ${}_{36}\text{HPFSGLDH}_{43}$ . W pH fizjologicznym, tylko około 5% dostępnego  $\text{Ni}^{2+}$  będzie związane do rejonu błonowego, w pH 5–6 – około 10%, a w pH 4,5 – 13%. Pozostała część metalu pozostaje związana do rejonu peryplazmatycznego. Porównanie termodynamicznych parametrów kompleksów utworzonych przez peryplazmatyczny [51] i błonowy [52] fragment HupE pozwala wytłumaczyć, dlaczego jest on transporterem o średnim powinowactwie i małej wydajności – jego peryplazmatyczny rejon wiąże  $\text{Ni}^{2+}$  z dużo większym powinowactwem niż odpowiedzialny za transport błonowy fragment  ${}_{36}\text{HPFSGLDH}_{43}$ , który przekazuje  $\text{Ni}^{2+}$  do środka komórki. Ponadto, specyficzność obu rejonów względem badanych jonów metali jest podobna – jony  $\text{Cu}^{2+}$  wiążą się do nich silniej niż jony  $\text{Ni}^{2+}$ , co tłumaczy, dlaczego  $\text{Cu}^{2+}$  jest inhibitorem badanego transportera.

Oczywiście należy pamiętać o tym, że wyniki uzyskane *in vivo*, w środowisku błonowym, mogą różnić się od tych uzyskanych *in vitro* dla wyizolowanych fragmentów transportera; niemniej jednak wskazanie sposobu koordynacji i zrozumienie zależności między termodynamiką kompleksów metali z odpowiednimi fragmentami HupE i ich wpływem na wydajność działania transportera jest istotnym wkładem w chemię bionieorganiczną niklowych transporterów (wciąż znacznie mniej poznana niż chemia bionieorganiczna metali dużo bardziej powszechnych w biologii, takich jak żelazo, miedź czy cynk). Wykorzystanie podstawowej wiedzy o strukturalnych i termodynamicznych aspektach transporterów niklowych jest jednym z bardziej obiecujących obszarów badawczych, ukierunkowanych na



zaprojektowanie nowych, specyficznych terapii przeciwdrobnoustrojowych, takich jak (I) strategia 'konia trojańskiego', w której odpowiednie antybiotyki są połączone z nikloforami i są przekazywane przez dany transporter lub pozostają w jego bezpośrednim otoczeniu [53] lub (II) strategia oparta na tzw. odporności odżywczej (ang. 'nutritional immunity'), w której zahamowany zostałby transport  $\text{Ni}^{2+}$  do wnętrza patogenu.

## UWAGI KOŃCOWE

Przedstawiony wyżej cykl prac wyjaśnia elementy homeostazy niklu(II) i cynku(II) u bakterii i grzybów. Do ich głównych osiągnięć zaliczam:

- określenie miejsc wiążących  $\text{Zn}^{2+}$  w cynkoforze Pra1 z *C. albicans*; opisanie geometrii i termodynamiki powstających kompleksów i wskazanie C-końcowego rejonu białka jako miejsca, które wiąże  $\text{Zn}^{2+}$  z największym powinowactwem;
- określenie miejsc wiążących  $\text{Zn}^{2+}$  na nieustrukturyzowanej, N-końcowej domenie transportera cynku Zrt1 z *C. albicans* i opisanie geometrii i termodynamiki powstających kompleksów;
- zrozumienie chemii bionieorganicznej transportu  $\text{Zn}^{2+}$  opartego na cynkoforach (zrozumienie interakcji Pra1-Zrt1); zasugerowanie sposobu przekazywania  $\text{Zn}^{2+}$  z cynkoforu na transporter  $\text{Zn}^{2+}$ ;
- określenie specyficzności transportu metali opartego na cynkoforach; pokazanie, że mogą one również (z mniejszą wydajnością) transportować jony  $\text{Ni}^{2+}$ ;
- wskazanie miejsc koordynujących  $\text{Zn}^{2+}$  na fragmencie amyliny 1–19 i pramlinydyz – nieagregującym analogu amyliny i opisanie termodynamiki powstających kompleksów;
- zasugerowanie potencjalnego wpływu koordynacji jonów  $\text{Zn}^{2+}$  na przeciwdrobnoustrojową efektywność działania amyliny; określenie geometrii wiązania i jego wpływu na strukturę badanych ligandów (amylina<sub>1–19</sub> i pramlinydyz);
- określenie sposobu koordynacji i zrozumienie wpływu niekoordynujących powtórzeń polyGln na strukturę i zwiększoną termodynamiczną stabilność niklowych kompleksów N-końcowego rejonu Hpn-like, bakteryjnego białka magazynującego jony  $\text{Ni}^{2+}$ ;
- wskazanie roli specyficznych specyficznych rejonów białek chaperonowych z powtórzeniami polyHis i polyGln, do których najsilniej koordynują jony  $\text{Ni}^{2+}$  i  $\text{Zn}^{2+}$ ;
- wytłumaczenie wpływu pH i wiązania się  $\text{Ni}^{2+}$  do N-końcowej domeny HypA, bakteryjnego białka uwikłanego w poprawne fałdowanie się hydrogenazy na wiązanie się  $\text{Zn}^{2+}$  do tzw. strukturalnego rejonu tego białka;

- wytłumaczenie przeciętnej efektywności działania HupE, bakteryjnego transportera  $\text{Ni}^{2+}$ ;
- wyjaśnienie selektywności transportera HupE względem jonów  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  i  $\text{Cu}^{2+}$ .

Cel badań powstał z ciekawości naukowej, a nie z potrzeby znalezienia praktycznego rozwiązania danego problemu, jednak trudno byłoby upierać się przy tym, że opisane wyżej badania nie mają potencjału aplikacyjnego. Termodynamiczna i strukturalna charakterystyka cynkoforów czy transporterów  $\text{Zn}^{2+}$  i  $\text{Ni}^{2+}$  może stanowić podstawę, pierwszy krok w kierunku racjonalnego projektowania potencjalnych leków specyficznych wobec mikroorganizmów, które mogą być oparte np. na tradycyjnym leku połączonym z częścią cynkoforu, która jest szczególnie rozpoznawana przez grzybowy przekaźnik leków. Pierwsze badania biologiczne, które pokazują, że *Candida albicans* rozpoznaje C-końcowy rejon Pra1, zostały już wykonane (patrz Rysunek 8 i jego opis).

Pomimo tych wstępnych, bardzo obiecujących danych na temat potencjalnego wykorzystania wyżej opisanej wiedzy, w moim odczuciu jest ona nadal przede wszystkim interesującym wkładem do pięknej, podstawowej chemii bionieorganicznej, pozwalającej na lepsze zrozumienie podstawowych mechanizmów chemicznych. Prace są oparte na dobrze kontrolowanych eksperymentach i uważnych obserwacjach i, chociaż są to wyraźnie podstawowe badania, to widać, że jest to fundament w projektowaniu skutecznych, specyficznych i selektywnych leków do stosowania w ukierunkowanej terapii przeciwdrobnoustrojowej.

## PODZIĘKOWANIE

Autorkę wspomaga Narodowe Centrum Nauki (grant SONATA nr UMO-2014/13/D/ST5/02868).

## PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] European Commission, AMR Factsheet, 2017, ([https://ec.europa.eu/health/amr/sites/amr/files/amr\\_factsheet\\_en.pdf](https://ec.europa.eu/health/amr/sites/amr/files/amr_factsheet_en.pdf), dostęp 1.03.2018).
- [2] A. Coates, G. Halls, Y. Hu, Brit. J. Pharm., 2011, **163**, 184.
- [3] D. Denningd, M. Bromley, Science, 2015, **347**, 1414.
- [4] M. Vasak, D. Hasler, Curr. Opin. Chem. Biol., 2000, **4**, 177.
- [5] C.S. Hwang, G. Rhie, J.H. Oh, W.K. Huh, H.S. Yim, S.O. Kang, Microbiology, 2002, **148**, 3705.
- [6] I. Yike, Mycopathologia, 2011, **171**, 299.
- [7] D. Edwards, M. Handsley, C. Pennington, Mol. Aspects Med., 2008, **29**, 258.
- [8] Y. Kim, M. Cunningham, J. Mire, C. Tesar, J. Sacchettini, A. Joachimiak, J. Faseb, 2013, **27**, 1917.
- [9] J.L. Boer, S. Mulrooney, R. Hausinger, Arch. Biochem. Biophys., 2014, **544**, 142.
- [10] S. MacPherson, M. Larochele, B. Turcotte, Microbiol. Mol. Biol. Rev., 2006, **70**, 583.
- [11] J. Wątlý, S. Potocki, M. Rowińska-Żyrek, Chem. Eur. J., 2016, **22**, 15992.

- [12] P. Walencik, J. Wątyły, M. Rowińska-Żyrek, *Cur. Med. Chem.*, 2016, **23**, 3717.
- [13] F. Citiulo, I. Jacobsen, P. Miramón, L. Schild, S. Brunke, P. Zipfel, M. Brock, B. Hube, D. Wilson, *PLoS pathogens*, 2012, **8**: e1002777.
- [14] C. Outten, T. O'Halloran, *Science*, 2001, **292**, 2488.
- [15] K. Zakikhany, J. Naglik, A. Schmidt-Westhausen, G. Holland, M. Schaller, *Cell Microbiol*, 2010, **9**, 2938.
- [16] S. Karlin, Z. Zhu, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94**, 14231.
- [17] J.J. Braymer, D. Giedroc, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2014, **19**, 59.
- [18] N.M. Chiera, M. Rowińska-Żyrek, R. Wiczorek, R. Guerrini, D. Witkowska, M. Remelli, H. Kozłowski, *Metallomics*, 2013, **5**, 214.
- [19] L.A. Kelley, S. Mezulis, C. Yates, M. Wass, M. Sternberg, *Nature Protocols*, 2015, **10**, 845.
- [20] J. Amich, R. Vicentefranqueira, F. Leal, J. Calera, *Eukaryot. Cell.*, 2010, **9**, 424.
- [21] D. Łoboda, M. Rowińska-Żyrek, *Dalton T.*, 2017, **46**, 13695.
- [22] The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8 Schrödinger, LLC.
- [23] D. Łoboda, M. Rowińska-Żyrek, *Dalton T.*, 2018, **47**, 2646.
- [24] L. Wang, Q. Liu, J.C. Chen, Y. Cui, B. Zhou, Y.X. Chem. Biol. Chem., 2012, **393**, 641.
- [25] G. Wang, *Pharm.*, 2014, **7**, 545.
- [26] J.W. Hoppener, *Cell Biol.*, 2006, **38**, 726.
- [27] K. Ono, M. Condrón, D.B. Teplow, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2009, **106**, 14745.
- [28] J. Brender, S. Salamekh, A. Ramamoorthy, *Acc. Chem. Res.*, 2012, **45**, 454.
- [29] E. Lee, S. Singh, L. Legesse, S. Ahmad, E. Karnaukhova, R.P. Donaldson A.M. Jeremic, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2013, **15**, 12558.
- [30] A. Sinopoli, A. Magri, D. Milardi, M. Pappalardo, P. Pucci, A. Flagiello, J.J. Titman, V.G. Nicoletti, G. Caruso, G. Pappalardo, O. Grasso, *Metallomics* 2014, **6**, 1841.
- [31] L. Wang, Q. Liu, J.C. Chen, Y.X. Cui, B. Zhou, Y.X. Chem. Biol. Chem. 2012, **393**, 641.
- [32] A. Roberts, B. Leighton, J. Todd, D. Cockburn, P. Schofield, R. Sutton, S. Holt, Y. Boyd, A. Day, E. Foot, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1989, **86**, 9662.
- [33] M. Tomasello, A. Sinopoli, G. Pappalardo, *Eur. J. Med. Chem.*, 2014, **81**, 442.
- [34] J. Brender, E. Lee, M. Cavitt, A. Gafni, D.J. Steel, A. Ramamoorthy, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 6424.
- [35] R. Nanga, J. Brender, J. Jiadi Xu, G. Veglia, A. Ramamoorthy, *Biochem.*, 2008, **47**, 12680.
- [36] J. Brender, U. Diirr, D. Heyl, M. Budarapu, A. Ramamoorthy, *Biochim. Biophys. Acta*, 2007, **1768**, 2026.
- [37] M. Rowińska-Żyrek, *Dalton T.*, 2016, **45**, 8099-8106
- [38] D. Łoboda, M. Rowińska-Żyrek, *J. Inorg. Biochem.*, 2017, **174**, 150.
- [39] M. Rowińska-Żyrek, M. Salerno, H. Kozłowski, *Coord. Chem. Rev.*, 2015, **284**, 298.
- [40] M. Rowińska-Żyrek, J. Zakrzewska-Czerwińska, A. Zawilak-Pawlik, H. Kozłowski, *Dalton T.*, 2014, **43**, 8976.
- [41] M. Rowińska-Żyrek, D. Witkowska, S. Potocki, M. Remelli, H. Kozłowski, *New J. Chem.*, 2013, **37**, 58.
- [42] H. Kozłowski, S. Potocki, M. Remelli, M. Rowińska-Żyrek, D. Valensin, *Coord. Chem. Rev.*, 2013, **257**, 2625.
- [43] M. Rowińska-Żyrek, S. Potocki, D. Witkowska, D. Valensin, H. Kozłowski, *Dalton T.*, 2013, **42**, 6012.
- [44] W. Xia, H. Li, K. Sze, H. Sun, *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, **131**, 10031.
- [45] A. Sydor, D. Zamble, *Met. Ions Life Sci.*, 2013, **12**, 375.
- [46] D. Rodionov, P. Hebbeln, M. Gelfand, T. Eitinger, *J. Bacteriol.*, 2006, **188**, 2520.
- [47] T. Eitinger, D.A. Rodionov, M. Grote, E.W. Schneider, *FEMS Microbiol. Rev.*, 2011, **35**, 3.

- [48] B. Brito B., R.I. Prieto, E. Cabrera, M. Mandrand-Berthelot, J. Imperial, T. Ruiz-Argüeso, J. Palacios, *J. Bacteriol.*, 2010, 192, 925.
- [49] M. Albareda, A. Rodrigue, B. Brito, T. Ruiz-Argüeso, J. Imperial, M. Mandrand-Berthelot, J. Palacios J., *Metallomics*, 2015, 7, 691.
- [50] M. McGrath S., Chaudri., G. Giller, *Industr. Microbiol.*, 1995, **14**, 94.
- [51] M. Rowińska-Żyrek, *Inorg. Chim. Acta*, 2017, **460**, 141.
- [52] M. Rowińska-Żyrek, *J. Inorg. Biochem.*, 2018, **180**, 33.
- [53] A. Gorska, A. Sloderbach, M. Marszall, *Trends Pharmacol. Sci.*, 2014, **35**, 442.

Praca wpłynęła do Redakcji 30 maja 2018

# ANTYBIOTYKI PEPTYDOWE I ICH KOMPLEKSY Z JONAMI METALI

## PEPTIDE ANTIBIOTICS AND THEIR COMPLEXES WITH METAL IONS

**Kamila Stokowa-Soltys**

*Wydział Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego  
ul. Joliot-Curie 14, 50-383 Wrocław  
e-mail: kamila.stokowa-soltys@chem.uni.wroc.pl*

---

*Pracę dedykuję pamięci Pani Profesor Małgorzaty Jeżowskiej-Bojczuk*

---

Abstract

Wprowadzenie

1. Ogólna charakterystyka antybiotyków peptydowych
2. Mechanizm działania antybiotyków peptydowych
  - 2.1. Antybiotyki hamujące syntezę ściany komórkowej bakterii
  - 2.2. Antybiotyki oddziałujące na błony komórkowe bakterii
  - 2.3. Antybiotyki hamujące syntezę i działanie kwasów nukleinowych
3. Oddziaływanie antybiotyków peptydowych z jonami metali

Uwagi końcowe

Podziękowanie

Piśmiennictwo cytowane

---

**dr Kamila Stokowa-Sołtys** w roku 2013 z wyróżnieniem obroniła pracę doktorską i obecnie jest adiunktem na Wydziale Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego. Przez wiele lat współpracowała z prof. dr hab. Małgorzatą Jeżowską-Bojczuk. Pod Jej kierunkiem i opieką rozpoczynała swoją pracę naukową.

---

**ABSTRACT**

Metal ions are essential for numerous antibiotics. They play a crucial role in the mechanism of action and may be involved in specific interactions with cell membrane or target molecules, such as: proteins and nucleic acids. Due to the fact that complexes usually poses a higher positive charge than free ligands, they might interact more tightly with DNA and RNA molecules. However, complexes may also form during antimicrobial agents application, because a lot of them possess functional groups which can bind metal ions present in physiological fluids. Many recent studies support a hypothesis that drugs may alter the serum metal ions concentration. Moreover, it has been shown that numerous complexes with antibiotics can cause DNA degradation, e.g. bleomycin which form stable complexes with redox metal ions and split the nucleic acids chain via the free radicals mechanism. Therefore, it is widely used in cancer therapy.

**Keywords:** peptide antibiotics, metalloantibiotic, metal ion complexes

**Słowa kluczowe:** antybiotyki peptydowe, metaloantybiotyki, kompleksy jonów metali

---

---

## WPROWADZENIE

Gdy w 1670 r. Antoni van Leeuwenhoek po raz pierwszy zidentyfikował bakterie, nikt wtedy nie podejrzewał tych mikroorganizmów o wywoływanie chorób. Zwolennikiem nowej teorii dotyczącej wywoływania chorób przez bakterie był chirurg Lister z Edynburga. W XIX w. to właśnie on polecił stosowanie fenolu do odkażania rąk przed operacją i dezynfekowania sal operacyjnych, co znacznie zmniejszyło śmiertelność wśród pacjentów [1]. Odkrycie pierwszego antybiotyku miało miejsce w 1928 r. Dokonał tego Alexander Fleming, który po powrocie z wakacji zauważył destrukcyjne działanie pleśni *Penicillium notatum* na hodowlę gronkowca *Staphylococcus*. Interesujące jest to, że płytka z agarem pokryta gronkowcem została nieumyślnie wyjęta z inkubatora, a pleśń przedostała się na nią prawdopodobnie przez otwarte okno z położonego niżej laboratorium. W ten bardzo przypadkowy sposób odkryto penicylinę. Jednak jeszcze przez wiele lat nie była ogólnie dostępna, ze względu na trudności z jej wyizolowaniem. Dokonali tego Florey i Chain dopiero w 1940 r. Społeczeństwo otrzymało wówczas „złoty lek”, który zrewolucjonizował walkę z infekcjami bakteryjnymi [2].

Termin „antybiotyk”, wprowadzony przez Selmana A. Waksmana, po raz pierwszy pojawił się w tytule jego książki *Microbial Antagonisms and Antibiotic Substances*, opublikowanej w 1945 roku. Antybiotyk został wówczas zdefiniowany jako „wytwarzany przez mikroorganizmy i posiadający właściwości hamowania wzrostu, a nawet zniszczenia innych mikroorganizmów” [3]. Obecnie w miejsce antybiotyków naturalnych stosowane są głównie antybiotyki syntetyczne lub półsyntetyczne.

Współczesne leki przeciwbakteryjne można podzielić na dwie ogólne kategorie: bakteriobójcze, które zabijają bakterie z wydajnością powyżej 99,9% [4] oraz bakteriostatyczne, które jedynie hamują wzrost komórek bakteryjnych [5]. I choć najobszerniejszym działem antybiotykoterapii jest zwalczanie zakażeń bakteryjnych, to zakres stosowania antybiotyków obejmuje również działanie przeciwrzybicze, a nawet przeciwnowotworowe. Nie stosuje się ich natomiast w terapiach zakażeń wirusowych, z powodu zbyt niskich efektów terapeutycznych [6].

Najwygodniejszy i najlepiej systematyzujący podział antybiotyków wykorzystuje ich różnice w budowie chemicznej. Według tej klasyfikacji można wyróżnić pięć grup antybiotyków, przedstawionych w Tabeli 1. Podział ten jest chyba najczęściej cytowanym w literaturze [7]. Oczywiście nie jest to „jedyne słuszne” sposob grupowania antybiotyków. Innym praktycznym kryterium klasyfikacji jest ich sposób działania. Wykorzystuje się wówczas usystematyzowanie leków z uwzględnieniem ich miejsca docelowego. Według tego kryterium, antybiotyki można podzielić zasadniczo na cztery klasy: hamujące replikację i naprawę kwasów nukleinowych, hamujące syntezę ściany komórkowej, oddziałujące na błony komórkowe oraz zaburzające procesy energetyczne lub oddechowe komórek bakteryjnych [8].



Tabela 1. Podział antybiotyków ze względu na budowę chemiczną [7]  
 Table 1. Division of the peptide antibiotics according to chemical structure [7]

Grupa	Podgrupa	Przykład
antybiotyki peptydowe	antybiotyki $\beta$ -laktamowe modyfikowane aminokwasy antybiotyki polipeptydowe antybiotyki depsyptydowe antybiotyki glikopeptydowe antybiotyki lipopeptydowe antybiotyki chromopeptydowe	penicyliny blastycydyna S polimyksyna ramoplanina wankomycyna ristomycyna aktynomycyna
pochodne cukrów	antybiotyki cukrowe antybiotyki aminoglikozydowe antybiotyki N-glikozydowe antybiotyki C-glikozydowe antybiotyki glikolipidowe	nojirymycyna neomycyna streptotrycyna teikoplanina moenomycyna
antybiotyki makrocykliczne	makrolidy właściwe makrolidy polienowe ansamycyny	erytromycyna nystatyna ryfampicyna
chinony i pochodne	tetracykliny antracykliny benzochinony nafochinony	oksytetracyklina epirubicyna mitomycyna aktynorodyna
inne antybiotyki	związki steroidowe związki aromatyczne związki fosforoorganiczne nukleozydy polietera pochodne alkanów	kwasy fusydowy nowobiocyna fosfamycyna polioksyna monenzyna cyklohekimid

## 1. OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA ANTYBIOTYKÓW PEPTYDOWYCH

W organizmie człowieka naturalnie występują jedynie L-aminokwasy, natomiast w przypadku produktów metabolizmu bakterii, mogą występować obok siebie w łańcuchu peptydowym zarówno *enancjomery* L, jak i D. Stosowane jako terapeutyki fragmenty peptydowe mogą występować w formie prostych łańcuchów lub zamkniętych pierścieni. Większość antybiotyków posiada dodatkowo dołączone do łańcuchów podstawniki niebiałkowe. Najczęściej są one pochodzenia węglowodanowego (glikopeptydy) lub są resztami kwasów tłuszczowych (lipopeptydy) [9].

Zróznicowana budowa chemiczna antybiotyków peptydowych pozwala na usystematyzowanie ich w pięciu różnych grupach. Można wśród nich wyróżnić: peptydy o budowie liniowej, peptydy o budowie cyklicznej, depsyptydy, glikopeptydy i lipopeptydy [10]. Podział ten jest jedynie umowny, ponieważ wymienione cechy strukturalne nie muszą występować oddzielnie. Najczęściej budowa chemiczna antybiotyków peptydowych jest bardziej złożona. W jednej cząsteczce leku może istnieć kilka różnych: motywów strukturalnych, podstawników oraz połączeń

między poszczególnymi elementami. Struktura i skład cząsteczki chemicznej danego leku związane są bezpośrednio z jego biogenezą i szlakiem biosyntetycznym w organizmie mikroba [9].

Od sześćdziesięciu lat opisano już setki antybiotyków peptydowych. Dzieli się one na dwie klasy: peptydy syntetyzowane nierybosomalnie, wśród nich polimyksyny, kapreomycyna, wiomycyna, bacytracyna, ristomycyna, ramoplanina, gramicydyny oraz syntetyzowane rybosomalnie (naturalne) peptydy [11]. Pierwsza klasa antybiotyków (często drastycznie modyfikowanych) w znakomitej większości jest wytwarzana przez bakterie. Drugą, wytwarzają wszystkie gatunki żyjące (od bakterii po ssaki), jako główny składnik naturalnych cząsteczek obronnych gospodarza. Stanowią one praktycznie niewyczerpywalne źródło antybiotyków peptydowych nowej generacji [12].

Peptydy syntetyzowane nierybosomalnie wytwarzane przez bakterie i grzyby zawierają w swej strukturze dwie lub więcej reszt aminokwasowych [13]. Z założenia, nawet większe cząsteczki peptydowe w tej klasie są syntetyzowane na kompleksach multienzymatycznych, zamiast w sposób standardowy dla białek – na rybosomach. Według tej definicji, wiele antybiotyków stosowanych w lecznictwie to pochodne peptydów. Na przykład, naturalne penicyliny można rozdzielić na resztę monopodstawionego kwasu octowego, L-cysteinę i D-walinę, podczas gdy cefalosporyna C, będąca podstawowym składnikiem wielu półsyntetycznych cefalosporyn, składa się z kwasu D- $\alpha$ -aminoadypinowego, L-cysteiny,  $\alpha,\beta$ -dehydrowaliny i kwasu octowego [2, 13].

Synteza antybiotyków odbywa się przy udziale kompleksu białkowego katalizującego tę reakcję, nazywanego matrycą lub wzornikiem, a produktami biosyntezy są liniowe lub cykliczne polipeptydy. W tym miejscu bardzo często dochodzi do epimeryzacji aminokwasów. I choć enancjomery D nie występują naturalnie w komórkach mikroorganizmów, bardzo często pojawiają się w produktach ich metabolizmu. Obecność enancjomerów D korzystnie wpływa na działanie przeciwdrobnoustrojowe antybiotyków, gdyż nadaje im znaczną odporność na działanie enzymów proteolitycznych [15]. W końcowym etapie szlaku metabolicznego, dzięki kompleksowi enzymatycznemu, dochodzi również do dołączenia do łańcucha peptydowego podstawników niebiałkowych. Możliwa jest także dalsza modyfikacja ich struktury, polegająca na przyłączeniu grupy metylowej lub acylowej do N-końcowych grup aminowych, a także na reakcjach hydroksylowania aminokwasów i tworzenia pierścieni heterocyklicznych [14]. Często w procesie syntezy enzymatycznej antybiotyków powstaje kilka metabolitów. Poszczególne produkty różnią się nieznacznie, rozbieżności dotyczą przeważnie jednego aminokwasu w łańcuchu lub niewielkich zmian w podstawnikach [9].

Podczas procesu biosyntezy na rybosomach, powstają peptydy przeciwdrobnoustrojowe (ang. *antimicrobial peptides*, AMP), będące wrodzonymi elementami układu odpornościowego organizmów żywych. Biomolekuły te nie posiadają żadnych podstawników, ani modyfikacji. Pomimo budowy podobnej do białek komór-

kowych, charakteryzują się dużą odpornością na rozkład enzymatyczny. Wśród AMP rozróżnia się pięć grup: liniowe cząsteczki najczęściej o budowie  $\alpha$ -helisy, posiadające jedno wiązanie disulfidowe, tworzące strukturę pętli z ogonem, posiadające dwa lub więcej wiązań disulfidowych, powodujących tworzenie się struktury  $\beta$ -harmonijki, liniowe białka niezawierające reszt cysteiny o niestandardowym składzie aminokwasowym oraz białka będące częściami większych białek, np. laktoferrycyna [16].

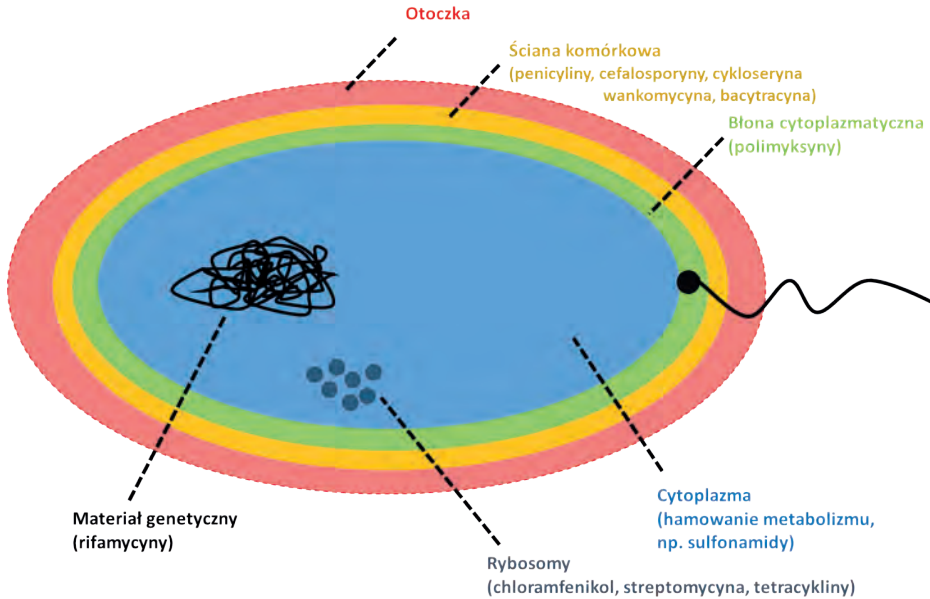
Pomimo różnic w strukturze, wszystkie peptydy typu AMP wykazują właściwości amfifilowe, co umożliwia im interakcje z błonami komórkowymi bakterii i ich niszczenie. Większość AMP ma dodatni ładunek wynikający z obecności zasadowych reszt aminokwasowych, m.in. argininy i lizyny. Właściwość ta pozwala AMP przyłączać się do ujemnie naładowanych fosfolipidów błon komórkowych bakterii [14, 16].

Skóra żaby była od wieków wykorzystywana do celów leczniczych, a w krajach Ameryki Południowej jest używana do dziś. Dopiero w 1962 Kiss i Michl odkryli obecność antybiotyków i peptydów o właściwościach hemolitycznych w wydzielinie skórnej żaby *Bombina variegata*, co doprowadziło do izolacji 24-aminokwasowego peptydu przeciwbakteryjnego o nazwie bombinina [14]. Ze względu na szerokie rozpowszechnienie endogennych antybiotyków peptydowych u wielu organizmów (owady, płazy, ryby, ssaki, ptaki), a także fakt, że odgrywają one bardzo ważną rolę w działaniu układu immunologicznego, wysunięto hipotezę, iż jest to najstarszy, naturalny system obrony przed drobnoustrojami. Nawet same bakterie wydzielają białka przeciwdrobnoustrojowe przeciw pokrewnym gatunkom, co zwiększa ich przeżywalność [16].

W niniejszym artykule przedstawiono zagadnienia związane głównie z mniejszymi antybiotykami peptydowymi, syntetyzowanymi na drodze enzymatycznej.

## 2. MECHANIZM DZIAŁANIA ANTYBIOTYKÓW PEPTYDOWYCH

Trudności w interpretacji mechanizmu działania antybiotyków (Rys. 1) pojawiają się zarówno przy rozpatrywaniu działania określonej klasy związków chemicznych, jak i przy analizie budowy chemicznej antybiotyków o jednym określonym działaniu. Pomimo tych trudności, w pracy zastosowano podział uwzględniający miejsce działania antybiotyków peptydowych. Jak już wspomniano wcześniej, wyróżnia się trzy klasy antybiotyków peptydowych syntetyzowanych nierybosomalnie: hamujące replikację i naprawę kwasów nukleinowych, hamujące syntezę ściany komórkowej oraz oddziałujące na błony komórkowe [8].



Rysunek 1. Miejsca działania związków przeciwbakteryjnych  
 Figure 1. The mode of action of antibacterial agents

## 2.1. ANTYBIOTYKI HAMUJĄCE SYNTEZĘ ŚCIANY KOMÓRKOWEJ BAKTERII

Inhibitorami biosyntezy ścian komórkowych bakterii są naturalne i półsyntetyczne penicyliny, a także liczne antybiotyki glikopeptydowe, jak ristomycyna i wankomycyna, lipo peptydowe, jak ramoplanina, oraz niektóre cykliczne peptydy, jak bacytracyna. Nawet wśród tych inhibitorów obserwuje się różne mechanizmy działania.

I tak, cykloseryna hamuje syntezę nukleotydowych prekursorów peptydoglikanu, zapobiegając addycji dwóch cząsteczek D-alaniny do rosnącego łańcucha peptydowego. Penicyliny i bacytracyna hamują biosyntezę peptydoglikanu, niezbędnego do powstawania zewnętrznej osłony komórek bakterii Gram-dodatnich. Bacytracyna inhibituje syntezę liniowych łańcuchów peptydoglikanu, zaburzając mechanizm transportu disacharydów przez błonę komórkową i wywołując niedobór elementów budulcowych ściany komórkowej. Penicyliny z kolei wpływają na stopień poprzecznego usieciowania utworzonych łańcuchów liniowych [17].

Glikopeptydy posiadają zdolność wiązania się za pomocą wiązań wodorowych z prekursorem peptydoglikanu w ostatniej fazie biosyntezy, w której powstaje ściana komórkowa. A dokładniej – potrafią oddziaływać ze swoistym fragmentem D-Ala-D-Ala bakteryjnego peptydoglikanu. Blokują w ten sposób polimerazę peptydoglikanu, potrzebną do dalszego przebiegu procesu transpeptydacji. Wszystkie te procesy prowadzą do wykształcenia upośledzonego mikroorganizmu, niezdolnego do

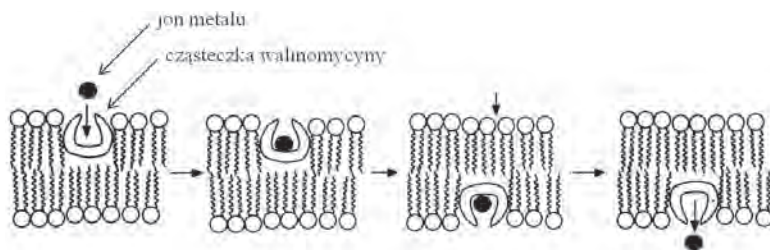
prawidłowego funkcjonowania. Komórka traci wówczas integralność i dochodzi do jej rozpadu, a co za tym idzie – do jej śmierci [18]. Przykładem antybiotyku glikopeptydowego jest wankomycyna, która posiada również zdolność do oddziaływania z RNA i wpływania na przepuszczalność błon komórkowych [19].

Wspomniane powyżej antybiotyki mają zastosowanie w leczeniu zakażeń bakteriami Gram-dodatnimi, natomiast nie znajdują zastosowania w terapii zakażeń wywołanych przez bakterie Gram-ujemne. Ze względu na duży rozmiar cząsteczek, nie są one w stanie przeniknąć przez błonę zewnętrzną otaczającą bakterie Gram-ujemne [18].

## 2.2. ANTYBIOTYKI ODDZIAŁUJĄCE NA BŁONY KOMÓRKOWE BAKTERII

Mechanizm działania antybiotyków lipopeptydowych opiera się na wstawieniu lipofilowego ogona tłuszczowego antybiotyku w błonę komórkową bakterii. Proces ten jest zależny od obecności jonów wapnia. Im większe jest ich stężenie w organizmie, tym lepsze działanie leku. Skutkiem takiego oddziaływania na błonę komórkową bakterii jest jej depolaryzacja i wypływ potasu z wnętrza komórki bakteryjnej, a w konsekwencji – jej śmierć [20].

Lipopeptydy należą do antybiotyków nowej generacji. Pierwszym, wprowadzonym w latach 80. XX wieku, terapeutycznym przynależącym do tej grupy była daptomycyna. Odmienność mechanizmu działania bakteriobójczego lipopeptydów warunkuje skuteczność ich działania, ponieważ bakterie nie zdążyły jeszcze wytworzyć oporności na nie. Za wiązanie jonów  $Ca^{2+}$  przez cząsteczkę daptomycyny odpowiedzialny jest jej fragment o sekwencji Asp-X-Gly-Asp. Wzajemna lokalizacja dwóch kwasów asparaginowych i glicyny jest istotna dla mechanizmu działania tego leku, natomiast w miejscu oznaczonym jako X, może znajdować się dowolny aminokwas [21].



Rysunek 2. Schemat działania walinomycyny [20]

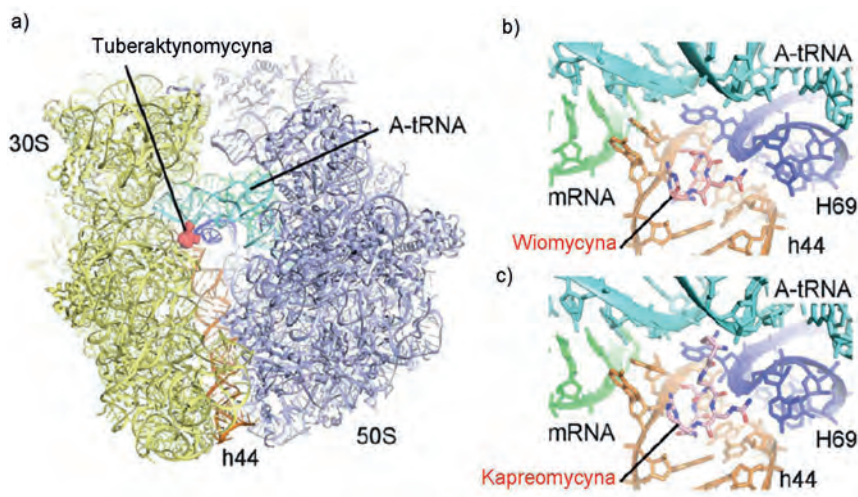
Figure 2. The scheme of action of valinomycin [20]

Kolejną grupą antybiotyków peptydowych oddziałujących na błonę komórkową bakterii są depsypeptydy. Sposób działania tych leków opiera się na transporcie jonów nieorganicznych przez błony komórkowe bakterii, dlatego nazywane są one antybiotykami jonoforowymi (Rys. 2). Efektem takiego działania depsypepty-

dów na komórki bakterii jest zmiana stężenia jonów metali, takich jak potas czy sód [22]. Skutkiem zaś zachwianie homeostazy patogenów, co prowadzi do ich śmierci. Jonofory działają bakteriobójczo jedynie na szczepy Gram-dodatnie. Gramicydyna i walinomycyna są zdolne do transportu jednowartościowych kationów. Wiążąc jony metali, przenoszą je na drugą stronę błony. Obniżone stężenie, np. potasu, prowadzi do zaburzeń procesów energetycznych w organizmie bakterii. Jednak ze względu na wysoką toksyczność, gramicydyna stosowana jest wyłącznie miejscowo, a walinomycyna nie znalazła zastosowania ani u ludzi, ani u zwierząt [23, 24].

### 2.3. ANTYBIOTYKI HAMUJĄCE SYNTEZĘ I DZIAŁANIE KWASÓW NUKLEINOWYCH

Lekami hamującymi wzrost bakterii przez blokowanie syntezy białek na rybosomach są tuberaktynomycyny: kapreomycyna i, strukturalnie do niej podobna, wiomycyna. Oba związki są cyklicznymi antybiotykami peptydowymi, działającymi bakteriostatycznie na prątki gruźlicy [25]. Choć mechanizm ich działania nie jest do końca poznany, wiadomo jednak, że zakłócają wiele funkcji rybosomów, w tym tworzenie kompleksu inicjacyjnego podjednostki 30S. Blokują również translokację tRNA od miejsca A do miejsca P (A – miejsce akceptorowe, P – miejsce peptydowe, oba zlokalizowane w dużej podjednostce rybosomu), uniemożliwiając tym samym procesy translacji [26].



Rysunek 3. Miejsce wiązania antybiotyków przeciwgruźliczych w rybosomie a) tuberaktynomycyny (czerwona) na powierzchni pomiędzy jego małą 30S (żółta) a dużą podjednostką 50S (niebieska), b) wiomycyny, c) kapreomycyny [26]

Figure 3. Anti-tuberculosis antibiotics binding to the ribosome a) tuberactinomycin (red) on the surface between its small 30S (yellow) and large 50S (blue) subunit, b) viomycin, c) capreomycin [26]

Uzyskana w roku 2010 struktura krystaliczna 70S rybosomu z bakterii *Thermus thermophilus* w kompleksie z kapreomycyną lub wiomycyną (Rys. 3) w znaczący sposób przyczyniła się do zrozumienia mechanizmu inhibicji translokacji. Występujące u prokariotów rybosomy 70S składają się z dużej podjednostki 50S (zawierającej 34 białka i dwie cząsteczki rRNA: 5S rRNA i 23S rRNA) i małej podjednostki 30S (zawierającej 21 białek i jedną cząsteczkę rRNA – 16S rRNA). Helisa H69 23S rRNA oddziałuje z helisą h44 16S rRNA, tworząc mostek B2a między podjednostkami. Na podstawie badań krystalograficznych potwierdzono hipotezę, że kapreomycyna i wiomycyna oddziałują na mostek B2a, uniemożliwiając syntezę białek bakteryjnych [26]. Miejsce wiązania tuberaktynomycyn w helisie h44 częściowo pokrywa się z miejscem wiązania aminoglikozydów, przez co obie grupy związków wykazują podobne efekty uboczne, w tym nieodwracalną utratę słuchu [27–30]. Wyniki badań sugerują, że omawiane antybiotyki wpływają na obie podjednostki, co jest unikalne wśród antybiotyków oddziałujących na rybosomy [26, 27, 31]. Wszystkie dotychczas zbadane antybiotyki, m.in. puromycyna, streptomycyna, chloramfenikol, wiążą się do miejsca znajdującego się albo na podjednostce 30S albo 50S rybosomu [32].

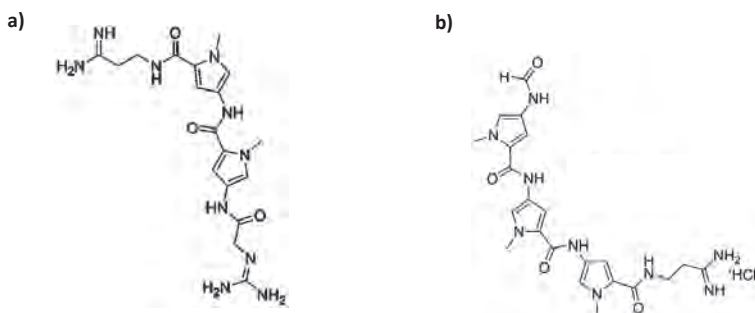
Hamowanie biosyntezy białek przez antybiotyki peptydowe oparte jest na wiązaniu leków do rybosomalnego RNA [32]. Wśród antybiotyków oddziałujących na kwasy nukleinowe są również związki oddziałujące na DNA. Mają one zdolność hamowania syntezy RNA przez blokowanie matrycy DNA. Antybiotyk wiąże się ściśle i specyficznie do dwuniciowego DNA, co inhibuje elongację transkrypcji przez zablokowanie polimerazy RNA [33]. Wiele małych cząsteczek antybiotyków ważnych w chemioterapii działa właśnie w ten sposób [25].

Przykładem jest chromopeptyd aktynomycyna D, który oprócz właściwości przeciwbakteryjnych, wykazuje również właściwości cytotoksyczne. Jego cząsteczka zawiera dwa cykliczne pentapeptydy, lecz ze względu na sposób i skuteczność działania aktynomycyny D, ważniejszy jest zawarty w strukturze cząsteczki leku płaski, tricykliczny, heteroaromatyczny pierścień aminofenoksazynowy. Dzięki niemu, cząsteczka jest zdolna do interkalacji pomiędzy pary zasad podwójnej helisy DNA, a tym samym do działania cytotoksycznego [34]. Zarówno wyniki badań prowadzonych w roztworze, jak i w ciele stałym potwierdzają, że antybiotyk ten jest interkalatorem, który najefektywniej oddziałuje z parą zasad guanina-cytozyna. Aktynomycyna D jest utrzymywana w odpowiednim położeniu wiązaniami wodorowymi, tworzącymi się pomiędzy zasadami DNA a cyklicznymi pentapeptydami, zlokalizowanymi po zewnętrznej stronie helisy [33]. Ponadto stwierdzono, że aktynomycyna D ściśle wiąże się również z jednoniciowym DNA (ang. *single-stranded DNA*, ssDNA), zgodnie z modelem semi-interkalacji, przez co również jest zaangażowana w terminację procesu transkrypcji [34–36]. Wyniki obliczeń teoretycznych sugerują, iż największy wkład (około 70%) w stabilność kompleksu lek-DNA, mają w przypadku jednoniciowego DNA, klasyczne wiązania wodorowe, a w przypadku dwuniciowego DNA (dsDNA) także inne oddziaływania między atomami [34]. Najnowsze badania z wykorzystaniem techniki ESI-MS wykazały, że ten antybiotyk

mocniej wiąże się z ssDNA, niż z odpowiednim dsDNA [35]. Ponadto na podstawie badań jednoniciowych oligomerów DNA zawierających dwa fragmenty GTC wykazano, że siła wiązania zależy od sekwencji kwasu nukleinowego [36].

Aktynomycynę D zalicza się do molekuł hybrydowych, tzw. *combilexins*. Jest to grupa ligandów DNA zawierająca interkalujący chromofor oraz element wiążący się w małym rowku łańcucha kwasu nukleinowego. Lek ten, pomimo stosunkowo długiego już stosowania (od roku 1954) w wielu terapiach przeciwnowotworowych, nadal budzi duże zainteresowanie przemysłu farmaceutycznego. Koncepcja kombinowanego sposobu oddziaływania z DNA pozwala na projektowanie innych struktur silnie i/lub specyficznie wiążących się z DNA [37].

Antybiotykami peptydowymi wiążącymi się w małym rowku DNA są także netropsyna oraz distamycyna A [38, 39]. Cechą charakterystyczną budowy tych związków jest obecność odpowiednio dwóch i trzech pierścieni *N*-metylopirolowych, oddzielonych od siebie krótkim łącznikiem, jakim jest grupa amidowa (Rys. 4). Mają one liniową, wydłużoną, giętką strukturę, umożliwiającą im dopasowanie się do kształtu małego rowka łańcucha DNA. Pozwala to na tworzenie się oddziaływań pomiędzy grupami funkcyjnymi liganda a wnętrzem małego rowka, wpływając stabilizująco na trwałość powstałego kompleksu. Distamycyna A oraz netropsyna wiążą się preferencyjnie do sekwencji bogatych w pary AT [40]. Ponadto związki te wykazują aktywność biologiczną, jako leki przeciwwirusowe [41].



Rysunek 4. Wzór strukturalny cząsteczki a) netropsyny, b) distamycyny A

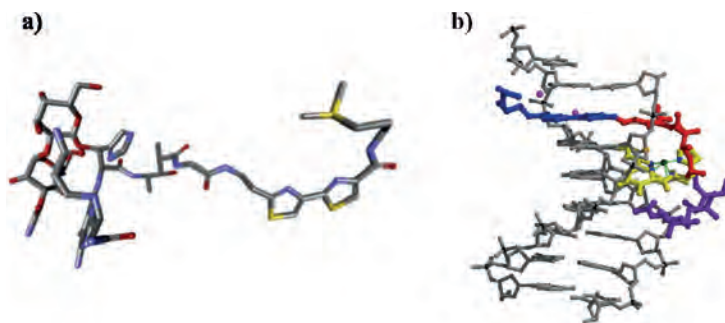
Figure 4. Molecular formula of: a) netropsin, b) distamycin A

Wiązanie się substancji terapeutycznych w dużym rowku DNA jest zjawiskiem dość rzadkim. Znacznie większa objętość dużego rowka czyni go miejscem dostępnym dla większych cząsteczek, takich jak np. białka, w których oprócz fragmentów strukturalnych słabo wiążących się w dużym rowku DNA, występują inne fragmenty pozwalające silnie połączyć cząsteczkę z DNA, np. wiązaniami kowalencyjnymi. Istnieją przypuszczenia, że netropsyna oraz jej molekule hybrydowe wiążą się także w dużym rowku DNA [42].

Bleomycyna jest z kolei bardzo silnym przecinaczem zarówno łańcucha RNA, jak i DNA (Rys. 5). Jest ona aktywna tylko w obecności jonów metali przejściowych, takich jak żelazo i miedź. Mechanizm działania tego cytostatyku polega na utlenie-



niu deoksyrybozy w DNA, inicjowanej abstrakcją protonu głównie z pozycji C-1', C-4' i C-5'. Zazwyczaj po oderwaniu protonu z pozycji C-1', następuje addycja  $O_2$ , w wyniku czego deoksyryboza przekształca się w lakton. Chociaż produkt ten jest stosunkowo stabilny, to jednak w obecności amin dochodzi do reakcji eliminacji i rozcięcia nici DNA. Analogiczny mechanizm reakcji działa w przypadku oderwania protonu z pozycji C-4' i C-5', przy czym ze względu na inną pozycję addycji tlenu, powstają inne produkty pośrednie [43]. Reakcja cięcia występuje w małym rowku DNA, głównie w sekwencjach GpT oraz GpC, gdzie reaktywnymi nukleotydami są odpowiednio T i C. Przecinanie łańcucha obserwowano niekiedy również we fragmentach GpA i ApT [44].



Rysunek 5. Struktura krystaliczna kompleksu  $Co^{3+}$ -bleomycyna-DNA [45]  
Figure 5. Crystal structure of the  $Co^{3+}$ -bleomycin-DNA complex

Warto zauważyć, że porównywalna sekwencja jest preferowana również przez aktynomycynę D [36]. W związku z tym, można przypuszczać, że działania obu antybiotyków zakłócają się nawzajem. Zarówno bowiem wiązanie do mniejszego rowka DNA, jak również interkalacja aktynomycyny D, może hamować rozszczepianie DNA przez bleomycynę. Nadmienić należy, że oba te przeciwnowotworowe antybiotyki są powszechnie stosowane w terapii razem. W celu zbadania interakcji między tymi związkami, przeprowadzono serię badań na restrykcyjnych fragmentach plazmidowego DNA, w tym na fragmencie 265mer z pBlueScript. Wyniki wykazują, że aktynomycyna D znacznie modyfikuje cięcie DNA przez bleomycynę. Cięcie przez bleomycynę głównej sekwencji docelowej (GpT oraz GpC) jest silnie hamowane przez aktynomycynę D, natomiast znacznie wzrasta rozszczepianie wtórnych fragmentów (GpA i ApT). Zjawisko to wynika z zakłócenia struktury podwójnej helisy spowodowanej interkalacją aktynomycyny do jej preferowanych fragmentów. Ponadto wykazano, że związki wiążące się w małym rowku DNA, jak wspomniana wcześniej distamycyna, również hamują cięcie przez bleomycynę fragmentów DNA w obszarze GpA i GpT. W przeciwieństwie do aktynomycyny, distamycyna nie powoduje redystrybucji miejsc rozszczepienia łańcucha DNA [46].

Do określenia miejsca wiązania związków chemicznych do DNA najczęściej stosuje się krótkie fragmenty restrykcyjne plazmidowego DNA. Natomiast, w celu

określenia właściwości cytotoksycznych, bardzo często wykorzystuje się całą kolistą cząsteczkę plazmidu [47–49]. Plazmidy są małymi cząsteczkami o wielkości do kilku tysięcy par zasad. Charakterystyczną ich cechą jest to, że mogą replikować się autonomicznie, niezależnie od chromosomu gospodarza. Ponadto są zdolne do przekazywania swoich genów innym komórkom, a także są nośnikami genów warunkujących m.in. antybiotykooporność, metabolizm niektórych naturalnych produktów, wytwarzanie toksyn i specyficznych bakteriocyn [50].

Koliste cząsteczki DNA są doskonałymi substratami do badania leków, mogących powodować cięcie DNA. Rozcięcie jednej z nici plazmidu nie zmienia jego masy, ale powoduje rozwinięcie struktury superhelikalnej (forma I), prowadząc do tworzenia się formy otwartej (forma II), podobnej do tej, jaką można otrzymać po działaniu na plazmid topoiizomerazą. Rozcięcie obu nici przeprowadza plazmid do formy liniowej DNA (forma III). Dwuniciowe uszkodzenia łańcucha DNA, mające przeważnie podłoże w reakcjach oksydacyjnych, są nieodwracalne. Organizm nie dysponuje mechanizmami skutecznej naprawy takich uszkodzeń [51].

W przypadku badań interkalatorów, najczęściej wykorzystuje się DNA z grasicy cielőcej (ctDNA). Interakcje aktynomycyny z ctDNA badano metodą woltamperometrii cyklicznej (CV). Wyniki badań wykazały, że aktynomycyna D silnie wiąże się z DNA, ze stałą wiązania równą  $7,54 \times 10^9 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$ , a wiązanie obejmuje sześć par zasad [240]. Do badania oddziaływania interkalatorów z ctDNA częściej jednak wykorzystuje się spektroskopię UV-Vis, CD oraz fluorescencję [53–58].

### 3. ODDZIAŁYWANIE ANTYBIOTYKÓW PEPTYDOWYCH Z JONAMI METALI

Chociaż dla większości antybiotyków obecność jonów metali nie jest konieczna do pełnienia ich funkcji, to jednak istnieją antybiotyki, dla których koordynacja jonu metalu jest niezbędna. W tym przypadku, skoordynowane jony metali odgrywają ważną rolę w utrzymaniu właściwej struktury i/lub efektywności ich działania. Usunięcie jonów metali z tych antybiotyków może skutkować utratą lub obniżeniem ich aktywności farmakologicznej. Z tego typu leków dotychczas najlepiej poznano – pod względem mechanizmu działania - bleomycynę, streptonigrynę oraz bacytracynę.

Podobnie jak metaloproteiny, antybiotyki te czasami nazywa się metaloantybiotykami [59]. Termin ten nie jest jednak zbyt często używany, ponieważ sugeruje, że związki mają charakter metaloorganiczny, a w tego typu układach zawsze występuje przynajmniej jedno wiązanie kowalencyjne metal-węgiel [60]. W przypadku omawianych tu kompleksów, są to zazwyczaj wiązania koordynacyjne. Bez względu na terminologię, wiele kompleksów metali z antybiotykami, a także z ich pochodnymi, oraz kompleksy metali z ligandami syntetycznymi, wykazują bardzo silne działanie przeciwbakteryjne, przeciwgrzybicze, czy przeciwnowotworowe [59].

Wspomniana już wcześniej bacytracyna jest dodekapeptydowym antybiotykiem izolowanym z *Bacillus subtilis* i *Bacillus licheniformis*. Ma ona stosunkowo wąskie spektrum działania, skierowane głównie przeciwko bakteriom Gram-dodatnim, takim jak gronkowce i paciorkowce [61]. Bacytracyna wiąże wiele dwuwartościowych jonów metali i tworzy z nimi kompleksy o stechiometrii 1:1. Powinowactwo jonów metali do liganda, jakim jest bacytracyna, jest następujące:  $\text{Cu}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Co}^{2+} \sim \text{Zn}^{2+} > \text{Mn}^{2+}$ . Określono również aktywność biologiczną tworzących się kompleksów, która - jak wykazano - wiąże się bezpośrednio z powinowactwem. Najaktywniejsze są kompleksy bacytracyny z miedzią [62]. Co ciekawe, antybiotyk wykazuje miedzio-zależną inhibicję wzrostu pleśni *Neurospora crassa* [63]. Początkowo sądzono, że wiązanie jonu metalu następuje przez imidazolowy atom azotu pochodzący z His-10 i pierścień tiazolowy (atom azotu lub siarki), a także grupę aminową Ile-1. Wykluczono natomiast udział grupy karboksylowej [64]. Kolejne badania nie do końca potwierdziły te sugestie. Ze względu na obecność w cząsteczce bacytracyny wielu potencjalnych ugrupowań donorowych, włożono wiele wysiłku w scharakteryzowanie procesu koordynacji. Na przestrzeni wielu lat zastosowano w tym celu szerokie spektrum metod badawczych, począwszy od potencjometrii [64] przez ORD [47],  $^1\text{H}$  NMR [65],  $^{13}\text{C}$  NMR [66] i EPR [67]. Dopiero te ostatnie badania bezsprzecznie potwierdziły udział w procesie wiązania jonów  $\text{Cu}^{2+}$  reszt His-10, Glu-4 i Asp-11. Można było wykluczyć z niego udział siarki pierścienia tiazolowego, ponieważ kompleks charakteryzowałby się wówczas niższymi wartościami parametrów  $g$  i  $A$  [68].

Ostatnie badania metodą EXAFS kompleksu bacytracyny z jonami cynku sugerują, że sfera koordynacyjna tego metalu składa się z trzech atomów azotu oraz jednego atomu tlenu. Atomy donorowe bacytracyny przypisano do  $N$ -końcowej grupy aminowej Ile-1, atomu azotu pierścienia imidazolowego His-10, atomu azotu pierścienia tiazolowego oraz grupy karboksylowej Glu-4 [69]. Sugeruje się również, że  $N$ -końcowa grupa aminowa Ile-1 znajduje w pobliżu jonu metalu. Czy jest ona bezpośrednio zaangażowana w proces koordynacji nie można ani potwierdzić, ani też wykluczyć. Z całą pewnością można natomiast wyeliminować wiązanie jonów metalu przez atom siarki pierścienia tiazolowego [70].

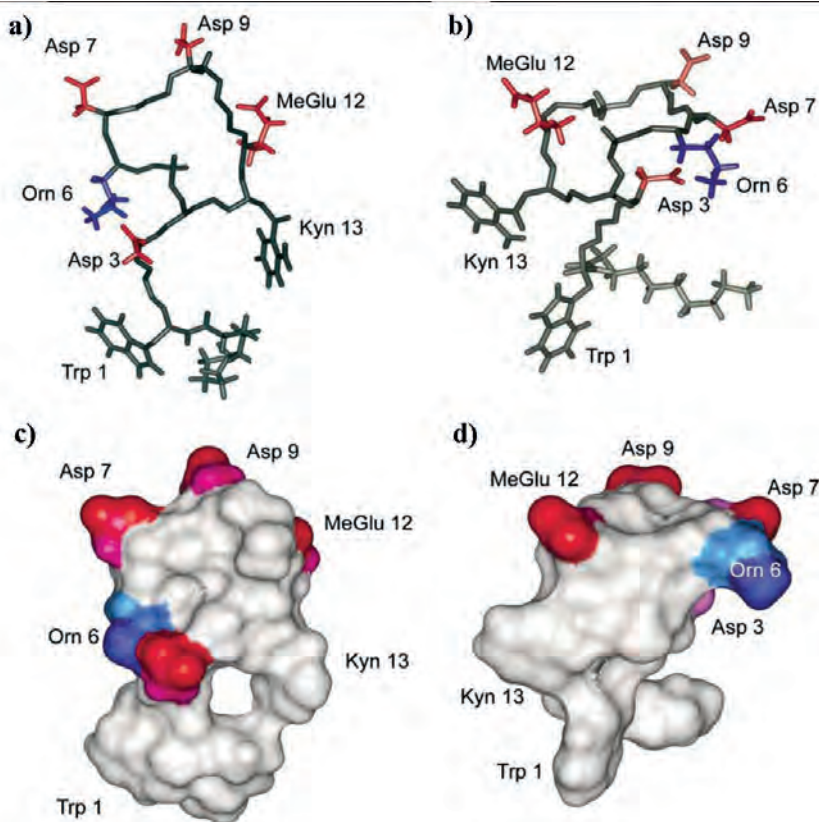
W wielu preparatach farmaceutycznych do stosowania miejscowego, a w szczególności w maściach i pudrach, jednym ze składników aktywnych jest sól cynkowa bacytracyny. Jest ona aktywna na niemal wszystkie bakterie Gram-dodatnie wywołujące choroby skóry i błon śluzowych. Może być stosowana nawet u niemowląt, w przypadku pieluszkowego zapalenia skóry i sączących wyprysków skórnych [59].

Często stosowanym antybiotykiem peptydowym jest także bleomycyna, która należy do grupy antybiotyków glikopeptydowych. Została po raz pierwszy wyizolowana jako kompleks z jonami miedzi(II) z *Streptomyces verticillus* [71]. Wkrótce okazało się, że wykazuje ona właściwości przeciwnowotworowe i szybko stała się jednym z najszerzej stosowanych farmaceutyków w leczeniu raka jąder, chłoniaka, raka głowy i szyi, a także w terapii skorzajonej z cisplatyną i adriamycyną zwią-

zanego z AIDS mięsaka Kaposiego [72]. W efekcie badań wykazano, że zarówno kompleksy  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  jak i  $\text{Cu}^+$  i  $\text{Cu}^{2+}$  są aktywnymi *in vivo* formami antybiotyku, przy czym dwa pierwsze są nawet skuteczniejsze. Skład sfery koordynacyjnej obu tych jonów metali wciąż pozostaje kontrowersyjny z powodu braku dostatecznych informacji strukturalnych. Kompleksy bleomycyny z jonami cynku i kobaltu(III) są biologicznie nieaktywne [73]. Bleomycyna jest znakomitym ligandem dla wielu jonów metali przejściowych, w tym  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{3+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{3+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Ga}^{3+}$ ,  $\text{Ru}^{2+}$ , jak również promieniotwórczego  $^{105}\text{Rh}$ , stosowanego w radioterapii, a także wspomnianych już wcześniej  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  oraz  $\text{Cu}^+$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  [74–76]. Przejścia d-d na widmach UV-Vis kompleksów miedzi(II) z bleomycyną oraz jej analogami występują przy długości fali około 600 nm ( $\epsilon = 110 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Ich energia jest większa niż dla centrów miedziowych typu II, co może sugerować obecność silnego pola ligandów w odkształconej pięcio- lub sześcioczołowej sferze koordynacyjnej tego kompleksu. Jego struktura stała się jaśniejsza, po wykrystalizowaniu kompleksu jonu miedzi(II) z pośrednim produktem biosyntezy. Jak dowiedziono, bleomycynaten koordynuje jony miedziowe przez atomy azotu pierścienia imidazolowego, pirymidynowego, grupę aminową  $\beta$ -aminoalaniny i azot amidowy  $\beta$ -hydroksyhistydyny [77].

W przypadku kompleksów z jonem  $\text{Fe}^{2+}$ , w proces wiązania zaangażowane są te same co dla jonów miedzi(II) atomy donorowe, z jedną tylko różnicą. W procesie uczestniczy dodatkowo grupa amidowa, zlokalizowana przy zmodyfikowanej D-mannozy. Pomimo sporów, sugeruje się, że struktura angażująca pięć donorowych atomów w kompleksie o symetrii zniekształconego oktaedru posiada nadal jedno niezapełnione miejsce koordynacyjne, a tym samym ma możliwość wiązania cząsteczki tlenu [78]. Analogiczną strukturę mają również kompleksy z jonami kobaltu na niższym stopniu utlenienia (+2) [79]. Równie silnie jony metali wiązane są przez analogi bleomycyny, w tym tallysomycynę [80], peplomycynę [81] oraz fleomycynę [82].

Daptomycyna jest stosunkowo nowym antybiotykiem lipopeptydowym, stosowanym w leczeniu zakażeń skóry, spowodowanych przez bakterie Gram-dodatnie, w tym metylinooporne *Staphylococcus aureus* [83]. W przeciwieństwie do zdecydowanej większości antybiotyków peptydowych, które mają charakter amfipatyczny i duży ładunek dodatni (nawet do +9, głównie ze względu na obecność reszt argininy i lizyny), daptomycyna jest ujemnie naładowanym cyklicznym lipopeptydem [84].



Rysunek 6. Daptomycyna a) struktura cząsteczki; b) struktura kompleksu z jonami  $\text{Ca}^{2+}$  c) model powierzchni daptomycyny; d) model powierzchni kompleksu. Ujemnie naładowane łańcuchy boczne zaznaczone zostały na czerwono, naładowane dodatnio na niebiesko [85]

Figure 6. Daptomycin a) molecular structure; b) structure of the  $\text{Ca}^{2+}$  complex; c) model of daptomycin surface; d) model of the complex surface. Color red indicates negative charges of amino acids side chains, while blue positive ones [85]

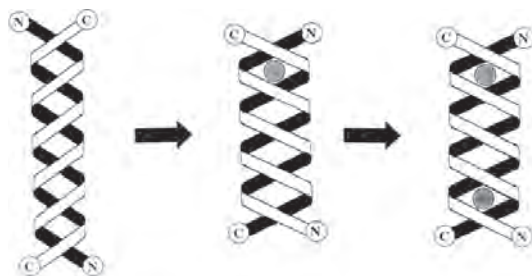
Unikalną cechą tego antybiotyku jest jego aktywność przeciwbakteryjna całkowicie zależna od jonów wapnia [86–90]. Wyniki badań przeprowadzonych w 2004 roku przez Hancock'a dowodzą, że jony wapnia powodują zmiany strukturalne w cząsteczce daptomycyny (Rys. 6a, 6b), co z kolei wywołuje jego interakcje z lipidami [85]. Najprawdopodobniej w wiązanie jonów wapnia zaangażowana jest grupa karboksylowa aminokwasu Asp-3 [91]. Rysunki 6c i 6d ilustrują struktury powierzchni, odpowiednio samego liganda oraz kompleksu. Jony wapnia, wiążąc się z daptomycyną w roztworze, zmniejszają całkowity ładunek liganda z  $-3$ , do  $-1$  dla kompleksu. Ponadto powodują wzrost amfipatyczności oraz, w mniejszym stopniu, wzrost powierzchni hydrofobowej cząsteczki leku. Może to powodować nie tylko oligomeryzację peptydu, ale również ułatwia jego oddziaływanie z błoną komórkową. Stwierdzono także, że jon  $\text{Ca}^{2+}$  może działać jako pomost między daptomy-

cyną i fosfolipidami, prowadząc do kolejnej zmiany konformacyjnej. Tym samym umożliwia głębsze wniknięcie leku do wnętrza błony komórkowej bakterii i zakłóca jej strukturę [85].

Znane są także inne antybiotyki lipopeptydowe, których działanie zależne jest od jonów wapnia, wśród nich amfomycyna i fruylimycyna [92] oraz surfaktyna [93]. Postuluje się, że wszystkie antybiotyki lipopeptydowe, zależne od jonów wapnia, oddziałują z błoną komórkową w podobny sposób [85].

Wiele antybiotyków peptydowych nie wymaga skoordynowania jonu metalu do pełnienia swoich funkcji, ale obecność w ich cząsteczkach potencjalnych atomów donorowych sprzyja procesowi ich wiązania. W przypadku tworzenia się stabilnych i trwałych kompleksów, fakt ten może mieć wpływ na homeostazę jonów metali w organizmie. I tak, na przykład, lipopeptyd ituryna jest zdolny do wiązania jonów metali alkalicznych we wnętrzu pierścienia peptydowego [94].

Oprócz ituryny, z jonami metali alkalicznych oddziałuje także gramicydyna A. Jest to liniowy, hydrofobowy pentapeptyd, zbudowany na przemian z aminokwasów o konfiguracji L i D. Oba jej końce są zablokowane – przez grupę formylową (*N*-koniec) oraz etanolamid (*C*-koniec). Gramicydyna A jest syntetyzowana przez bakterie ze szczepu *Bacillus brevis* [95]. Antybiotyk ten w błonie komórkowej zachowuje się jak jonofor i jest zdolny do transportu jednowartościowych kationów [96]. Cząsteczki leku, tworząc podwójną helisę, silnie wiążą kationy jednowartościowe. Odkryto, że grupy karbonylowe tryptofanów, zlokalizowanych w pozycjach 11 obu helis, są głównym miejscem wiązania tych jonów [97]. Chociaż zmierzone stałe wiązania dla poszczególnych jonów są zmienne, względne powinowactwo wiązania dla różnych kationów jest w zasadzie zgodne w serii  $Cs^+ \approx Rb^+ \gg K^+ > Na^+ > Li^+$ . Jony te są znacznie mocniej wiązane przez pierwsze miejsce wiązania, niż przez drugie (Rys. 7) [98].

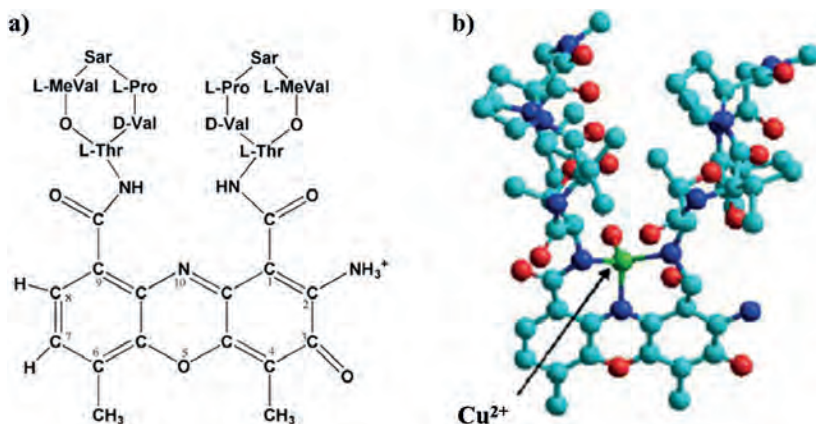


Rysunek 7. Schemat przedstawiający proponowane dwa miejsca wiązania kationów jednowartościowych przez gramicydynę A [98]

Figure 7. Scheme of two proposed binding sites of monovalently charged ions by gramicidin A [98]

Należąca do grupy antybiotyków chromopeptydowych aktynomycyna D jest jednym z najpopularniejszych związków, stosowanych w leczeniu nowotworów [99]. Zbadano aktywność przeciwnowotworową wielu syntetycznych analogów eteru koronowego aktynomycyny D, pod kątem zdolności kompleksowania jonów metali

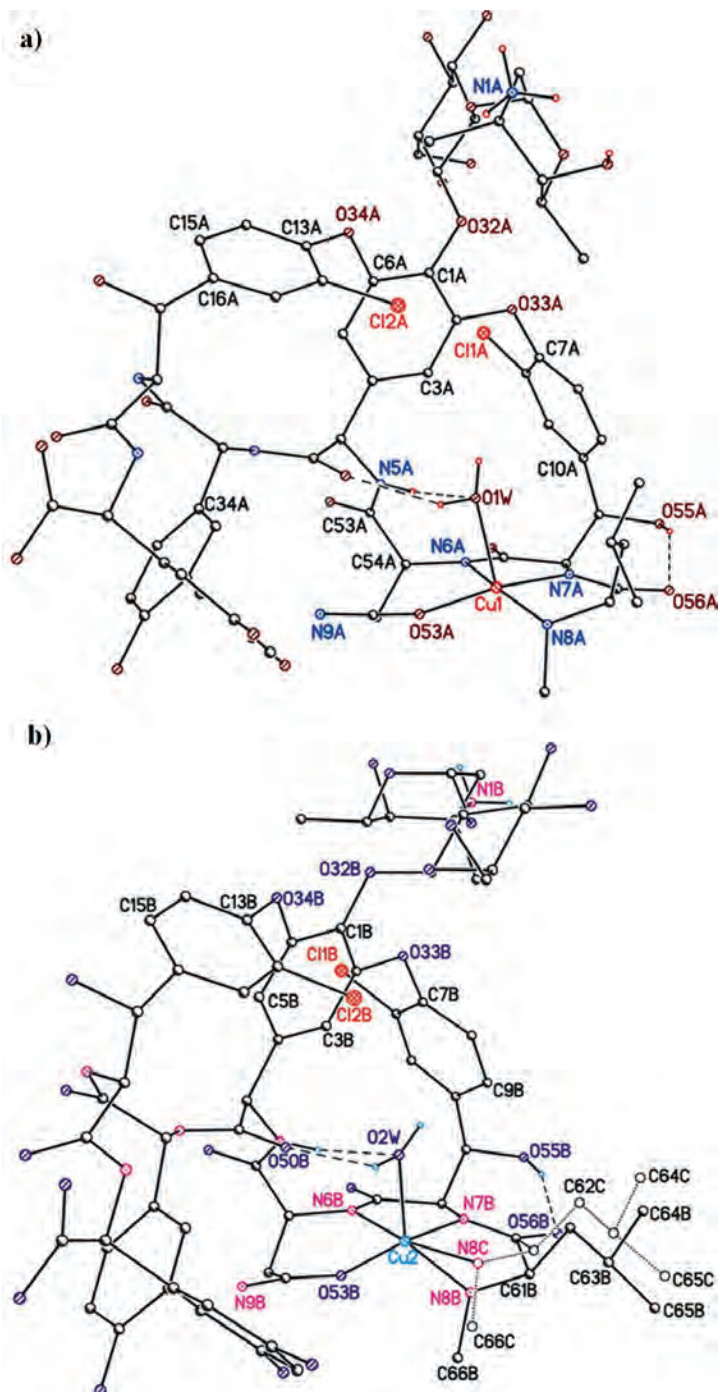
przez łańcuchy boczne tego leku [100]. Przy zastosowaniu metody dichroizmu kołowego oraz – 35 lat później, w roku 2003 – przy zastosowaniu woltamperometrii cyklicznej stwierdzono, że antybiotyk ten może wiązać jony miedzi oraz, że właśnie w takiej postaci, lek może wiązać się do DNA, tworząc układ ternarny [101, 102]. W 2004 roku, na bazie analizy szeregu wyników spektroskopowych, zidentyfikowano miejsca wiązania jonów miedzi(II). W proces koordynacji zaangażowane są trzy donorowe atomy azotu: heterocykliczny pierścienia aminofenoksazonowego oraz dwa z najbliższych wiązań amidowych w cząsteczce aktynomycyny D (Rys. 8) [103]. W 2012 roku zbadano kompleks aktynomycyny z jonami srebra. Zaproponowano ten sam zestaw atomów donorowych, jak w przypadku kompleksu z jonami miedzi(II) [104].



Rysunek 8. a) wzór strukturalny cząsteczki aktynomycyny D, b) struktura kompleksu  $\text{Cu}^{2+}$ -aktynomycyna D [103]

Figure 8. a) structure of actinomycin D molecule, b) structure of  $\text{Cu}^{2+}$ -actinomycin D complex [103]

Zbadano także miejsca wiązania jonów miedzi(II) przez wankomycynę [105] i teikoplaninę [106]. Oba antybiotyki należą do grupy antybiotyków glikopeptydowych [107] i, choć są swoimi analogami, ich strefa koordynacyjna znacznie się różni. Dla obu kompleksów przeprowadzono serię badań strukturalnych w roztworze. W przypadku wankomycyny w wiązanie jonów miedzi(II) w pH fizjologicznym, zaangażowane są trzy donorowe atomy azotu: drugorzędowej grupy aminowej i dwóch zdeprotonowanych wiązań peptydowych [105]. Natomiast w przypadku teikoplaniny, tworzą się kompleksy dwuazotowe, a w proces koordynacji zaangażowana jest pierwszorzędowa grupa aminowa oraz atom azotu najbliższego wiązania peptydowego [106]. Dowiedziono także, że teikoplanina, związana do podłoża krzemionkowego, wykazuje zdolność do wiązania stereoizomerów różnych kompleksów z jonami rutenu(II) z wysoką regio-, diastereo- i enancjoselektywnością, co sprawia, że jest użytecznym narzędziem do rozdzielania HPLC [108].

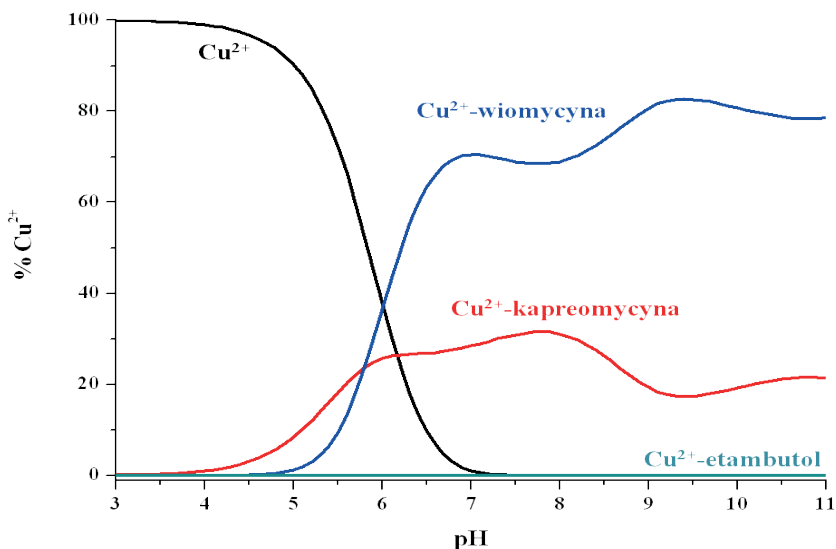


Rysunek 9. Struktura krystaliczna kompleksów  $\text{Cu}^{2+}$ -wankomycyna a) formy A, b) formy B [109]  
 Figure 9. Crystal structure of  $\text{Cu}^{2+}$ -vancomycin complex a) form A, b) form B [109]



Dla kompleksu  $\text{Cu}^{2+}$ -wankomyca przeprowadzono również badania rentgenostrukturalne. Rozwiązana struktura krystaliczna wyraźnie wskazuje na istnienie dwóch różniących się geometrią form kompleksowych, oznaczonych jako A i B (Rys. 9). Atomy donorowe w obu formach pozostają takie same. Jon metalu skoordynowany jest w peryferyjnej, giętkiej części antybiotyku. W proces koordynacji, podobnie jak w przypadku kompleksu w roztworze, zaangażowane są trzy atomy azotu cząsteczki leku. Wykazano oddziaływanie z tlenem amidowym reszty asparaginowej. Kompleks ma zatem geometrię piramidy kwadratowej, a cząsteczka wody w pozycji apikalnej uzupełnia pięciokoordynacyjną sferę wokół jonu metalu (Rys. 9) [105, 109]. Jak już wspomniano, ten sam zestaw atomów donorowych nie znajduje odzwierciedlenia w identycznej dla formy kompleksowej A i B geometrii wokół poszczególnych jonów miedzi(II). Nie oznacza to, że obie formy kompleksowe drastycznie się różnią. Niewielkie różnice w geometrii pomiędzy formami A i B uwidaczniają się w odległości wody apikalnej od jonu  $\text{Cu}^{2+}$ . Odległość ta jest niewiele mniejsza (różnica wynosi 0,047 Å) dla formy A. Natomiast w formie B łańcuch boczny *N*-końcowej reszty leucynowej jest nieuporządkowany i występuje w dwóch położeniach (Rys. 9 b) [109].

W przebiegu wielu chorób, w tym także gruźlicy, obserwuje się znaczny wzrost stężenia jonów miedzi(II) w osoczu krwi (nawet o 21%) [110]. Co ciekawe stężenie to spada i wraca do prawidłowego poziomu po leczeniu farmakologicznym. Postuluje się, że leki przeciwgruźlicze mogą chelatować jony  $\text{Cu}^{2+}$  i wpływać na ich homeostazę [111, 112]. Porównano więc siłę wiązania jonów miedzi(II) przez trzy wciąż stosowane leki przeciwgruźlicze. Rysunek 10 wyraźnie wskazuje, że jony miedziowe są najefektywniej wiązane przez wiomycynę. W pH fizjologicznym aż 70% jonów  $\text{Cu}^{2+}$  wiąże sam antybiotyk, a pozostałe 30%-kapreomycyna. Natomiast etambutol, uważany za silny chelator tych jonów [111], wpływający na ich homeostazę w organizmie, jest w tym układzie praktycznie bez szans wiążąc niespełna 1%  $\text{Cu}^{2+}$ . Można więc przypuszczać, że u pacjentów leczonych kapreomycyną, a w szczególności wiomycyną, stężenie jonów  $\text{Cu}^{2+}$  znacznie szybciej wraca do normy, niż u leczonych etambutolem. Oczywiście, może to powodować nie tylko efekty pożądane (związane z powrotem do prawidłowego poziomu  $\text{Cu}^{2+}$ ), ale również niekorzystne. Idąc krok dalej, można przypuszczać, że większa toksyczność wiomycyny w stosunku do kapreomycyny wynika z silniejszego wiązania jonów  $\text{Cu}^{2+}$  i zaburzenia homeostazy tego metalu. Może to być szczególnie niebezpieczne, w przypadku długotrwałego stosowania leku, i może odpowiadać za efekty uboczne [113].



Rysunek 10. Wykres obrazujący konkurencję w wiązaniu jonów  $\text{Cu}^{2+}$  pomiędzy wiomycyną, kapreomycyną i etambutolem, M:L 1:1.1,  $[\text{Cu}^{2+}] = 1 \text{ mM}$

Figure 10. Competition diagram for viomycin, capreomycin and ethambutol in  $\text{Cu}(\text{II})$  binding, M:L 1:1.1 molar ratio,  $[\text{Cu}^{2+}] = 1 \text{ mM}$

## UWAGI KOŃCOWE

Antybiotyki są substancjami chemicznymi zdolnymi do hamowania wzrostu komórek bakteryjnych lub powodują ich śmierć. Niektóre z nich (np. bacytracyna, fleomycyna, bleomycyna) są nieaktywne pod nieobecność jonów metali, inne wykazują korzystniejsze właściwości biologiczne po ich skompleksowaniu (np. daptomycyna, kapreomycyna) [59, 73, 82, 114]. Antybiotyki peptydowe, ze względu na dużą liczbę potencjalnych ugrupowań donorowych zlokalizowanych w swoich cząsteczkach, mogą wpływać na homeostazę jonów metali, m.in.  $\text{Cu}^{2+}$ . Jest to szczególnie istotne, ponieważ w wielu stanach patologicznych (infekcje bakteryjne, nowotwory, gruźlica, PD, AD) obserwuje się podwyższone stężenie jonów miedziowych, co może ułatwiać tworzenie się kompleksów z aplikowanymi farmaceutykami [111].

Oczywiście głównym zadaniem antybiotyków jest zwalczanie infekcji bakteryjnych, ale niektóre z nich wykazują właściwości przeciwgrzybicze czy przeciwnowotworowe. Ze względu na niski efekt terapeutyczny, nie stosuje się ich w leczeniu infekcji wirusowych. Mechanizm działania antybiotyków peptydowych polega na inhibicji syntezy ściany komórkowej, oddziaływaniu na błonę komórkową lub hamowaniu replikacji i naprawy kwasów nukleinowych [7, 8].

Istotnym czynnikiem wpływającym na siłę i charakter oddziaływania związków na kwasy nukleinowe jest ich wypadkowy ładunek. Zarówno cząsteczki DNA, jak i RNA, jako polianiony silniej wiążą związki o wysokim ładunku dodatnim. Jednym

ze sposobów zwiększania wypadkowego ładunku związku jest utworzenie kompleksów z jonami metali [114]. Chelaty takie charakteryzują się nie tylko wyższym ładunkiem, ale bardzo często posiadają też odmienne właściwości fizykochemiczne, niż nieskompleksowane ligandy w tych samych warunkach. Poza strukturą i ładunkiem często drastycznej zmianie ulega także reaktywność, w tym zdolność do generowania RFT [115, 116]. W efekcie, badania kompleksów obfitują niejednokrotnie w znacząco większą liczbę oddziaływań niż badania samych ligandów [113, 117].

## PODZIĘKOWANIE

Publikacja finansowana ze środków przyznanych przez Narodowe Centrum Nauki ( grant nr 2014/13/B/ST5/04359).

## PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] R.A. Atae, M.H. Atae, A.M. Tavana, M. Salesi, *Int. J. Prev. Med.*, 2017, **8**, 16.
- [2] R. Gaynes, *Emerg. Infect. Dis.*, 2017, **23**, 849.
- [3] C.N. Kyriacos, R. Stephan, *J. Antibiot.*, 2018, **71**, 153.
- [4] C. Walsh, *Nat. Rev. Microbiol.*, 2003, **1**, 65.
- [5] G.A. Pankey, L.D. Sabath, *Clin. Infect. Dis.*, 2004, **38**, 864.
- [6] M. Chakroun, A. Chakroun, M. Hsairi, *Int. Arab. J. Antimicrob. Agents*, 2017, **7**, 1.
- [7] A. Zejc, M. Gorczyca, *Chemia leków*, Wyd. 3, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2009.
- [8] C. Walsh, *Nature*, 2000, **406**, 775.
- [9] A.L. Demain, S. Sanchez, *J. Antibiot.*, 2009, **62**, 5.
- [10] J.A. Bosso, *Pharmacotherapy*, 2005, **25**, 55S.
- [11] M.A. Fischbach, C.T. Walsh, *Chem. Rev.*, 2006, **106**, 3468.
- [12] Y. Li, Q. Xiang, Q. Zhang, Y. Huang, Z. Su, *Peptides*, 2012, **37**, 207.
- [13] R.D. Sussmuth, W. Wohlleben, *Appl Microbiol. Biot.*, 2004, **63**, 344.
- [14] R.E.W. Hancock, D.S. Chapple, *Antimicrob. Agents Ch.*, 1999, **43**, 1317.
- [15] M.A. Marahiel, *J. Pept. Sci.*, 2009, **15**, 799.
- [16] V. Teixeira, M.J. Feio, M. Bastos, *Prog. Lipid Res.*, 2012, **51**, 149.
- [17] T. Mascher, N.G. Margulis, T. Wang, R.W. Ye, J.D. Helmann, *Mol. Microbiol.*, 2003, **50**, 1591.
- [18] R.N. Jones, D.J. Biedenbach, D.M. Johnson, M.A. Pfaller, *J. Chemotherapy*, 2001, **13**, 244.
- [19] K.A. Sannes-Lowery, R.H. Griffey, S.A. Hofstadler, *Anal. Biochem.*, 2000, **280**, 264.
- [20] G. Thomas, *Medicinal Chemistry an Introduction*, Wyd. 2, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester 2009.
- [21] S.K. Straus, R.E.W. Hancock, *Biochim. Biophys. Acta*, 2006, **1758**, 1215.
- [22] S. Rasimus, R. Mikkola, M.A. Andersson, V.V. Teplova, N. Venediktova, C. Ek-Kommonen, M. Salkinoja-Salonen, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2012, **78**, 3732.
- [23] S. Ehala, V. Kasicka, E. Makrlik, *Electrophoresis*, 2008, **29**, 652.
- [24] D.A. Kelkar, A. Chattopadhyay, *BBA-Biomembranes*, 2007, **1768**, 2011.
- [25] T. Monshupanee, S.K. Johansen, A.E. Dahlberg, S. Douthwaite, *Mol. Microbiol.*, 2012, **85**, 1194.
- [26] R.E. Stanley, G. Blaha, R.L. Grodzicki, M.D. Strickler, T.A. Steitz, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2010, **17**, 289.

- [27] R. Akbergenov, D. Shcherbakov, T. Matt, S. Duscha, M. Meyer, D.N. Wilson, E.C. Bottger, *Antimicrob Agents Ch.*, 2011, **55**, 4712.
- [28] C.E. Maus, B.B. Plikaytis, T.M. Shinnick, *Antimicrob. Agents Ch.*, 2005, **49**, 3192.
- [29] A.P. Carter, W.M. Clemons, D.E. Brodersen, R.J. Morgan-Warren, B.T. Wimberly, V. Ramakrishnan, *Nature*, 2000, **407**, 340.
- [30] Q. Vicens, E. Westhof, *Chem. Biol.*, 2002, **9**, 747.
- [31] S.K. Johansen, C.E. Maus, B.B. Plikaytis, S. Douthwaite, *Mol. Cell*, 2006, **23**, 173.
- [32] J. Poehlsgaard, S. Douthwaite, *Nat. Rev. Microbiol.*, 2005, **3**, 870.
- [33] S. Rauf, J.J. Gooding, K. Akhtar, M.A. Ghauri, M. Rahman, M.A. Anwar, A.M. Khalid, *J. Pharmaceut. Biomed.*, 2005, **37**, 205.
- [34] C. Bendic, M. Enache, E. Volanschi, *J. Mol. Graph. Model.*, 2005, **24**, 10.
- [35] X. Zhou, Z. Shen, D. Li, X. He, B. Lin, *Talanta*, 2007, **72**, 561.
- [36] W. Du, L. Wang, J. Li, B. Wang, Z. Li, W. Fang, *Thermochim. Acta*, 2007, **452**, 31.
- [37] P. Colson, C. Bailly, C. Houssier, *Biophys. Chem.*, 1996, **58**, 125.
- [38] K.D. Goodwin, E.C. Long, M.M. Georgiadis, *Nucleic Acids Res.*, 2005, **33**, 4106.
- [39] G.L. Olsen, E.A. Louie, G.P. Drobny, S.T. Sigurdsson, *Nucleic Acids Res.*, 2003, **31**, 5084.
- [40] J. Lah, *Biochemistry*, 2000, **39**, 9317.
- [41] S.K. Sharma, M. Tandon, J.W. Lown, *J. Org. Chem.*, 2000, **65**, 1102.
- [42] N.V. Hud, M. Polak, *Curr. Opin. Struc. Biol.*, 2001, **11**, 293.
- [43] S.T. Hoehn, H.-D. Junker, R.C. Bunt, C.J. Turner, J. Stubbe, *Biochemistry*, 2001, **40**, 5894.
- [44] J. Stubbe, J.W. Kozarich, W. Wu, D.E. Vanderwall, *Accounts Chem. Res.*, 1996, **29**, 322.
- [45] K.D. Goodwin, M.A. Lewis, E.C. Long, M.M. Georgiadis, *P. Natl. Acad. Sci. USA*, 2008, **105**, 5052.
- [46] C. Bailly, A. Kenani, M.J. Waring, *Nucleic Acids Res.*, 1997, **25**, 1516.
- [47] S.M. Monro, K.M. Cottreau, C. Spencer, J.R. Wentzell, C.L. Graham, C.N. Borissow, D.L. Jakeman, S.A. McFarland, *Bioorgan. Med. Chem.*, 2011, **19**, 3357.
- [48] B.O. Okandjeji, D.M. Greenwald, J. Wroten, J.K. Sello, *Bioorgan. Med. Chem.*, 2011, **19**, 7679.
- [49] D. Talancon, C. Lopez, M. Font-Bardia, T. Calvet, J. Quirante, C. Calvis, R. Messeguer, R. Cortes, M. Cascante, L. Baldoma, J. Badia, *J. Inorg. Biochem.*, 2013, **118**, 1.
- [50] W.K. Purves, S. David, G.H. Orians, H.C. Heller, *Life: The Science of Biology*, Wyd. 6, Sinauer Associates, Inc., Gordonsville, Wirginia 2001.
- [51] P.P. Silva, W. Guerra, J.N. Silveira, A.M.D.C. Ferreira, T. Bortolotto, F.L. Fischer, H. Terenzi, A. Neves, E.C. Pereira-Maia, *Inorg. Chem.*, 2011, **50**, 6414.
- [52] S. Wang, T. Peng, F.C. Yang, *J. Electroanal. Chem.*, 2003, **544**, 87.
- [53] M. Kozurkova, D. Sabolova, L. Janovec, J. Mikes, J. Koval, J. Ungvarsky, M. Stefanisinova, P. Fedorocko, P. Kristian, J. Imrich, *Bioorgan. Med. Chem.*, 2008, **16**, 3976.
- [54] J. Plsikova, L. Janovec, J. Koval, J. Ungvarsky, J. Mikes, R. Jendzelovsky, P. Fedorocko, J. Imrich, P. Kristian, J. Kasparkova, V. Brabec, M. Kozurkova, *Eur. J. Med. Chem.*, 2012, **57**, 283.
- [55] G. Zhang, X. Hu, N. Zhao, W. Li, L. He, *Pestic. Biochem. Phys.*, 2010, **98**, 206.
- [56] B.K. Sahoo, K.S. Ghosh, R. Bera, S. Dasgupta, *Chem. Phys.*, 2008, **351**, 163.
- [57] Y. Lu, J. Lv, G. Zhang, G. Wang, Q. Liu, *Spectrochim. Acta A*, 2010, **75**, 1511.
- [58] S. Roy, R. Banerjee, M. Sarkar, *J. Inorg. Biochem.*, 2006, **100**, 1320.
- [59] L.-J. Ming, J.D. Epperson, *J. Inorg. Biochem.*, 2002, **91**, 46.
- [60] A.D. McNaught, A. Wilkinson, IUPAC. *Compendium of Chemical Terminology*, Drugie wydanie ("Gold Book"), Blackwell Scientific Publications, Oxford 1997.
- [61] D.M. Citron, C.V. Merriam, K.L. Tyrrell, Y.A. Warren, H. Fernandez, E.J.C. Goldstein, *Antimicrob. Agents Ch.*, 2003, **47**, 2334.
- [62] L.-J. Ming, J.D. Epperson, *J. Inorg. Biochem.*, 2002, **91**, 46.

- [63] A.M. Hempel, S. Cantlay, V. Molle, S.-B. Wang, M.J. Naldrett, J.L. Parker, D.M. Richards, Y.-G. Jung, M.J. Buttner, K. Flärth, P. Natl. Acad. Sci. USA, 2012, **109**, E2371.
- [64] L.C. Craig, W.F. Phillips, M. Burachik, Biochemistry, 1969, **8**, 2348.
- [65] N.W. Cornell, D.G. Guiney Jr., Biochem. Biophys. Res. Co., 1970, **40**, 530.
- [66] R.E. Wasylshen, M.R. Graham, Can. J. Biochem., 1975, **53**, 1250.
- [67] E.G. Seebauer, E.P. Duliba, D.A. Scogin, R.B. Gennis, R.L. Belford, J. Am. Chem. Soc., 1983, **105**, 4926.
- [68] J. Peisach, W.E. Blumberg, Arch. Biochem. Bioph., 1974, **165**, 691.
- [69] F. Drablos, D.G. Nicholson, M. Ronning, Biochim. Biophys. Acta, 1999, **1431**, 433.
- [70] F. Drablos, J. Comput. Chem., 2000, **21**, 1.
- [71] J. Gu, R. Codd, RSC Adv., 2015, **5**, 3443.
- [72] J.D. Bloss, J.A. Blessing, B.C. Behrens, R.S. Mannel, J.S. Rader, A.K. Sood, M. Markman, J. Benda, J. Clin. Oncol., 2002, **20**, 1832.
- [73] C. Xia, F.H. Forsteling, D.H. Petering, Biochemistry, 2003, **42**, 6559.
- [74] L. Ronconi, P.J. Sadler, Coord. Chem. Rev., 2007, **251**, 1633.
- [75] M. Sugiyama, T. Kumagai, J. Biosci. Bioeng., 2002, **93**, 105.
- [76] R.C. Brooks, P. Carnochan, J.F. Vollano, N.A. Powell, J. Zweit, J.K. Sosabowski, S. Martellucci, M.C. Darkes, S.P. Fricker, B.A. Murrer, Nucl. Med. Biol., 1999, **26**, 421.
- [77] M. Sugiyama, T. Kumagai, M. Hayashida, M. Maruyama, Y. Matoba, J. Biol. Chem., 2002, **277**, 2311.
- [78] K.E. Loeb, J.M. Zaleski, C.D. Hess, S.M. Hecht, E.I. Solomon, J. Am. Chem. Soc., 1998, **120**, 1249.
- [79] C. Xia, F.H. Forsterling, D.H. Petering, Biochemistry, 2003, **42**, 6559.
- [80] C. Lee, H. Won, J. Kor. Mag. Reson. Soc., 2007, **11**, 129.
- [81] E.C. Wasinger, L. Zaleski, B. Hedman, K.O. Hodgson, E.I. Solomon; J. Biol. Inorg. Chem., 2002, **7**, 157.
- [82] W. Wu, D.E. Vanderwall, C.J. Turner, S. Hoehn, J. Chen, J. W. Kozarich, J. Stubbe; Nucleic Acids Res., 2002, **30**, 4881.
- [83] A. Raja, J. LaBonte, J. Lebbos, P. Kirkpatrick, Nat. Rev. Drug Discov., 2003, **2**, 943.
- [84] F.P. Tally, M. Zeckel, M.M. Wasilewski, C. Carini, C.L. Berman, G.L. Drusano, F.B.J. Olseon, Expert Opin. Inv. Drug., 1999, **8**, 1222.
- [85] D. Jung, A. Rozek, M. Okon, R.E.W. Hancock, Chem. Biol., 2004, **11**, 949.
- [86] M.J. Rybak, E. Hershberger, T. Moldovan, R.G. Grucz, Antimicrob. Agents Ch., 2000, **44**, 1062.
- [87] A.L. Barry, P.C. Fuchs, Antimicrob. Agents Ch., 2001, **45**, 1919.
- [88] J.A. Silverman, N. Oliver, T. Andrew, T. Li, Antimicrob. Agents Ch., 2001, **45**, 1799.
- [89] P.J. Petersen, P.A. Bradford, W.J. Weiss, T.M. Murphy, P.E. Sum, S.J. Projan, Antimicrob. Agents Ch., 2002, **46**, 2595.
- [90] J.A. Silverman, N.G. Perlmutter, H.M. Shapiro, Antimicrob. Agents Ch., 2003, **47**, 2538.
- [91] D. Jung, A. Rozek, M. Okon, R.E.W. Hancock, Chem. Biol., 2004, **11**, 949.
- [92] Z. Hojati, C. Milne, B. Harvey, L. Gordon, M. Borg, F. Flett, B. Wilkinson, P.J. Sidebottom, B.A. Rudd, M.A. Hayes, C.P. Smith, J. Micklefield, Chem. Biol., 2002, **9**, 1175.
- [93] E. Vass, F. Besson, Z. Majer, L. Volpon, M. Hollosi, Biochem. Biophys. Res. Co., 2001, **282**, 361.
- [94] M. Rautenbach, P. Swarta, M. J. van der Merweb, Bioorg. Med. Chem., 2000, **8**, 2539.
- [95] C.-H. Jiang, Y. Chen, F. Yan, Z.-H. Fan, J.-H. Guo, Genome Announc., 2017, **5**, e00886.
- [96] J.M. David, A.K. Rajasekaran, J. Kidney Cancer VHL., 2015, **2**, 15.
- [97] B.A. Wallace, Annu. Rev. Biophys. Bio., 1990, **19**, 127.
- [98] Y. Chen, B.A. Wallace, Biophys. J., 1996, **71**, 163.
- [99] M.D. Ronghe, D. Murphy D., *Chemotherapy and Novel Cancer Targeted Therapies [w:] The Surgery of Childhood Tumors*, Carachi R., Grosfeld J. (Red.), Springer, Berlin, Heidelberg 2016.

- [100] L. Karawajew, E. N. Glibin, V.Y. Maleev, G. Czerwony, B. Dorken, D.B. Davies, A.N. Veselkov, *Anti-cancer Drug Des.*, 2000, **15**, 331.
- [101] M.M. Fishman, L.J. Rosenwasser, *Biochim. Biophys. Acta*, 1968, **166**, 584.
- [102] S. Wang, T.-Z. Peng, C.F. Yang, *J. Electroanal. Chem.*, 2003, **544**, 87.
- [103] W. Szczepanik, P. Kaczmarek, M. Jeżowska-Bojczuk, *J. Inorg. Biochem.*, 2004, **98**, 2141.
- [104] B. Ivanova, M. Spiteller, *Polyhedron*, 2012, **38**, 235.
- [105] M. Świątek, D. Valensin, C. Migliorini, E. Gaggelli, G. Valensin, M. Jeżowska-Bojczuk, *Dalton Trans.*, 2005, **23**, 3808.
- [106] M. Brzezowska, M. Kucharczyk-Klamińska, F. Bernardi, D. Valensin, N. Gaggelli, E. Gaggelli, G. Valensin, M. Jeżowska-Bojczuk, *J. Inorg. Biochem.*, 2010, **104**, 193.
- [107] M. Jeżowska-Bojczuk, K. Stokowa-Soltys, *Eur. J. Med. Chem.*, 2018, **143**, 997
- [108] F. Gasparrini, I. D'Acquarica, J.G. Vos, C.M. O'Connor, C. Villani, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2000, **11**, 3535.
- [109] M. Kucharczyk, M. Brzezowska, A. Maciąg, T. Lis, M. Jeżowska-Bojczuk, *J. Inorg. Biochem.*, 2008, **102**, 936.
- [110] G. Mohan, S. Kulshershta, P. Sharma, *Biol. Trace Elem. Res.*, 2006, **111**, 63.
- [111] M. Abbasi Nazari, F. Kobarfard, P. Tabarsi, J. Salamzadeh, *Biol. Trace Elem. Res.*, 2009, **128**, 161.
- [112] K. Stokowa, W. Szczepanik, N. Gaggelli, E. Gaggelli, G. Valensin, M. Jeżowska-Bojczuk, *J. Inorg. Biochem.*, 2012, **106**, 111.
- [113] K. Stokowa-Soltys, N. A. Barbosa, A. Kasprzewicz, R. Wieczorek, N. Gaggelli, E. Gaggelli, G. Valensin, J. Wrześciński, J. Ciesiołka, T. Kuliński, W. Szczepanik, M. Jeżowska-Bojczuk, *Dalton Trans.*, 2016, **45**, 8645.
- [114] M. Szafranec, K. Stokowa-Soltys, J. Nagaj, A. Kasprzewicz, J. Wrześciński, M. Jeżowska-Bojczuk, J. Ciesiołka, *Dalton Trans.*, 2012, **41**, 9728.
- [115] K. Stokowa-Soltys, M. Jeżowska-Bojczuk, *J. Inorg. Biochem.*, 2013, **127**, 73.
- [116] J. Nagaj, P. Kołkowska, A. Bykowska, U.K. Komarnicka, A. Kyzioł, M. Jeżowska-Bojczuk, *Med. Chem. Res.*, 2015, **24**, 115.
- [117] K. Stokowa-Soltys, A. Kasprzewicz, J. Wrześciński, J. Ciesiołka, N. Gaggelli, E. Gaggelli, G. Valensin, M. Jeżowska-Bojczuk, *J. Inorg. Biochem.*, 2015, **151**, 67.

Praca wpłynęła do Redakcji 14 lipca 2018

## MOLEKULARNE MATERIAŁY MAGNETYCZNE

## MOLECULAR MAGNETIC MATERIALS

**Marta Löffler\*, Amanda Gałkowska\*, Maria Korabik,  
Józef Utko, Tadeusz Lis**

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

*\*e-mail: [marta.loffler@chem.uni.wroc.pl](mailto:marta.loffler@chem.uni.wroc.pl), [amanda.galkowska@chem.uni.wroc.pl](mailto:amanda.galkowska@chem.uni.wroc.pl)*

---

*Pracę dedykujemy pamięci Pani Profesor Małgorzaty Jeżowskiej-Bojczuk*

---

Abstract

Zestawienie użytych skrótów i oznaczeń

Wstęp

1. Metodyka badań właściwości magnetycznych
2. Magnetyki i magnesy molekularne – charakterystyka
3. Zjawisko frustracji spinowej
4. Trójrzdzeniowe związki koordynacyjne z jonami dysprozu(III)

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane

---

---

**dr Marta Löffler** jest asystentem w Zespole Syntezy Organicznej na Wydziale Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego. Stopień magistra uzyskała w 2012 r., a stopień doktora w 2017 r., prowadząc badania pod kierunkiem dr hab. Marii Korabik, prof. UWr. Jej zainteresowania naukowe są związane głównie z syntezą nowych związków oraz z magnetyzmem molekularnym.

**mgr Amanda Gałkowska** ukończyła studia licencjackie w 2015 r. na Wydziale Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego, a tytuł magistra otrzymała na Wydziale Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego w 2017 roku. W tym samym roku rozpoczęła studia doktoranckie pod opieką dr hab. Marii Korabik, prof. UWr, w Zespole Nieorganicznej Chemii Supramolekularnej. Zajmuje się syntezą związków koordynacyjnych lantanowców oraz badaniem ich właściwości magnetycznych.

**dr hab. Maria Korabik, prof. UWr**, absolwentka Wydziału Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego. Stopień doktora otrzymała w 1993 r., stopień naukowy doktora hab. w 2012 r. Jej zainteresowania naukowe skupiają się wokół tematyki magnetyków i magnezów molekularnych. Jest członkiem Polskiego Towarzystwa Chemicznego. Od 2012 r. pełni funkcję kierownika Zakładu Dydaktyki Chemii na Wydziale Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego.

**dr hab. Józef Utko** ukończył studia w 1972 r. na Wydziale Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego. Stopień doktora nauk chemicznych uzyskał w 1984 r. na macierzystym Wydziale, a przewód habilitacyjny zakończył w 2012 r. Jego aktywność naukowa koncentruje się na syntezie związków koordynacyjnych, znajdujących potencjalne zastosowanie jako prekatalizatory, nośniki, aktywatory oraz składniki wykorzystywane podczas polimeryzacji olefin.

**prof. dr. hab. Tadeusz Lis**, emerytowany profesor na Wydziale Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego, zajmuje się krystalochemią renu i manganu.



---

**ABSTRACT**

The „molecular” term appears more and more often in the materials chemistry. The Nobel Prize in 2016 was awarded to Jean-Pierre Sauvage, Sir J. Fraser Stoddart and Bernard R. Feringa „for the design and synthesis of molecular machines”. Magnetism in molecular scale, also known as molecular nanomagnetism, has been developing intensively since the second half of the last century. This branch of science involves the magnetic properties of coordination compounds of d- and f-electron metals. The paper presents results of the magnetic studies of molecular magnets of copper(II) and dysprosium(III), which have been pursuing in two doctoral thesis. The compounds form trinuclear and triangular molecules. The spin frustration phenomenon observed in the triangular relationship of copper(II) has been described. Since dysprosium(III) ion is characterized by a large magnetic anisotropy, the triangular, trinuclear coordination compound of dysprosium(III) of the formula  $[\text{Dy}_3\text{L}_5\text{HLCl}_4]\cdot\text{HL}$  (where HL = 2-methoxyethanol) presents the characteristic properties of molecular magnets (SMMs) behavior. Two values of the energy barrier were determined as  $U_{\text{eff}}/k_B = 84,6$  K and 31,2 K with the corresponding relaxation times  $\tau_0 = 1,82\cdot 10^{-6}$  s and  $5,19\cdot 10^{-5}$  s. The data are probably attributed to different geometry of the coupled dysprosium ions.

**Keywords:** magnetism, crystal structure, molecular magnets (SMMs, SIM), spin frustration,

**Słowa kluczowe:** magnetyzm, struktura krystaliczna, magnesy molekularne (SMMs, SIM), frustracja spinowa

---

---

## WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

SMMs	– magnesy cząsteczkowe (ang. <i>Single Molecule Magnets</i> )
SCMs	– magnesy łańcuchowe (ang. <i>Single Chain Magnets</i> )
SIM	– magnes pojedynczych jonów (ang. <i>Single Ion Magnet</i> )
M.B.	– magneton Bohra, jednostka momentu magnetycznego
DC	– prąd stały (ang. <i>direct current</i> )
AC	– prąd zmienny (ang. <i>alternating current</i> )
$T_C$	– temperatura Curie, powyżej której ferromagnetyk traci swoje właściwości, stając się paramagnetykiem
$T_b$	– temperatura blokowania, powyżej której zanikają właściwości magnesów molekularnych
$k_B$	– stała Boltzmanna
$U_{eff}$	– bariera energetyczna przeorientowania spinu
$\tau$	– czas relaksacji w równaniu Arrheniusa
$\tau$	– parametr, indeks geometryczny, parametr strukturalny związany z symetrią wielokoordynacyjnych jonów metali

## WSTĘP

Właściwości magnetyczne, obserwowane w związkach koordynacyjnych metali *d*- i *f*-elektronowych, nazywa się magnetyzmem molekularnym [1] lub nanomagnetyzmem. Tematyka ta w ostatnich latach cieszy się bardzo dużym zainteresowaniem, z uwagi na poszukiwanie nowych, wielofunkcyjnych materiałów o właściwościach magnesów, charakteryzujących się tzw. „pamięcią magnetyczną”. Wyniki badań magnetycznych i spektroskopowych w korelacji ze strukturą krystaliczną oraz w połączeniu z obliczeniami teoretycznymi pozwalają na wnikliwą charakterystykę tych związków. Właściwości magnesów molekularnych można obserwować w izolowanych cząsteczkach zawierających pojedynczy jon paramagnetyczny (ang. *single ion magnet*, SIM), w układach – klastrach, sprzęgających kilka, a nawet kilkanaście i kilkadziesiąt jonów paramagnetycznych (ang. *single molecule magnets*, SMMs) oraz w polimerach koordynacyjnych (ang. *single chain magnets*, SCMs). Z uwagi na właściwości tych grup związków, zarówno z zakresu fizyki klasycznej jak i kwantowej, nazywa się je również, zamiennie, nanomagnesami molekularnymi. W materiałach molekularnych cząsteczki zachowują swoje indywidualne cechy, co stwarza możliwość projektowania materiałów o zadanych właściwościach.

Związki koordynacyjne zaliczane do klasy magnetyków molekularnych wykazują ogromną różnorodność pod względem motywów strukturalnych. Wykorzystując w ich syntezie różnorodne jony metali oraz organiczne lub nieorganiczne ligandy mostkujące, możliwe jest tworzenie związków od jednordzeniowych po wielordzeniowe klastery. Zarówno charakter, jak i siła oddziaływań magnetycznych w tego typu układach, zależy od rodzaju zastosowanych jonów metalu, ich wzajemnego ułożenia, ligandów mostkujących oraz wszelkich modyfikacji ich geometrii [2]. Magnetyki molekularne to związki zsyntezowane na drodze chemicznej, o różnej strukturze krystalicznej: od monomerów po związki dwu-, trój- i wielordzeniowe tworzące układy 0-wymiarowe, polimery łańcuchowe (1-D), układy dwu- (2-D) i trójwymiarowe (3-D), oraz supramolekularne struktury, dzięki obecności wiązań wodorowych. Choć z punktu widzenia zastosowań technologicznych tworzenie trójwymiarowych magnetyków molekularnych posiadających wysokie wartości temperatury Curie  $T_C$  jest najbardziej pożądane, materiały niżej wymiarowe (2D, 1D, 0D) również są przedmiotem zainteresowania. Nanomagnetyki molekularne, posiadające skończony wymiar, są szczególnie interesujące, ponieważ organizacja materii w skali *nano* jest złożona i umożliwia pojawienie się charakterystycznych właściwości magnetycznych, a z drugiej strony na tyle prosta, że możliwe jest dogłębne zbadanie mechanizmu oraz natury sprzężenia magnetycznego [3–6].

Celem niniejszego artykułu jest przedstawienie najnowszych doniesień tematyki magnetyzmu molekularnego. Badania w tej dziedzinie umożliwiają dostępne na wydziale dwa magnetometry Quatum Design, typu SQUID (MPMS3 i MPMS-XL-5). Uzyskane wyniki badań magnetycznych, ich interpretacja, wymagają dokładnej analizy strukturalnej i obliczeń teoretycznych.

Prezentowane wyniki są przeglądem badań własnych, m.in. publikacji prac doktorskich oraz najciekawszych zagadnień, wybranych z literatury, a dotyczących tematyki materiałów magnetycznych nowej generacji.

## 1. METODYKA BADAŃ WŁAŚCIWOŚCI MAGNETYCZNYCH.

Stosowaną obecnie najczęściej metodą badań magnetycznych jest metoda SQUID (ang. *Superconducting QUantum Interference Device* – nadprzewodzący interferometr kwantowy, magnetometr SQUID, system *MPMS* – *magnetic property measurement system*).

Urządzenie pozwala wyznaczać namagnesowanie próbki  $M$  w zakresie temperatur  $1,8 \div 300$  K, przy stałej, wybranej wartości pola magnetycznego, często  $H = 0,5$  T = 5000 Oe, (ang. *direct current*, DC) oraz namagnesowanie w polu magnetycznym przemiennym, (ang. *alternating current*, AC), gdzie częstość  $\nu$  zmian pola magnetycznego występuje w granicach 0,1–1500 Hz. Bardzo często badana jest także zależność namagnesowania próbki w funkcji natężenia pola magnetycznego o kierunku dodatnim lub ujemnym, w zakresie pola  $-5$  T  $\div$  5 T.

Badaniom poddaje się najczęściej próbkę proszkową związku o masie  $m$ . Z wyznaczonego namagnesowania można obliczyć podatność magnetyczną gramową –  $\chi_g$  i molową –  $\chi_m$  oraz efektywny moment magnetyczny –  $\mu_{eff}$  korzystając z następujących zależności:

$$\chi_g = \frac{M}{m \cdot H}, \chi_m^{corr} = \chi_g \cdot M_w - (\sum dia + N\alpha), \mu_{eff} = 2,8 \sqrt{\chi_m^{corr} T}$$

gdzie  $\chi_m^{corr}$  jest podatnością molową skorygowaną o diamagnetyzm poszczególnych atomów, jonów ( $\sum dia$ ) oraz o paramagnetyzm van Vlecka ( $N\alpha$ ) [5].

Badania DC są badaniami podstawowymi związku chemicznego, będącego magnetykiem molekularnym, pozwalającymi wyznaczyć efektywny moment magnetyczny cząsteczki związku chemicznego i jego zachowanie się wraz ze zmianą temperatury. Badanie w polu magnetycznym przemiennym AC, a także śledzenie zależności namagnesowania od pola magnetycznego pozwalają na określenie właściwości charakterystycznych dla magnesów molekularnych.

## 2. MAGNETYKI I MAGNESY MOLEKULARNE – CHARAKTERYSTYKA

Magnetykiem może być każda substancja, nawet mająca wszystkie elektrony sparowane. Zaliczamy ją wtedy do diamagnetyków, a pole magnetyczne, indukujące się w niej pod wpływem zewnętrznego pola magnetycznego, skierowane jest przeciwnie do przyłożonego pola. Obecność choćby jednego niesparowanego elektronu decyduje o paramagnetycznych właściwościach substancji. Obserwo-

wane właściwości magnetyczne związków koordynacyjnych metali przejściowych, zawierających więcej niż jeden paramagnetyczny jon metalu, różnią się od oczekiwanych sumarycznych efektów poszczególnych składników (jonów z niesparowanymi elektronami). Jest to spowodowane sprzężeniem spinów niesparowanych elektronów i określane jest oddziaływaniem antyferro- lub ferromagnetycznym [1]. Nośnikami momentów magnetycznych są najczęściej spiny elektronów orbitali *d*- bądź *f*-elektronowych jonów metali, ale mogą być też nimi rodniki. Oddziaływania antyferromagnetyczne powodują antyrównoległe porządkowanie spinów ( $\downarrow\uparrow$ ), natomiast oddziaływania ferromagnetyczne powodują porządkowanie się spinów niesparowanych elektronów równoległe ( $\uparrow\uparrow$ ) względem siebie, a efekt porządkowania widoczny jest w badanych, zależnych od temperatury, właściwościach magnetycznych. Oddziaływania w większości przypadków mają charakter nadwymienny, to znaczy zachodzą poprzez orbitale atomów mostkowych, stanowiących połączenia między paramagnetycznymi jonami.

Pojawienie się możliwości badania podatności magnetycznej zmiennoprądowej, zwanej też dynamiczną, w badaniach AC, pozwoliło na pełniejszą charakterystykę właściwości magnetycznych. W wyniku zmiany pola magnetycznego, układ w którym jest badana próbka poddana magnesowaniu, dąży do osiągnięcia nowego stanu z minimum energii. Następuje relaksacja magnetyczna, charakteryzowana czasem relaksacji  $\tau$ , która jest dowodem istnienia w układzie stanów oddzielonych barierami energetycznymi. Te bariery związane są z anizotropią magnetyczną (zależnością magnesowania się próbki od kierunku pola magnetycznego). Przy wyłączeniu pola występuje niezerowa wartość pozostałości magnetycznej. Badania w zmiennym polu magnetycznym, pozwalają wyznaczyć charakterystyczną dla danego układu wartość bariery energetycznej  $U_{eff}$  przeorientowania spinu oraz czas relaksacji  $\tau$ .

Podatność AC może być mierzona przy różnych częstościach (najczęściej 0,1–1500 Hz) i małej amplitudzie 3 Oe zmiennego pola magnetycznego. W badaniach AC rozróżnia się dwie składowe podatności: składową rzeczywistą  $\chi'$ , która pozostaje w fazie z polem (ang. *in phase*), i składową urojoną  $\chi''$ , która jest odpowiedzią próbki, przesuniętą w fazie o  $\pi/2$  (ang. *out-of-phase*).

Charakterystyczną cechą pozwalającą na zaliczenie magnetyka molekularnego do grupy magnesów molekularnych jest jego zdolność do zachowania namagnesowania po wyłączeniu zewnętrznego pola magnetycznego. Zachowanie to wynika z powolnej relaksacji namagnesowania w niskich temperaturach. Jej wynikiem jest obserwowana na wykresie zależności namagnesowania ( $M$ ) w funkcji natężenia pola ( $H$ ), pętla histerezy magnetycznej oraz obecność dodatkowej składowej podatności magnetycznej (składowej urojonej  $\chi''$ ) dla pomiarów w zmiennym (AC) polu magnetycznym. Składowa  $\chi''$  powinna wykazywać zależność od temperatury oraz od częstości przyłożonego pola magnetycznego [7, 8].

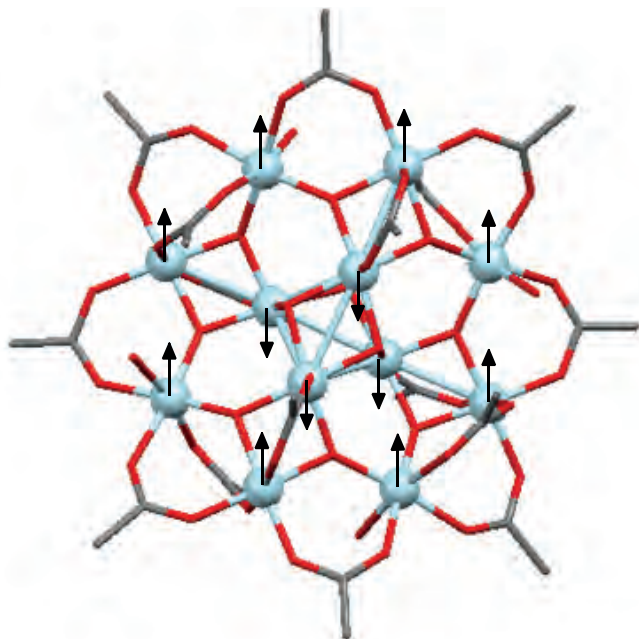
Niezależnie od jonu metalu, aby syntezowany związek koordynacyjny wykazywał zachowanie charakterystyczne dla magnesów molekularnych, muszą zostać spełnione następujące warunki wstępne [7–10]:

- podstawowy stan elektronowy musi być bistabilny – to znaczy: w tych samych warunkach może wykazywać dwa różne stany magnetyczne (np. paramagnetyzm i ferromagnetyzm),
- wartość momentu magnetycznego powinna być jak największa,
- w układzie powinna być obecna duża anizotropia magnetyczna, która stabilizuje dużą wartość momentu magnetycznego i jest odpowiedzialna za wysokość bariery energetycznej dla reorientacji spinu  $U_{eff}$

W przypadku magnesów molekularnych opartych o wielordzeniowe kompleksy metali *d*-elektronowych, dużą wartość momentu magnetycznego uzyskuje się dzięki ferri- lub ferromagnetycznemu sprzężeniu pomiędzy sąsiadującymi centrami paramagnetycznymi.

Intensywny rozwój dziedziny związanej z magnetyzmem molekularnym rozpoczął się w drugiej połowie XX wieku. Wtedy też zbadano właściwości magnetyczne słynnego klastra  $[\text{Mn}^{\text{IV}}_4\text{Mn}^{\text{III}}_8\text{O}_{12}(\text{MeCO}_2)_{16}(\text{H}_2\text{O})_4]$ , określanego również jako  $\text{Mn}_{12}$  [2, 10, 11].

Związek ten zawiera cztery jony Mn(IV) leżące wewnątrz klastra oraz osiem jonów Mn(III) tworzących zewnętrzną koronę (Rys. 1). Otrzymano go oraz scharakteryzowano strukturalnie już w 1980 roku [12].



Rysunek 1. Struktura molekularna  $[\text{Mn}^{\text{IV}}_4\text{Mn}^{\text{III}}_8\text{O}_{12}(\text{MeCO}_2)_{16}(\text{H}_2\text{O})_4]$  [13]  
 Figure 1. Molecular structure of  $[\text{Mn}^{\text{IV}}_4\text{Mn}^{\text{III}}_8\text{O}_{12}(\text{MeCO}_2)_{16}(\text{H}_2\text{O})_4]$  [13]

Choć zauważono jego interesujące właściwości magnetyczne, ze względu na ograniczenia w ówczesnej metodyce badań, właściwości magnetyczne klastrera  $Mn_{12}$  opisano dopiero w 1991 roku [14]. Dla  $Mn_{12}$  wyznaczono wartość spinowego stanu podstawowego  $S = 10$  oraz parametr rozszczepienia w zerowym polu magnetycznym  $D = -0,5 \text{ cm}^{-1}$ . Zaobserwowano również zależności składowej urojonej podatności magnetycznej  $\chi''$  od częstości pola. Zarejestrowana przez Gatteschiego, w 1993 roku, pętla histerezy namagnesowania związana z zachowaniem przez klastrer  $Mn_{12}$  swojego namagnesowani, nawet w nieobecności zewnętrznego pola magnetycznego, była dodatkowym potwierdzeniem bistabilności magnetycznej tego kompleksu [15]. Choć nie był to pierwszy przypadek, w którym tego typu zachowanie zaobserwowano na poziomie molekularnym, to po raz pierwszy było ono związane z pojedynczymi, izolowanymi molekułami  $Mn_{12}$  [2, 11]. To nietypowe, jak dotąd, zachowanie przypisano wysokiej wartości spinowego stanu podstawowego ( $S = 10$ ) oraz ujemnej wartości anizotropii ( $D = -0,5 \text{ cm}^{-1}$ ), wpływającym na wartość bariery energetycznej  $U_{\text{eff}}$  dla reorientacji spinów i powolną relaksację namagnesowania [2, 10]. Termin „magnes molekularny” (ang. *Single Molecule Magnet SMM*) pojawił się w literaturze po raz pierwszy w 1996 roku [16] i odnosił się do wszystkich kompleksów, które raz namagnesowane w zewnętrznym polu magnetycznym, były zdolne do zachowania swojego namagnesowania nawet po usunięciu pola [11].

Opisanie  $Mn_{12}$  zapoczątkowało nowy trend w syntezie związków koordynacyjnych, posiadających interesujące właściwości magnetyczne, i dało początek wielu rodzinom wielordzeniowych związków opartych zarówno o jony manganu jak i innych metali  $3d$ -elektronowych. Pierwsze próby syntezy magnesów molekularnych skupiały się na otrzymaniu wielordzeniowych związków jonów  $d$ -elektronowych z ferro- lub ferrimagnetycznymi oddziaływaniami pomiędzy jonami, w celu uzyskania możliwie największej wartości spinowego stanu podstawowego  $S$ , co było łatwiejsze do przewidzenia niż kontrola parametru anizotropii magnetycznej  $D$  [8, 10, 17]. Jednak, pomimo otrzymania wielu wielordzeniowych magnesów molekularnych posiadających wysokie wartości  $S$ , archetypowy klastrer  $Mn_{12}$  przez długi czas pozostawał rekordzistą w wysokości bariery energetycznej,  $U_{\text{eff}} = 42 \text{ cm}^{-1}$  ( $U_{\text{eff}}/k_B = 60,4 \text{ K}$ ). Uzyskiwane niewielkie wartości  $U_{\text{eff}}$  wynikały ze stosunkowo wysokiej symetrii otrzymywanych kompleksów, która powodowała wzajemne znoszenie się anizotropii poszczególnych centrów magnetycznych, a tym samym praktycznie całkowity zanik wypadkowej anizotropii molekuly. Stąd wniosek, że kluczowym czynnikiem przy projektowaniu efektywnych magnesów molekularnych jest anizotropia magnetyczna [2, 7, 8, 10].

Synteza związków posiadających dużą anizotropię magnetyczną jest dużo trudniejszym wyzwaniem, ponieważ wymaga ścisłej kontroli zarówno lokalnego otoczenia koordynacyjnego centrum paramagnetycznego jak i wzajemnego ułożenia osi anizotropii poszczególnych jonów tworzących wielordzeniowy układ. Jednym z rozwiązań okazały się jednordzeniowe związki metali z grupy  $3d$ -elektronowych, dla których obserwowano anizotropię magnetyczną, takich jak  $Co(II)$ ,  $Ni(II)$ ,

Mn(III) [2, 10]. Innym podejściem była synteza molekuł z wykorzystaniem metali  $4d$ - oraz  $5d$ -elektronowych, które charakteryzują się znacznie większą anizotropią magnetyczną, ze względu na ich silne sprzężenie spinowo-orbitalne. Niestety, silne rozszczepienie w polu krystalicznym obniża wartość stanu podstawowego  $M_S$ , w porównaniu do metali  $3d$ -elektronowych leżących w tej samej grupie [2]. W toku dalszych badań okazało się, że najbardziej pożądanymi kandydatami do tworzenia efektywnych magnesów molekularnych, posiadających dużą wartość bariery energetycznej są, pomijane początkowo, jony lantanowców. Wynika to z ich silnej anizotropii magnetycznej oraz dużego momentu magnetycznego i z silnego sprzężenia spin-orbita, które minimalizuje energię multipletu o największej wartości  $J$  [2, 7, 10].

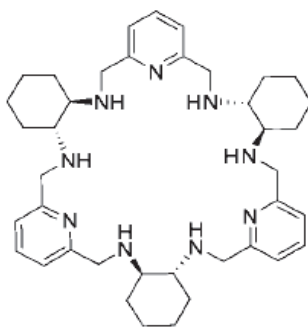
Pierwszymi magnesami molekularnymi opartymi o jony lantanowców były otrzymane przez Ishikawę w 2003 roku, kanapkowe związki  $[\text{LnPc}_2]\text{TBA}$  ( $\text{Ln} = \text{Tb}, \text{Dy}; \text{Pc} = \text{ftalocyjanina}$ ) [18]. Termin „kanapkowy” użyto z uwagi na podobieństwo struktury do kanapki. Płaska po obu stronach ftalocyjanina zamyka w centrum jeden jon lantanowca, od którego zależą właściwości magnetyczne związku. Uzyskana wartość bariery energetycznej  $U_{\text{eff}} = 230 \text{ cm}^{-1}$  ( $U_{\text{eff}}/k_B = 331 \text{ K}$ ) dla pochodnej zawierającej jon  $\text{Tb(III)}$ , znacznie przewyższała wartość  $U_{\text{eff}}$  dla  $\text{Mn}_{12}$ . Tak jak w przypadku wielordzeniowego klastra  $\text{Mn}_{12}$ , również ten jednordzeniowy związek z jonami lantanowców stał się pierwowzorem dla nowej klasy jednordzeniowych magnesów molekularnych – *SIMs* z jonami  $4f$ -elektronowymi. Badania w tej grupie związków doprowadziły do otrzymania w 2017 roku jednordzeniowego magnesu molekularnego z jonem  $\text{Dy(III)}$ , o wzorze  $[(\text{Cp}^{\text{t}})_2\text{DyCl}]$  ( $\text{Cp}^{\text{t}} = 1,2,4\text{-tri(tertbutylo)cyklopentadien}$ ), charakteryzującego się rekordową wartością bariery energetycznej  $U_{\text{eff}} = 1277 \text{ cm}^{-1}$  ( $U_{\text{eff}}/k_B = 1837 \text{ K}$ ) w zerowym polu magnetycznym, a także rekordową wartością temperatury blokowania  $T_b = 60 \text{ K}$  [19, 20]. Zestawienie omawianych właściwości, w oparciu o wyniki badań własnych, przedstawiono w dalszej części opracowania (Rys. 7, 8).

### 3. ZJAWISKO FRUSTRACJI SPINOWEJ

Interesujące zjawisko, nazwane frustracją spinową, zaobserwowano w trójrdzeniowych, trójkątnych związkach koordynacyjnych, w tym w grupie związków miedzi(II). Magnetyki molekularne oparte o jony  $\text{Cu(II)}$  stanowią bogatą klasę związków, bardzo dobrze opisaną w literaturze. Tworzą kompleksy jednordzeniowe, dwurdzeniowe i wielordzeniowe, w których miedź przyjmuje różne rodzaje koordynacji. Umożliwia to zaobserwowanie wszystkich rodzajów magnetyzmu [21, 22]. Dodatkowo, ze względu na obecność jednego niesparowanego elektronu dla jonów  $\text{Cu(II)}$  oraz znikomy udział momentu orbitalnego, możliwa jest dogłębna analiza uzyskanych właściwości magnetycznych syntezowanych kompleksów.

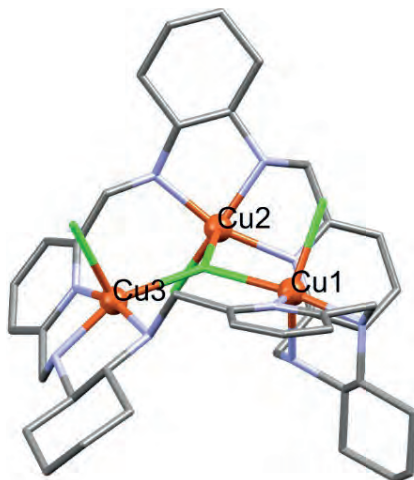
W trakcie prac nad rozprawą doktorską [13] otrzymano i zbadano trójrdzeniowy kompleks  $[\text{Cu}_3\text{L}_{\text{RRRRRR}}\text{Cl}_4]\text{Cl}_2 \cdot \text{CH}_3\text{CN} \cdot 7,5\text{H}_2\text{O}$  z makrocyklicznym ligandem aminowym  $\text{L}_1$ , typu 3+3 [23] o wzorze (Rys. 2):



Rysunek 2. Struktura liganda makrocyklicznego L<sub>1</sub> [13]Figure 2. The structural formula of the macrocyclic ligand L<sub>1</sub> [13]

Jest to pierwszy przypadek związku Cu(II), w którym trzy jony miedzi(II) są połączone w trójkątny układ jednym mostkiem chlorkowym, a oddziaływania magnetyczne pomiędzy jonami miedzi zachodzą jedynie przez centralny mostek  $\mu_3$ -Cl. Ze względu na zbyt długą ścieżkę oddziaływań, peryferyjny, makrocykliczny ligand, który utrzymuje rdzeń Cu<sub>3</sub>, nie uczestniczy w przekazywaniu oddziaływań magnetycznych. Aby w pełni wyjaśnić właściwości magnetyczne związku, przeanalizowano strukturę krystaliczną.

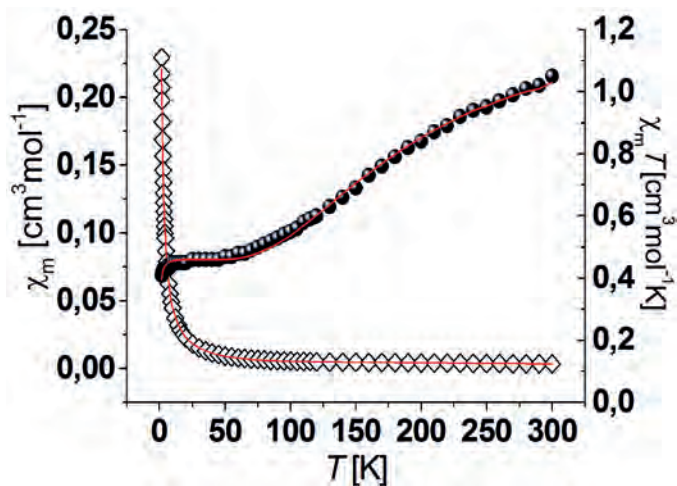
Związek ten krystalizuje w układzie rombowym, grupa przestrzenna  $P2_12_12_1$ . Obserwuje się tutaj bardzo silnie zniekształconą, nieregularną konformację makrocyklicznego liganda L<sub>RRRRRR</sub> typu siodłowego (ang. *saddle-type*). Jest ona wynikiem zarówno spiralnego skrętu, jak i znacznego pofałdowania makrocykla (Rys. 3).

Rysunek 3. Struktura molekularna [Cu<sub>3</sub>L<sub>RRRRRR</sub>Cl<sub>4</sub>]Cl<sub>2</sub>•CH<sub>3</sub>CN•7,5H<sub>2</sub>O [13]Figure 3. The molecular structure of [Cu<sub>3</sub>L<sub>RRRRRR</sub>Cl<sub>4</sub>]Cl<sub>2</sub>•CH<sub>3</sub>CN•7,5H<sub>2</sub>O [13]

Każdy z trzech jonów Cu(II) jest pięciokoordynacyjny, w związku z czym, do określenia geometrii, obliczono parametr  $\tau$  (tzw. indeks geometryczny) [24]. Przyj-

muje on odpowiednio wartości  $\tau = 0,59$  dla Cu1, wskazując na geometrię bipiramidy trygonalnej, oraz  $\tau = 0,19$  dla Cu2 i  $\tau = 0,15$  dla Cu3, wskazując – w przypadku tych dwóch jonów – na geometrię piramidy tetragonalnej. Rdzeń  $[\text{Cu}_3]$ , w którym odległości międzycząsteczkowe Cu1...Cu2, Cu2...Cu3 i Cu3...Cu1 wynoszą odpowiednio: 3,970(3), 4,424(2) oraz 4,358(2) Å, tworzy trójkąt różnoboczny, jednak może być rozpatrywany jako trójkąt równoramienny. Znajdujący się w środku makrocykla mostkujący atom chloru  $\mu_3\text{-Cl}$ , leży w odległości 0,30 Å powyżej płaszczyzny zdefiniowanej przez trzy jony Cu(II). W strukturze krystalicznej obecne są również międzycząsteczkowe wiązania wodorowe, powstające pomiędzy atomami azotu makrocyklicznego liganda a atomami chloru tworząc w ten sposób supramolekularną strukturę jednowymiarowego polimeru. Najkrótsza międzycząsteczkowa odległość pomiędzy dwoma jonami Cu(II) sąsiednich podjednostek makrocyklicznych wynosi 5,85 Å dla pary Cu1...Cu3'  $[-x+3/2, -y+1, z+1/2]$ .

Dla omawianego związku wykonano pomiary magnetyczne w stałym polu magnetycznym, zbadano zależność namagnesowania od temperatury w zakresie 1,8–300 K. Wartość  $\chi T = 1,05 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ K}$  w temperaturze pokojowej jest jedynie nieznacznie niższa niż spodziewana wartość  $1,2 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ K}$  dla trzech nieoddziałujących spinów o  $S = 1/2$ . W miarę obniżania temperatury, obserwuje się ciągły spadek  $\chi T$ , co jest charakterystyczne dla układów z przeważającym oddziaływaniem o charakterze antyferromagnetycznym, aż do wartości  $0,473 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ K}$  w 60 K (Rys. 4).

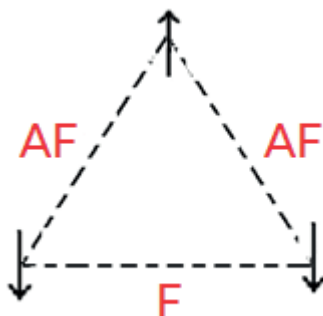


Rysunek 4. Wykres zależności  $\chi_m$  ( $\diamond$ ) oraz  $\chi_m T$  ( $\bullet$ ) w funkcji temperatury związku  $[\text{Cu}_3\text{L}_{\text{RRRRRR}}\text{Cl}_4]\text{Cl}_2 \cdot \text{CH}_3\text{CN} \cdot 7,5\text{H}_2\text{O}$ . Linia ciągła przedstawia najlepsze dopasowanie modelu teoretycznego do otrzymanych danych eksperymentalnych [13]

Figure 4. Temperature dependence of  $\chi_m$  ( $\diamond$ ) oraz  $\chi_m T$  ( $\bullet$ ) for  $[\text{Cu}_3\text{L}_{\text{RRRRRR}}\text{Cl}_4]\text{Cl}_2 \cdot \text{CH}_3\text{CN} \cdot 7,5\text{H}_2\text{O}$ . The solid line is the best fit calculation [13]

Poniżej tej temperatury na wykresie widoczne jest charakterystyczne *plateau* dla wartości  $\chi T \approx 0,4 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ K}$  wskazujące, że jedynie podstawowy stan duple-

towy (lub zdegenerowany stan dubletowy) jest obsadzony. Sytuacja ta jest wynikiem frustracji spinowej, pojawiającej się w momencie, gdy nie ma możliwości, aby wszystkie spiny  $S = \frac{1}{2}$  ustawiły się jednocześnie względem siebie antyrównolegle (Rys. 5) [1, 25, 26].



Rysunek 5. Schemat oddziaływań magnetycznych dla trójrdzeniowych układów obrazujący zjawisko frustracji spinowej

Figure 5. Scheme of magnetic interactions for three-core systems showing the phenomenon of spin frustration

W omawianym przykładzie różne otoczenie koordynacyjne jonów Cu(II) determinuje zarówno oddziaływania antyferromagnetyczne, jak i ferromagnetyczne. Jest to związane z innymi orbitalami magnetycznymi posiadającymi niesparowany elektron i biorącymi udział w oddziaływaniach magnetycznych pomiędzy poszczególnymi parami jonów Cu(II) [1]. Dodatkowo, delokalizacja spinu pomiędzy orbitalem p mostkującego liganda chlorkowego  $\mu_3$ -Cl, a orbitalami należącymi do jonów Cu(II), wnosi wkład zarówno w oddziaływania antyferromagnetyczne ( $J$ ), jak i ferromagnetyczne ( $j$ ). Poniżej 10 K następuje kolejny spadek wartości  $\chi T$ , wskazujący na występowanie dodatkowych oddziaływań antyferromagnetycznych. Są to międzycząsteczkowe oddziaływania antyferromagnetyczne zachodzące dzięki obecności międzycząsteczkowych wiązań wodorowych N-H...Cl, obecnych w strukturze krystalicznej. Analizując dane uzyskane z badań rentgenstrukturalnych oraz badań magnetycznych, zaproponowano model oddziaływań magnetycznych oparty o przybliżenie trójkąta równoramiennego. Uzyskane parametry oddziaływań magnetycznych wynoszą  $J = -85,6 \text{ cm}^{-1}$ ,  $j = 77,1 \text{ cm}^{-1}$ ,  $j' = 0,14 \text{ cm}^{-1}$ .

Do tej pory, w literaturze opisano wiele trójrdzeniowych związków Cu(II) [27–36]. W większości przypadków jony metalu leżą w wierzchołkach trójkąta równobocznego i są połączone przez centralny mostek  $\mu_3$ -OH lub  $\mu_3$ -O. Takie trójrdzeniowe, trójkątne połączenia Cu(II) można traktować jako układy geometrycznie spinowo sfrustrowane [30–32]. Dodatkowo, metaliczny rdzeń  $\text{Cu}_3$  wspierają peryferyjne mostki N–O z ugrupowań oksymowych lub mostki N–N z ugrupowań pirazolowych, które uczestniczą w silnym sprzężeniu antyferromagnetycznym pomiędzy jonami metalu, a tym samym w znacznym stopniu wpływają na właściwości magnetyczne całego układu. Przeprowadzona wielokrotnie korelacja magnetostrukturalna

dla kompleksów o rdzeniu  $\text{Cu}_3\text{-OH}$  [34–36] pozwoliła na ustalenie relacji pomiędzy sprzężeniem magnetycznym a czynnikami strukturalnymi. Wyniki te potwierdzono wykonując obliczenia oparte na teorii funkcjonału gęstości w połączeniu z podejściem złamanej symetrii (DFT-BS) [35, 37], gdzie wykorzystano mechanizm delokalizacji spinu. Analiza wyników doprowadziła do następujących wniosków:

- Głównym czynnikiem wpływającym na charakter sprzężenia spinowego dwóch centrów metalicznych w kompleksach z mostkami hydrokso-, alkokso- oraz fenokso- jest wartość kąta  $\text{Cu}-(\mu_3\text{-O})\text{-Cu}$ . Dla kątów większych niż  $97,5^\circ$  dominują oddziaływania antyferromagnetyczne [34, 36]. W przypadku kompleksów z mostkiem halogenkowym  $\text{Cu}-(\mu_3\text{-Cl})\text{-Cu}$ , charakter oddziaływania magnetycznego zmienia się z ferromagnetycznego na antyferromagnetyczny, przy wartościach kąta od  $76^\circ$  do  $120^\circ$  [35]. Potwierdzono również, że właściwości magnetyczne trójrzdzeniowych, trójkątnych systemów  $\text{Cu(II)}$  są znacznie bardziej czułe na zmianę wielkości kąta w przypadku mostkujących ligandów tlenkowych niż halogenkowych, co pozostaje w zgodzie z wynikami uzyskanymi dla dwurdzeniowych kompleksów  $\text{Cu(II)}$  [1, 35].
- Odległość atomu  $\mu_3\text{-O}$  od płaszczyzny zdefiniowanej przez trzy jony  $\text{Cu(II)}$  również wpływa w znacznym stopniu na antyferromagnetyczne oddziaływania pomiędzy centrami metalicznymi i wyraża się przez liniową zależność względem stałej nakładania  $J$ . Mniejsza odległość zapewnia silniejsze nakładanie o charakterze antyferromagnetycznym [28, 38]. Bardziej spłaszczony rdzeń  $\text{Cu}_3\text{-O(H)}$  faworyzuje silniejsze oddziaływania magnetyczne [39].

Rezultaty uzyskane dla związku  $[\text{Cu}_3\text{L}_{\text{RRRRRR}}\text{Cl}_4]\text{Cl}_2 \cdot \text{CH}_3\text{CN} \cdot 7,5\text{H}_2\text{O}$ , z metalicznym rdzeniem  $[\text{Cu}_3\text{Cl}]$  potwierdzają powyższe wnioski. Ponadto, po dokładnej analizie magnetyczno-strukturalnej tego związku koordynacyjnego, zaproponowano dodatkowy czynnik wpływający na siłę i naturę oddziaływań:

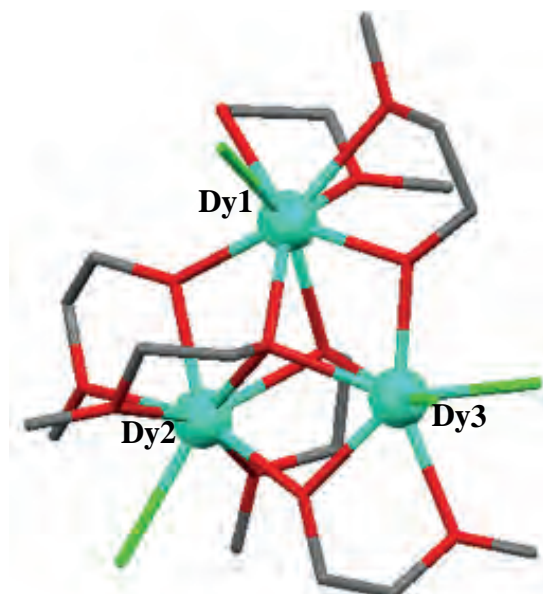
- Geometria koordynacyjna wokół jonu miedzi w istotny sposób wpływa na właściwości magnetyczne, bowiem determinuje typ orbitalu magnetycznego, a tym samym charakter oddziaływania [23].

#### 4. TRÓJRZDZENIOWE ZWIĄZKI KOORDYNACYJNE Z JONAMI DYSPROZU(III)

Trójrzdzeniowe, trójkątne związki kompleksowe zawierające jony f-elektronowe są również tematem szeroko rozwijanym, z uwagi na ich interesujące właściwości magnetyczne. Intensywnie badane są trójrzdzeniowe związki koordynacyjne dysprozu(III), ze względu na współistnienie powolnej relaksacji namagnesowania i prawie diamagnetycznego stanu podstawowego [40]. Pierwszym opublikowanym takim układem był związek koordynacyjny  $[\text{Dy}_3(\mu_3\text{-OH})_2\text{L}_3\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})_5]\text{Cl}_3$ , ( $\text{L} = o\text{-wanilina}$ ; 4-hydrokso-3-metoksybenzaldehyd), w którym jony dysprozu(III) są mostkowane

poprzez dwa mostki  $\mu_3$ -hydrokso wewnątrz trójkąta oraz trzy mostki  $\mu_3$ -fenokso wywodzące się z liganda, łączące zewnętrznie dwa kolejne jony dysprozu. Każdy z jonów dysprozu jest ośmiokoordynacyjny. Wyniki badań magnetycznych DC w niskiej temperaturze ujawniają istnienie niemal niemagnetycznego stanu podstawowego, o czym świadczy spadek momentu magnetycznego prawie do wartości 0 M.B. w temperaturze 1,8 K. W badaniach AC obserwowano silną zależność od częstości, a wyznaczona bariera energetyczna wyniosła  $U_{eff}/k_B = 61,7$  K.

W ramach realizacji kolejnej pracy doktorskiej [41] otrzymano, przedstawiony na rysunku poniżej, trójdzeniowy, trójkątny kompleks Dy(III), oznaczony jako  $[Dy_3]$  [Rys. 6].

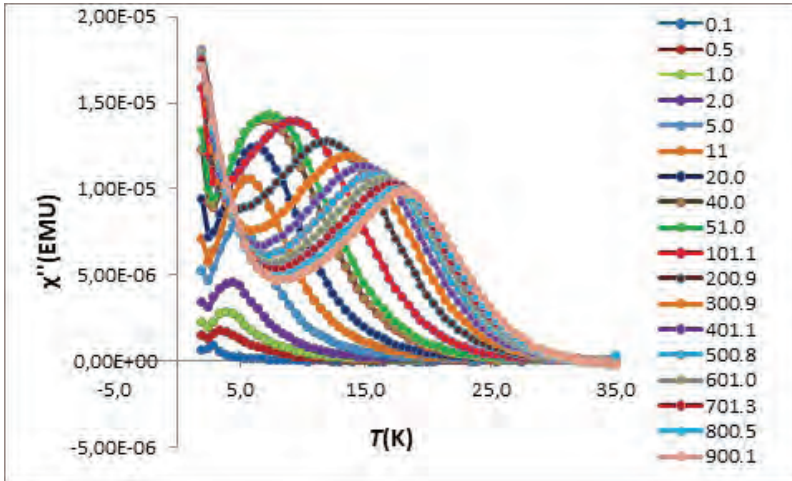


Rysunek 6. Struktura molekularna kompleksu  $[Dy_3]$   
Figure 6. Molecular structure of  $[Dy_3]$

Związek ten krystalizuje w układzie jednoskośnym (grupa przestrzenna  $C2/c$ ) z 8 cząsteczkami  $[Dy_3]$  w komórce elementarnej. Otoczenie koordynacyjne jonów centralnych stanowią: 5 zdeprotonowanych cząsteczek 2-metoksyetanolu, 1 cząsteczka 2-metoksyetanolu oraz 4 ligandy chlorkowe. Dwa jony dysprozu(III) (Dy1 i Dy2) posiadają bardzo podobną geometrię i są ośmiokoordynacyjne, natomiast trzeci z nich (Dy3) jest siedmiokoordynacyjny.

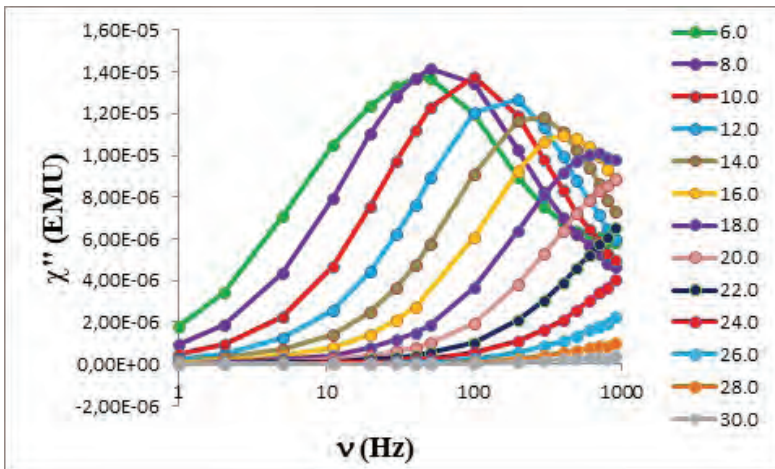
Atomy tlenu z ugrupowań eterowych pełnią zarówno funkcje chelatujące, jak i mostkujące. Występują dwa mostki  $\mu_3$ -O, stanowiące centralne połączenie pomiędzy wszystkimi jonami dysprozu(III) występującymi w związku koordynacyjnym. Po zewnętrznych stronach krawędzi wyznaczanych poprzez trójkątny układ znajdują się trzy mostki  $\mu_2$ -O łączące sąsiadujące ze sobą jony dysprozu(III). Wykonano

badania *DC* i *AC* związku i stwierdzono w zerowym polu magnetycznym zachowanie charakterystyczne dla magnesów molekularnych *SMMs*. W zależności temperaturowej składowej podatności urojonej  $\chi''$  obserwuje się charakterystyczne maksima w zakresie temperatur 2–25 K. Dla każdej częstotliwości poniżej 30 K krzywa  $\chi''$  jest przesunięta w fazie. Na Rysunku 7 widoczne są dwa regiony o nieco innym zachowaniu, poniżej 10 K i w zakresie 10–30 K.



Rysunek 7. Zależność temperaturowa zależności  $\chi''$  dla  $[Dy_3]$  w zakresie częstotliwości 0,1–900 Hz  
Figure 7. Temperature dependence of  $[Dy_3]$  in the frequency range 0,1–900 Hz

Przesunięcie w fazie obserwuje się również w przebiegu zależności  $\chi''$  od częstotliwości [Rys. 8].



Rysunek 8. Zależność  $\chi''$  od częstotliwości dla  $[Dy_3]$ , w zakresie temperatur 6–30 K  
Figure 8. Frequency dependence of  $[Dy_3]$ , in the temperature range 6–30 K

Występowanie maksimów wskazuje na relaksację spinów przez barierę energetyczną. Na rysunku temperaturowej zależności widoczne są dwa regiony relaksacji o nieco innym zachowaniu, poniżej 10 K i w zakresie 10–30 K. Czas relaksacji namagnesowania i wartość bariery energetycznej zostały wyekstrahowane z maksimów  $\chi''$ , z zastosowaniem modelu Debye'a w oparciu o równanie Arrheniusa [11]:

$$\tau = \tau_0 \exp\left(\frac{U_{eff}}{k_B T}\right)$$

Otrzymano dwie wartości bariery energetycznej  $U_{eff}/k_B = 84,6$  K i 31,2 K z odpowiadającymi im czasami relaksacji  $\tau_0 = 1,82 \cdot 10^{-6}$  i  $5,19 \cdot 10^{-5}$  s. Analiza struktury krystalicznej pozwala wnioskować, że może być to wynikiem dwóch różnych sfer koordynacji wokół jonów dysprozu, widocznych w strukturze.

Podobną sytuację i dwie wartości bariery energetycznej  $U_{eff}/k_B = 42,6$  K i 90,9 K obserwowano w trójrzdzeniowym kompleksie  $[\text{Dy}_3(\text{HL})(\text{H}_2\text{L})(\text{NO}_3)_4] \cdot \text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ , ( $\text{H}_4\text{L} = \text{N,N,N',N'}$ -tetrakis(2-hydroksyetylo)-etylenodiamina) [40]. Trzy jony dysprozu(III) były podwójnie mostkowane przez dwa  $\mu_3$ -O pochodzące ze zdeprotonowanych grup hydroksylowych ligandów, tworząc układ trójkątny. Jednakże obserwowano różnice strukturalne: jedna para jonów dysprozu(III) nie była mostkowana poprzez  $\mu_2$ -O, co skutkowało pojawieniem się układu pseudo-równoramiennego trójkąta. Autorzy tej pracy sugerowali, że obserwowane co najmniej dwa różne mechanizmy relaksacji są wynikiem nieliniowości spinów, wynikającej z różnic strukturalnych poszczególnych jonów dysprozu [42].

## PODSUMOWANIE

Przedstawione w pracy wyniki badań magnetycznych stanowią treść dwóch prac doktorskich [13, 41]. Odnoszą się do intensywnie rozwijającej się w ostatnich latach dziedziny magnetyzmu molekularnego. W pracy zamieszczono wyniki badań trójrzdzeniowego, trójkątnego związku koordynacyjnego Cu(II) z makrocyklicznym, chiralnym ligandem aminowym [13]. Związek jest przykładem magnetyka molekularnego, który wykazuje zjawisko frustracji spinowej. Połączenie trójkątne jonów dysprozu(III), który dodatkowo charakteryzuje się anizotropią magnetyczną, skutkuje występowaniem właściwości charakterystycznych dla magnesów molekularnych. Przedstawiony trójrzdzeniowy, trójkątny związek koordynacyjny Dy(III) jest magnesem molekularnym (ang. *single molecule magnets*, SMMs). Zamieszczone wyniki badań zwracają też uwagę na korelację magnetyczno-strukturalną, niezbędną do wyjaśnienia obserwowanych właściwości magnetycznych.

## PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] O. Kahn, *Molecular Magnetism*, VCV Publishers, New York 1993.
- [2] *Molecular Magnetic Materials. Concepts and Applications*, B. Sieklucka, D. Pinkowicz (Red.), Wiley-VCH, Weinheim 2017.
- [3] M.M. Turnbull, T. Sugimoto, L.K. Thompson, *Molecule-Based Magnetic Materials*, Am.Chem.Soc. ACS Symposium Series, 1996.
- [4] J.S. Miller, Chem. Soc. Rev., 2011, **40**, 3266.
- [5] J.J. Nova, M. Deumal, J. Jornet-Somoza., Chem. Soc. Rev., 2011, **40**, 3182.
- [6] D. Gatteschi, R. Sessoli, J. Villain, *Molecular Nanomagnets*, Oxford University Press, 2006.
- [7] C. Benelli, D. Gatteschi, *Introduction to Molecular Magnetism. From Transition Metals to Lanthanides*, Wiley-VCH, 2015.
- [8] H.L.C. Feltham, S. Brooker, Coord. Chem. Rev., 2014, **276**, 1.
- [9] D.N. Woodruff, R.E.P. Winpenny, R.A. Layfield, Chem. Rev., 2013, **113**, 5110.
- [10] J. Tang, P. Zhang, *Lanthanide Single Molecule Magnets*, Springer, 2015.
- [11] C.J. Milios, R.E.P. Winpenny, *Molecular Nanomagnets and Related Phenomena*, Springer, 2015.
- [12] T. Lis, Acta Cryst. B., 1980, **36**, 2042.
- [13] M. Löffler, praca doktorska, „Magnetyki molekularne wybranych metali d i f-elektronowych z chiralnym aminowym ligandem makrocyclicznym”, Wrocław 2017.
- [14] A. Caneschi, D. Gatteschi, R. Sessoli, A. L. Barra, L. C. Brunel, M. Guillot, J. Am. Chem. Soc., 1991, **113**, 5873.
- [15] R. Sessoli, D. Gatteschi, A. Caneschi, M.A. Novak, Nature, 1993, **365**, 141.
- [16] S.M.J. Aubin, M.W. Wemple, D.M. Adams, H.L. Tsai, G. Christou, D.N. Hendrickson, J. Am. Chem. Soc., 1996, **118**, 7746.
- [17] Y.S. Meng, S.D. Jiang, B.W. Wang, S. Gao, Acc. Chem. Res., 2016, **49**, 2381.
- [18] N. Ishikawa, M. Sugita, T. Ishikawa, S. Koshihara, Y. Kaizu, J. Am. Chem. Soc., 2003, **125**, 8694.
- [19] F.S. Guo, B.M. Day, Y.C. Chen, M.L. Tong, A. Mansikkamäki, R.A. Layfield, Angew. Chem. Int. Ed., 2017, **56**, 11445.
- [20] M.J. Giansiracusa, E. Moreno-Pineda, R. Hussain, R. Marx, M. Martínez Prada, P. Neugebauer, S. Al-Badran, D. Collison, F. Tuna, J. van Slageren, S. Carretta, T. Guidi, E.J.L. McInnes, R.E.P. Winpenny, N.F. Chilton, J. Am. Chem. Soc., 2018, **140**, 2504.
- [21] D. Valigura, J. Moncol, M. Korabik, Z. Půčeková, T. Lis, J. Mroziński, M. Melník, Eur. J. Inorg. Chem., 2006, 3813.
- [22] D. Valigura, M. Melník, M. Koman, L. Martiška, M. Korabik, J. Mroziński, T. Głowiak, Polyhedron, 2004, **23**, 2447.
- [23] M. Löffler, J. Gregolinski, M. Korabik, T. Lis, J. Lisowski, Dalton Trans., 2016, **45**, 15586.
- [24] A.W. Addison, T.N. Rao, J. Reedijk, J. van Rijn, G.C. Verschoor, J. Chem. Soc., Dalton Trans., 1984, 1349.
- [25] L.K. Das, M.G.B. Drew, C. Diaz, A. Ghosh, Dalton Trans., 2014, **43**, 7589.
- [26] M.U. Anwar, L.K. Thompson, L.N. Dawe, Dalton Trans., 2011, **40**, 1437.
- [27] M.J. Kobyłka, J. Janczak, T. Lis, T. Kowalik-Jankowska, J. Kłak, M. Pietruszka, J. Lisowski, Dalton Trans., 2012, **41**, 1503.
- [28] T. Afrati, C. Dendrinou-Samara, C. Raptopoulou, A. Terzis, V. Tangoulis, A. Tsipis, D.P. Kessissoglou, Inorg. Chem., 2008, **47**, 7545.
- [29] J. Yoon, E.I. Solomon, Inorg. Chem., 2005, **44**, 8076.
- [30] S. Ferrer, F. Lloret, I. Bertomeu, G. Alzuet, J. Borrás, S. García-Granda, M.Z. Liu-González, J.G. Haasnoot, Inorg. Chem., 2002, **41**, 5821.



- [31] S. Ferrer, F. Lloret, E. Pardo, J. M. Clemente-Juan, M. Liu-González, S. García-Granda, *Inorg. Chem.*, 2012, **51**, 985.
- [32] D. Maity, P. Mukherjee, A. Ghosh, M.G.B. Drew, C. Diaz, G. Mukhopadhyay, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2010, 807.
- [33] R. Boca, L. Dlhán, G. Mezei, T. Ortiz-Pérez, R.G. Raptis, J. Telser, *Inorg. Chem.*, 2003, **42**, 5801.
- [34] L.K. Das, M.G.B. Drew, C. Diaz, A. Ghosh, *Dalton Trans.*, 2014, **43**, 7589.
- [35] L.L. Wang, Y.M. Sun, Z.Y. Yu, Z.N. Qi, Ch. B. Liu, *J. Phys. Chem. A*, 2009, **113**, 10534.
- [36] E. Ruiz, P. Alemany, S. Alvarez, J. Cano, *J. Am. Chem. Soc.*, 1997, **119**, 1297.
- [37] W. Canon-Mancisidor, E. Spodine, V. Paredes-Garcia, D. Venegas-Yazigi, *J. Mol. Model*, 2013, **19**, 2835.
- [38] R. Ishikawa, M. Nakano, A. Fuyuhiko, T. Takeuchi, S. Kimura, T. Kashiwagi, M. Hagiwara, K. Kindo, S. Kaizaki, S. Kawata, *Chem.-Eur. J.*, 2010, **16**, 11139.
- [39] R.J. Butchner, C.J. O'Connor, E. Sinn, *Inorg. Chem.*, 1981, **20**, 537.
- [40] J. Tang, I. Hewitt, N. T. Madhu, G. Chastanet, W. Wernsdorfer, C.E. Anson, C. Benelli, R. Sessoli, A. K. Powell, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2006, **45**, 1729.
- [41] A. Gałkowska, M. Korabik, T. Lis, J. Utko, 61 Zjazd PTChem, 17-21.09.2018, Kraków, *Materiały Zjazdowe*.
- [42] Y.X. Wang, W. Shi, H. Li, Y. Song, L. Fang, Y. Lan, A.K. Powell, W. Wernsdorfer, L. Ungur, L.F. Chibotaru, M. Shen, P. Cheng, *Chem. Sci.*, 2012, **12**, 3366.

Praca wpłynęła do Redakcji 6 lipca 2018



**ANTYBIOTYKI FLUROCHINOLONOWE  
I ICH MODYFIKACJE STRUKTURALNE**

FLUROQUINOLONE ANTIBIOTICS  
AND THEIR STRUCTURAL MODIFICATIONS

**Urszula K. Komarnicka\*, Paulina K. Walencik,  
Monika K. Lesiów, Katarzyna Krupa**

*Wydział Chemii, Uniwersytet Wrocławski  
ul. F. Joliot-Curie 14, 50-383 Wrocław  
\*e-mail: urszula.komarnicka@chem.uni.wroc.pl*

---

*Pracę dedykujemy pamięci Pani Profesor Małgorzaty Jeżowskiej-Bojczuk*

---

Abstract

Wprowadzenie

1. Generacje fluorochinolonów
2. Mechanizm działania
3. Zależność pomiędzy aktywnością a strukturą chinolonów
4. Lomefloksacyna i sparfloksacyna – właściwości biologiczne
5. Zjawisko lekooporności
6. Modyfikacje strukturalne fluorochinolonów
7. Organiczne pochodne chinolonów
8. Kompleksy chinolonów z jonami metali
  - 8.1. Właściwości przeciwbakteryjne
  - 8.2. Właściwości przeciwnowotworowe

Podziękowanie

Piśmiennictwo cytowane

---

**dr Urszula Katarzyna Komarnicka** w roku 2016 obroniła pracę doktorską pt. „Nowe kompleksy miedzi(I) z diiminami i fosfinową pochodną sparfloksacyny: właściwości fizykochemiczne i biologiczne”, otrzymując tytuł doktora nauk chemicznych. Obecnie pracuje na Wydziale Chemii UW, gdzie przede wszystkim syntetyzuje nowe substancje o właściwościach cytotoksycznych. Ponadto zajmuje się badaniem selektywnego transportu cytostatyków do komórek nowotworowych oraz zagadnieniami związanymi z wyjaśnieniem procesów kancerogenezy jelita grubego. Jej zainteresowania naukowe skupiają się wokół chemii medycznej oraz bionieorganicznej.

**mgr Paulina Katarzyna Walencik** jest doktorantką na Wydziale Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego. W 2012 roku ukończyła studia licencjackie wśród 5% najlepszych absolwentów UW, a 2 lata później studia magisterskie w ramach Indywidualnego Programu Studiów na tej samej uczelni. Główny nurt jej zainteresowań badawczych stanowi chemia bionieorganiczna. Ważnym uzupełnieniem badań mgr Walencik jest analiza aktywności redoks związków kompleksowych oraz wpływ tej aktywności na wolnorodnikowe mechanizmy kancerogenezy oraz neurodegeneracji.

**mgr Monika Katarzyna Lesiów** w latach 2010–2015 studiowała na Wydziale Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego, uzyskując w 2015 roku tytuł magistra. Obecnie doktorantka stacjonarnych studiów doktoranckich Chemii na Wydziale Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego. Jej zainteresowania naukowe skupiają się wokół chemii bionieorganicznej oraz medycznej.

**mgr Katarzyna Krupa** w latach 2010–2015 studiowała na Wydziale Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego uzyskując w 2015 roku tytuł magistra. Obecnie jest doktorantką stacjonarnych studiów doktoranckich chemii na Wydziale Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego. Jej zainteresowania naukowe skupiają się wokół biologicznej chemii nieorganicznej.

## ABSTRACT

The quinolones are synthetic antibiotics derived from nalidixic acid. Chemical modification of basic structure (nalidixic acid) has led to the development of a group of various compounds currently used in medicine. This article discusses the generation of quinolones, mode of their action, and relationship between activity and structure of these antibiotics. The most common quinolones, lomefloxacin and sparfloxacin were discussed in details, also the therapeutic potential of newer agents was reviewed.

Recently, understanding of how molecular modifications among quinolone core structure can affect antimicrobial and anticancer activities has progressed rapidly. In this paper we discussed few examples of fluoroquinolone structural modifications. It was proved that many organic and inorganic compounds derived from fluoroquinolones overcame bacterial drug-resistance. Furthermore, chemical modification improved fluoroquinolone's anticancer activities.

Keywords: fluoroquinolone antibiotics, complexes, structural modifications, sparfloxacin, lomefloxacin, antibacterial and anticancer properties

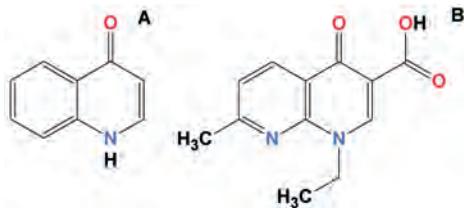
Słowa kluczowe: antybiotyki fluorochinolonowe, modyfikacje strukturalne, sparfloksacyna, lomefloksacyna, właściwości przeciwbakteryjne i przeciwnowotworowe

---

---

## WPROWADZENIE

Chinolony są klasą syntetycznych antybiotyków o działaniu przeciwbakteryjnym, charakteryzujących się szerokim spektrum działania [1–5]. Ta grupa antybiotyków to nie tylko użyteczne leki przeciwbakteryjne, ale także substancje stosowane w leczeniu malarii. Są także związkami wywołującymi efekty immunomodulujące i przeciwnowotworowe [6–8]. Struktura tych terapeutyków oparta jest na motywie 4-okso-1,4-dihydrochinolinowym (Rys. 1A). Pierwszym chinolonem, stosowanym w leczeniu klinicznym był kwas nalidyksowy (Rys. 1B) [9].

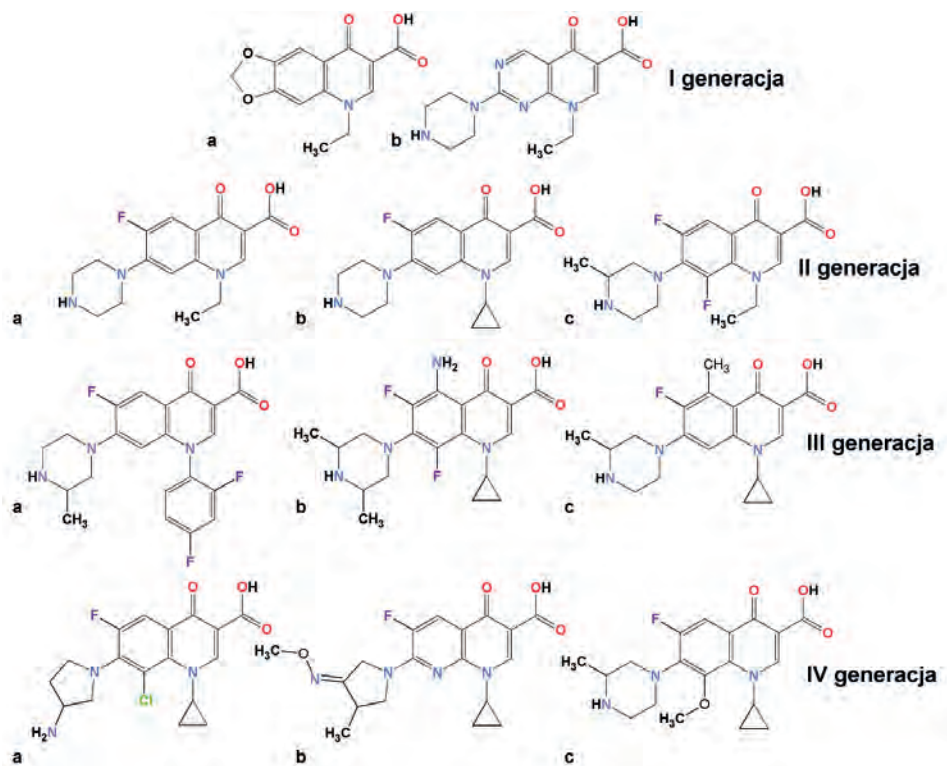


Rysunek 1. (A) Motyw 4-okso-1,4-dihydrochinolinowy, (B) cchemat struktury kwasu nalidyksowego  
Figure 1. (A) The 4-okso-1,4-dihydroquinoline motif, (B) the scheme of nalidixic acid structure

Kwas nalidyksowy odkryto w 1962 roku [9, 10]. Był aktywny wobec bakterii Gram-ujemnych, jednakże jego zastosowanie zostało ograniczone, ze względu na duże powinowactwo do białek osocza (90%), a także krótki czas półtrwania (1,5 h) [2, 11]. W związku z tym, cząsteczka tego kwasu została poddana różnorodnym modyfikacjom strukturalnym [9–13]. Przekształcenie szkieletu chinolonowego (Rys. 1) polegało na dołączaniu do niego różnorodnych atomów, takich jak fluor, azot, tlen czy chlor, w celu zwiększania jego właściwości biologicznych. Motyw 4-okso-1,4-dihydrochinolinowy został dodatkowo poddany modyfikacjom przez wprowadzanie do struktury m.in. (I) cząsteczki piperazyny, (II) podstawników metylowych (w różnych pozycjach) oraz (III) łańcuchów węglowych o różnych długościach [2,10]. Dołączenie atomu fluoru do cząsteczki chinolonu okazało się zabiegiem najefektywniejszym, poprawiającym nie tylko jego aktywność przeciwbakteryjną, ale przede wszystkim zwiększającym zakres jego działania. W ten sposób powstała klasa nowych antybiotyków, nazwana fluorochinolonami. Grupa ta charakteryzuje się wysoką aktywnością antybakteryjną względem szerokiego spektrum drobnoustrojów i zmniejszoną toksycznością wobec komórek zdrowych. Ten nowy typ antybiotyków odznacza się wyjątkową skutecznością w walce z lekoopornymi szczepami bakterii [10, 14–16]. Ponadto, chinolony są obecnie jedną z najbardziej różnorodnych i najczęściej stosowanych klas antybiotyków [17].

## 1. GENERACJE ANTYBIOTYKÓW CHINOLONOWYCH

Chinolony zostały podzielone na cztery różne generacje (Rys. 2), a klasyfikacja ta została dokonana na podstawie ich profilu farmakokinetycznego oraz aktywności antymikrobowej [17–21].



Rysunek 2. Cztery generacje wybranych antybiotyków chinolonowych: I generacja: (a) kwas oksolinowy, (b) kwas pipemidynowy; II generacja: (a) norfloksacyna, (b) ciprofloksacyna; (c) lomefloksacyna; III generacja: (a) temafloksacyna, (b) sparfloksacyna, (c) grepafloksacyna; IV generacja: (a) gemifloksacyna, (b) klinafloksacyna, (c) gatifloksacyna

Figure 2. The four-generation classification of the quinolone antibiotics: I generation: (a) oxolinic acid, (b) pipemidic acid; II generation: (a) norfloxacin, (b) ciprofloxacin; (c) lomefloxacin; III generation: (a) temafloxacin, (b) sparfloxacin, (c) grepafloxacin; IV generation: (a) gemifloxacin, (b) clinafloxacin, (c) gatifloxacin

W pierwszej generacji (Rys. 2) znajdują się związki aktywne względem bakterii Gram-ujemnych. Leki tej grupy odznaczają się krótkimi czasami półtrwania oraz wysokim powinowactwem do protein, co oznacza, że ich stężenie we krwi i tkankach jest bardzo małe [10, 17, 22–24]. Antybiotyki II generacji (Rys. 2) są również aktywne przeciwko bakteriom Gram-ujemnym, jednakże ich aktywność jest już znacznie wyższa niż leków poprzedniej generacji.

Związki te mają znacznie dłuższy czas półtrwania i nieco słabiej wiążą się z białkami, co sprawia, że ich stężenie we krwi jest wyraźnie większe [17, 20, 21, 25].

Stale wzrastająca oporność bakteryjna na różne antybiotyki wymusiła dalsze modyfikacje strukturalne chinolonów, prowadząc w konsekwencji do utworzenia nowych generacji leków. Do trzeciej generacji antybiotyków (Rys. 2) zalicza się związki aktywne wobec bakterii Gram-ujemnych i Gram-dodatnich. Ich profil farmakokinetyczny jest taki sam, jak w przypadku leków drugiej generacji [19–21]. Z kolei czwarta generacja antybiotyków to związki o najsilniejszych właściwościach przeciwbakteryjnych zarówno wobec bakterii Gram-ujemnych, jak i Gram-dodatnich. Leki z tej grupy są także aktywne wobec bakterii beztlenowych oraz atopowych. Stosuje się je dodatkowo w leczeniu infekcji układu pokarmowego [10, 17, 19–21, 25].

## 2. MECHANIZM DZIAŁANIA

Mechanizm działania antybiotyków chinolonowych polega na hamowaniu replikacji DNA bakterii, co w konsekwencji doprowadza do śmierci drobnoustroju [2, 26]. Chinolony hamują działanie dwóch najważniejszych dla bakterii enzymów (topoizomeraz): gyrazy DNA (tzw. topoizomeraza II) oraz topoizomerazy IV [25–29]. Gyraza DNA składa się z dwóch podjednostek zakodowanych jako GyrA oraz GyrB i jest odpowiedzialna za wprowadzanie ujemnych skrętów w helisie DNA. Topoizomeraza IV składa się natomiast z czterech podjednostek: dwóch ParC oraz dwóch ParE. Funkcja tego enzymu oparta jest na separacji komplementarnych nici DNA [30–32]. Chinolony mają zdolność oddziaływania z kompleksem DNA-enzym. Tworzą przy tym ternarny kompleks DNA-enzym-lek, który blokuje procesy replikacji DNA [2, 26–29].

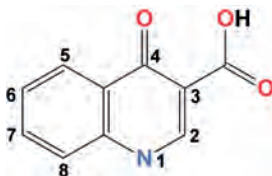
## 3. ZALEŻNOŚĆ POMIĘDZY AKTYWNOŚCIĄ A STRUKTURĄ CHINOLONÓW

Generacje chinolonów, ich farmakokinetyka oraz zmieniająca się aktywność przeciwbakteryjna jest ściśle uzależniona od ich struktury chemicznej [3,4,33]. Zrozumienie, w jaki sposób modyfikacje strukturalne szkieletu chinolonowego (Rys. 3) warunkują właściwości antybakteryjne jego pochodnych, jest obiektem nieustannych badań [3, 33–36].

Obecnie wiadomo, że podstawienie w pozycji 1 molekuly antybiotyku (Rys. 3) małych podstawników o charakterze hydrofobowym prowadzi do otrzymania leków o najwyższej aktywności. Do wspomnianych podstawników zalicza się m.in. podstawnik etylowy, oraz też cyklopropylowy. Z kolei dołączenie ugrupowań większych i hydrofilowych znacznie obniża aktywność przeciwbakteryjną otrzymanych związków [37, 38]. Pozycje 2, 3 i 4 cząsteczki chinolonu (Rys. 3) znajdują się w bliskim



sąsiedztwie miejsca wiążącego lek do kompleksu DNA-enzym. Dlatego też uważa się, że substytucja w tych obszarach blokuje dostęp terapeutyka do DNA, a tym samym znacznie obniża aktywność przeciwbakteryjną całej molekuly. Do tej pory nie odnotowano żadnej grup podstawników, które będąc w tych pozycjach szkieletu chinolonowego, zwiększyłyby aktywność leku [39, 40].



Rysunek 3. Szkielet struktury antybiotyków chinolonowych wraz z numeracją atomów (pozycji), które mogą być okupowane przez podstawniki

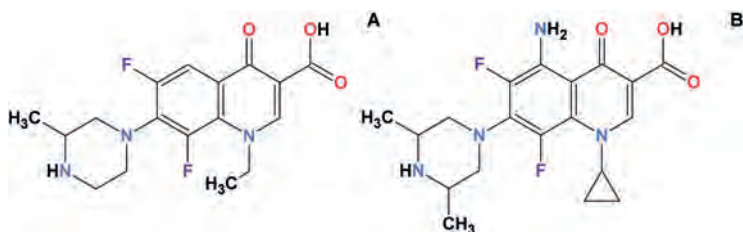
Figure 3. The core structure of the quinolone antibiotics, the substituent positions are indicated by numbers

Zmiana podstawnika w pozycji 5 może powodować reorganizację konfiguracji przestrzennej molekuly, która ma znaczny wpływ na ogólną aktywność chinolonu. Wprowadzenie takich grup, jak metylowa, etylowa lub hydroksylowa w pozycję 5, powoduje selektywny wzrost aktywności leku wobec bakterii Gram-dodatnich [3, 33]. Antybiotyki, które w swojej strukturze posiadają atom fluoru w pozycji 6 charakteryzują się z kolei zwiększoną ogólną aktywnością przeciwbakteryjną. Co ciekawe, najlepsze efekty zauważa się, gdy w tej samej cząsteczce leku substytucja została przeprowadzona jednocześnie w obu pozycjach. Przykładowo, pochodna leku, w której atom fluoru przyłączony został w pozycji 6 i sąsiaduje z grupą aminową okupującą pozycję 5, wykazuje kilkunastokrotnie wyższą aktywność biologiczną niż cząsteczka, w której pozycja 5 pozostaje niepodstawiona [3, 4, 33, 41]. W obrębie całej struktury chinolonu najistotniejszym fragmentem jest bezsprzecznie pozycja 7. Podstawniki przyłączone w tym obszarze są bezpośrednio odpowiedzialne za oddziaływanie z gyrazą. Aby wzmocnić interakcję na poziomie lek – enzym, w pozycję 7 wprowadza się głównie ugrupowania zawierające pięcio- lub sześcioczłonowe pierścienie heterocykliczne. Przykładowo, przyłączenie w tym miejscu pierścienia piperazyny, zwiększa aktywność antymikrobiologiczną względem bakterii Gram-ujemnych [42–44]. Modyfikacje strukturalne w pozycji 8, podobnie jak te w pozycji 5, utożsamiane są z reorganizacją przestrzenną leku. Obecność atomu fluoru lub chloru w tym miejscu poprawia znacznie aktywność związku wobec bakterii beztlenowych i Gram-dodatnich. Dodatkowo, zastąpienie atomu węgla budującego pierścień aromatyczny w pozycji 8 atomem azotu, znacznie zwiększa ogólną aktywność przeciwbakteryjną otrzymanej pochodnej [3, 4, 33, 41].

Zrozumienie zależności pomiędzy aktywnością farmaceutyczną a strukturą chemiczną związków opartych na szkielecie chinolonu pozwoliło na otrzymanie wielu powszechnie stosowanych terapeutyków. Dodatkowo wiedza ta stanowi cenny punkt wyjścia do świadomego i racjonalnego projektowania nowych, bezpiecznych i efektywnych farmaceutyków lub modyfikacji tych już istniejących.

### 3.1. LOMEFLOKSACYNA I SPARFLOKSACYNA – WŁAŚCIWOŚCI BIOLOGICZNE

Relację pomiędzy strukturą a aktywnością biologiczną chinolonów przedstawić można najlepiej, porównując dwa powszechnie wykorzystywane leki: lomefloksacynę (**HLm**) oraz sparfloksacynę (**HSf**) (Rys. 4). Lomefloksacyna należy do drugiej generacji chinolonów, natomiast sparfloksacyna zaliczana jest do trzeciej, co przekłada się oczywiście na ich zróżnicowaną aktywność przeciwbakteryjną. Pod względem budowy chemicznej oba te związki różnią się między sobą trzema zasadniczymi fragmentami strukturalnymi (Rys. 4). W cząsteczce **HLm** do pierścienia piperazyny dołączona została jedna grupa metylowa, w porównaniu do molekuly **HSf**, gdzie w pierścieniu znajduje się jeszcze jedno, takie samo ugrupowanie. Dodatkowo, w pozycji 5 cząsteczki sparfloksacyny (Rys. 4) znajduje się grupa aminowa, gdzie w strukturze **HLm** miejsce to pozostaje niepodstawione. Co więcej, oba te leki różnią się typem podstawnika w pozycji 1 (Rys. 4), w cząsteczce **HSf** jest to grupa cyklopropylova, natomiast w molekule **HLm** grupa etylowa. Antybiotyk **HSf** posiada zatem wszystkie te podstawniki, które warunkują znacznie lepsze właściwości przeciwbakteryjne, zgodnie z tym, co zostało opisane uprzednio.



Rysunek 4. Schematy struktur (A) lomefloksacyny oraz (B) sparfloksacyny  
Figure 4. The scheme of (A) lomefloxacin and (B) sparfloxacin structures

Lomefloksacyna (**HLm**) jest antybiotykiem o szerokim spektrum działania przeciw bakteriom Gram-ujemnym i Gram-dodatnim [45]. Stosuje się ją w leczeniu przewlekłego zapalenia oskrzeli oraz różnorodnych infekcji dróg moczowych [46, 47]. W Polsce antybiotyk ten jest substancją czynną preparatu „Oksacin”. Stosowany jest on w leczeniu bakteryjnych infekcji spojówek. **HLm** znajduje się również w preparacie o nazwie „Lofoks” stosowanym między innymi przy zakażeniach bakteryjnych układu moczowego, pokarmowego oraz oddechowego.

Sparfloksacyna (**HSf**) charakteryzuje się znacznie wyższą aktywnością przeciwbakteryjną niż lomefloksacyna. Jest antybiotykiem o szerokim zakresie działania, również wobec obu typu bakterii (Gram-dodatnich i Gram-ujemnych). W szczególności **HSf** aktywna jest wobec patogenów, takich jak *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *S. maltophilia* oraz *S. ureus* – głównej przyczyny poszpitalnych zapaleń płuc [48]. **HSf** jest substancją czynną znajdującą się w preparacie „Zagam”. Stosowany jest on przede wszystkim w przypadku zapalenia płuc i zakażenia bakterią *Chlamydia pneumoniae*. Co ciekawe, sparfloksacyna jest bardzo dobrym środkiem modulu-

jącym w połączeniu z lekami wykazującymi właściwości przeciwnowotworowe. Dowiedziono, że **Hsf** hamuje aktywność hERG – kanału potasowego, istotnego w procesie proliferacji komórkowej. Kanał ten ulega nadekspresji w wielu rodzajach nowotworów, w tym między innymi raka jelita grubego [49].

Chociaż oba te antybiotyki zarówno lomefloksacyna, jak i sparfloksacyna są powszechnie używane, to niestety na przestrzeni ostatnich kilkunastu lat obserwuje się znaczny spadek ich skuteczności. Jako przyczynę tego zjawiska wymienia się nabytą przez drobnoustroje tzw. lekooporność [50, 51].

#### 4. ZJAWISKO LEKOOPORNOŚCI

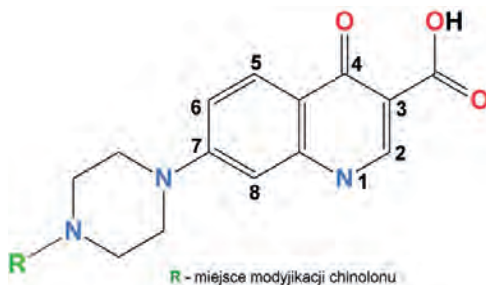
Popularność i częste stosowanie antybiotykoterapii doprowadziło do zwiększenia oporności bakterii na środki przeciwdrobnoustrojowe [2, 5, 26, 52]. Bakterie wykształciły różnorodne systemy oporności, które powodują, że antybiotykoterapia powoli staje się nieskuteczna. Światowa Organizacja Zdrowia (*ang. World Health Organization, WHO*) stale alarmuje o wzrastającym problemie lekooporności, który obecnie jest jednym z najniebezpieczniejszych problemów farmakologicznych [50, 51]. Oporność bakterii na fluorochinolony związana jest zazwyczaj z mutacją docelowych enzymów bakterii (gyraza DNA, topizomeraza IV), a także obecnością w komórkach drobnoustrojów pomp odpowiedzialnych za wyrzut antybiotyków poza organizm patogenu (tzw. system *efflux*) [53–59]. Oporność na chinolony może być również powiązana pośrednio z aktywnością plazmidu bakteryjnego, kodującego białko Qnr. Chociaż białko to ekspresjonowane jest w małym stopniu, to jego rola w ukształtowaniu bakteryjnej lekooporności wydaje się kluczowa. Zgodnie z doniesieniami literaturowymi, Qnr zapobiega związaniu chinolonów do topoizomeraz, zapewniając jednocześnie ich ciągłą aktywność w procesach replikacji materiału genetycznego [60–63].

#### 5. MODYFIKACJE STRUKTURALNE FLUOROCHINOLONÓW

Zadaniem współczesnego świata nauki jest skonstruowanie terapeutyku, o odmiennym mechanizmie działania, niż wszystkie otrzymane do tej pory leki, na które drobnoustroje wykształciły już swoistą oporność. Projektowanie i synteza nowych substancji terapeutycznych są jednak bardzo czasochłonne i kosztowne. Wprowadzenie nowego leku na rynek trwa, co najmniej 10 lat, a koszty mogą sięgać milionów dolarów [64–67]. Coraz częściej, zamiast poszukiwać nowych klas związków leczniczych, preferuje się zupełnie inne podejście. Bardzo popularne staje się modyfikowanie struktury wykorzystywanego już na rynku leku przez dołączanie do niego ugrupowań warunkujących selektywny transport substancji aktywnej lub zmieniających jej właściwości biologiczne [68–70].

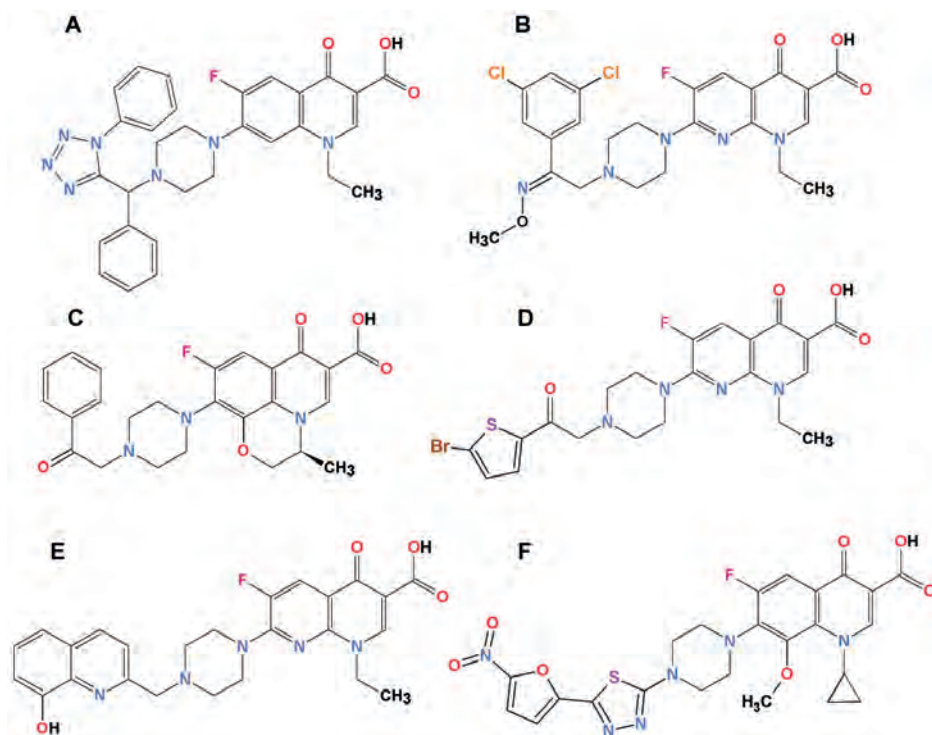
## 5.1. ORGANICZNE POCHODNE CHINOLONÓW

W ciągu kilku lat zaobserwowano wzrost liczby organicznych pochodnych chinolonów. W tym przypadku najczęstszymi modyfikacjami strukturalnymi ulega drugorzędowy atom azotu pierścienia piperazyny antybiotyku (Rys. 5) [24, 45, 54, 56, 67].



Rysunek 5. Schemat struktury antybiotyku chinolonowego z miejscem modyfikacji na pierścieniu piperazyny  
Figure 5. The scheme of the quinolone drug with marked position of the structural modification within a piperazine ring

Otrzymano szereg tetrazolowych pochodnych norfloksacyny, spośród których jedna przedstawiona jest na Rysunku 6A. Wszystkie te pochodne zbadane zostały wobec różnych opornych szczepów bakterii *S. aureus*. W efekcie kilka organicznych pochodnych (między innymi związek przedstawiony na Rysunku 6A) wykazywało odpowiednio wyższe właściwości przeciwbakteryjne niż sam wyjściowy lek. Wartości MIC (*ang. minimal inhibitory concentration*, minimalne stężenie hamujące wzrost szczepu bakteryjnego) dla pochodnych znajdowały się w przedziale 0,78–3,12 mg/mL, gdy dla wolnego leku wartość ta wynosiła MIC = 25 mg/mL [67]. W innym podejściu, modyfikacja strukturalna norfloksacyny oparta była na przyłączeniu motywów zawierających dodatkowe podstawniki: 2-okso-2-feniloetylowego lub 2-hydroksymino-2-feniloetylowego. Aktywność wszystkich otrzymanych w ten sposób substancji została przetestowana przeciwko wieloopornym szczepom *S. aureus* oraz szczepom *S. epidermidis*, *B. subtilis*, *E. coli*, *K. pneumoniae* i *P. aeruginosa*. W większości badanych przypadków nie zaobserwowano jednak pożądanego wzrostu aktywności biologicznej. Jedynie pochodna przedstawiona na Rysunku 6B odznaczała się dwukrotnie wyższą aktywnością wobec *E. coli*, niż wolny lek [67].



Rysunek 6. Schematy struktur antybiotyków fluorochinolonowych  
 Figure 6. The schemes of fluoroquinolone antibiotics structures

Modyfikacji strukturalnej została poddana również cząsteczka lewofloksacyliny przez dołączenie do atomu azotu pierścienia piperazyny takich motywów, jak 2-arylo-2-oksoetylowy (Rys. 6C), a także 2-arylo-2-oksoiminoetylowy. Pochodne te szczególnie aktywne były wobec bakterii Gram-dodatnich, a szczegółowym badaniom poddane zostały szczepy kliniczne *S. aureus*, *S. epidermidis*, *B. subtilis*, *E. faecalis*, *S. marcescens*, *E. coli*, *K. pneumoniae* a także *S. typhi*. Badania wykazały, że związki z motywem strukturalnym 2-arylo-2-oksoetylowym (Rys. 6C) wykazują znaczną poprawę właściwości przeciwbakteryjnych wobec *S. epidermidis* oraz *B. subtilis* [58].

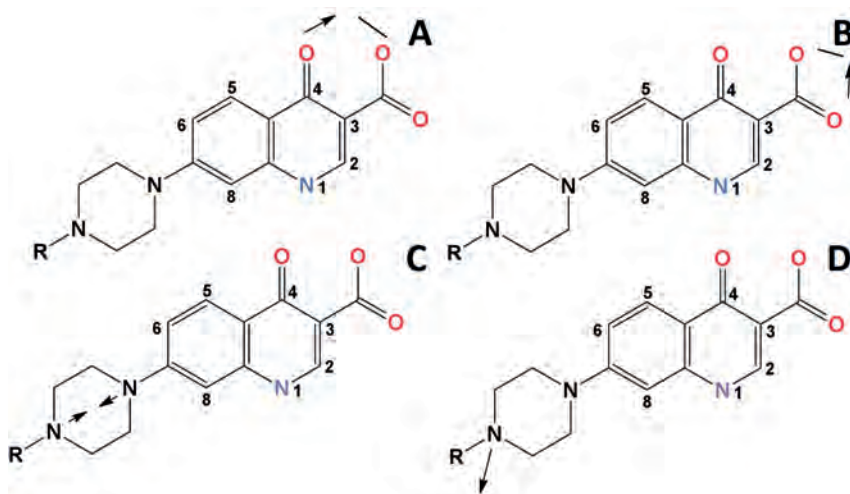
Kolejny eksperyment, w którym cząsteczka norfloksacyliny została zmodyfikowana przez dodanie do jej struktury pochodnych motywów: *N*-[2-(5-bromotiofen-2-yl)-2-oksoetylowego] (Rys. 6D) oraz *N*-[2-(5-bromotiofen-2-yl)-2-oksoiminoetylowego] potwierdził wysoki potencjał antymikrobowy pochodnych organicznych, głównie wobec bakterii Gram-dodatnich. Otrzymane związki wykazywały dwukrotnie wyższą aktywność wobec takich szczepów, jak *S. aureus*, *S. epidermidis* oraz *B. Subtilis*, w porównaniu do wyjściowych antybiotyków: ciprofloksacyliny czy norfloksacyliny [12, 17, 34, 67]. Co ciekawe, cząsteczka norfloksacyliny zmodyfikowana w sposób przedstawiony na Rysunku 6E charakteryzuje się wyjątkowo wysoką

aktywnością wobec *M. tuberculosis*, szczepu odpowiedzialnego za gruźlicę [25, 45, 57, 68].

Gatifloksacyna poddana modyfikacji poprzez dołączenie od niej motywu nitroarylo-1,3,4-tio diazoluowego (Rys. 6F), została przetestowana wobec szczepów takich bakterii, jak: *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. pneumonia*, *B. subtilis*, *E. faecalis*, *M. luteus*, *E. coli*, *S. typhi*, *S. flexneri*, *K. pneumonia*, *S. marcescens* i *P. aeruginosa*. Otrzymane wyniki jednoznacznie wskazały, że otrzymana pochodna (Rys. 6F) jest kilkakrotnie bardziej aktywna niż wolny lek wobec *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. pneumonia* i *B. subtilis* [24, 35, 47, 56, 68].

## 5.2. KOMPLEKSY CHINOLONÓW Z JONAMI METALI

Skoordynowanie różnorodnych jonów metali do cząsteczki leku to obecnie jedna z najpopularniejszych metod projektowania lub modyfikacji związków o znaczeniu farmakologicznym [45, 56, 66]. Medyczna chemia nieorganiczna daje dodatkowe możliwości podczas projektowania nowych leków [13, 24, 35, 56, 69]. Szeroki zakres liczb koordynacyjnych, możliwych geometrii i konfiguracji przestrzennych, dostępność różnorodnych stanów redox, zmiana stopni utlenienia, labilność, zróżnicowana kinetyka i termodynamika układów, to tylko kilka z wielu właściwości związków koordynacyjnych. Do tego należy jeszcze dodać biodystrybucję oraz naturalną homeostazę metali. Wszystko to sprawia, że modyfikacje oparte na związaniu jonów metali przez organiczny lek, mogą w konsekwencji prowadzić do powstania związków o ciekawym mechanizmie działania i interesującym profilu farmakokinetycznym [5, 46, 56, 58, 65, 68].

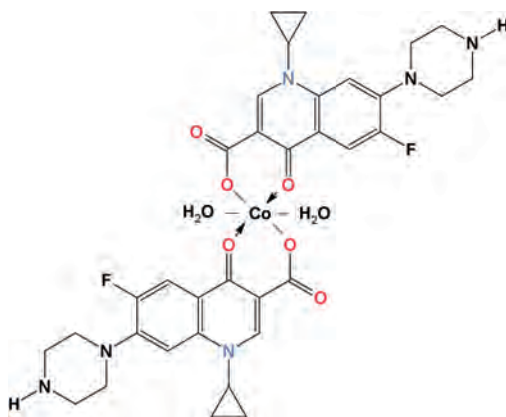


Rysunek 7. Główne sposoby koordynacji jonów metali do cząsteczek chinolonów  
Figure 7. The main coordination patterns of metal complexes with quinolones

Chinolony stanowią grupę ligandów jedno- lub dwukleszczowych (Rys. 7). Najczęściej jony metali, skoordynowane są do cząsteczki leku poprzez zdeprotonowany atom tlenu grupy karboksylowej i atom tlenu grupy karbonylowej (Rys. 7A). Rzadziej występują kompleksy, w których jon metalu związany jest jednocześnie przez oba tleny grupy karboksylowej (Rys. 7B) lub przez dwa atomy azotu pierścienia piperazyny (Rys. 7C). Znane są również kompleksy chinolonów, w których jon metalu skoordynowany jest przez dwie cząsteczki leków (kompleksy bis), a w ich związaniu uczestniczą atomy azotu pierścienia piperazyny obu molekuł.

### 5.2.1. Właściwości przeciwbakteryjne

Analiza właściwości przeciwbakteryjnych kompleksów chinolonów z jonami metali jest zagadnieniem dosyć szeroko opisywanym w literaturze naukowej. W przeważającej ilości przypadków, koordynacja metali prowadzi do otrzymania nieorganicznych pochodnych, charakteryzujących się znacznie lepszymi właściwościami antybakteryjnymi niż wyjściowe leki [25, 56]. W podrozdziale tym scharakteryzowano kilka przykładowych nieorganicznych modyfikacji powszechnie stosowanych antybiotyków.



Rysunek 8. Przykładowy kompleks ciprofloksacyny; jon kobaltu(II) skoordynowany jest poprzez zdeprotonowany atom tlenu grupy karboksylowej oraz atom tlenu grupy karbonylowej

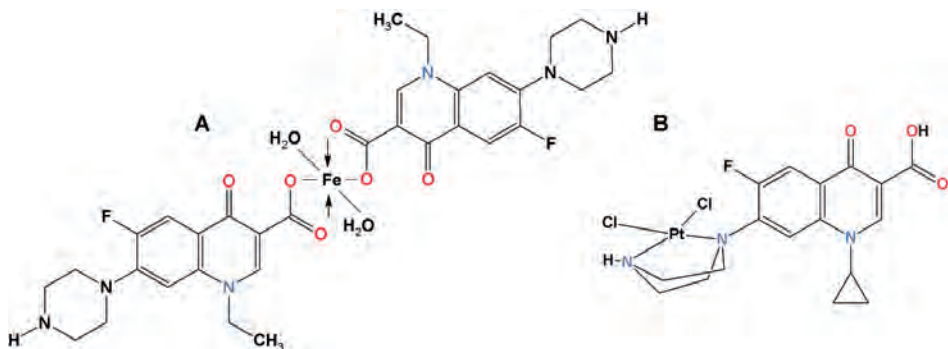
Figure 8. The representative metal complex of ciprofloxacin; the cobalt(II) ion is bounded by oxygen atoms from deprotonated carboxyl and carbonyl groups

Do tej pory najdokładniej scharakteryzowano i opisano kompleksy, w których jon metalu skoordynowany jest poprzez zdeprotonowany atom tlenu grupy karboksylowej oraz atom tlenu grupy karbonylowej (Rys. 8). Taki sposób koordynacji nie tylko wydaje się być najłatwiejszy, ale także najefektywniejszy. Koordynacja takich jonów metali, jak  $Mn^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  do kwasu pipemidynowego wywołała znaczne zwiększenie właściwości przeciwbakteryjnych wobec szczepów *C. hofman-*

nie, *S. ureus*, *B. subtilis* oraz *S. flexne*. Najaktywniejszym kompleksem okazał się ten z jodem cynku(II). Związek ten cechował się dwukrotnie wyższą aktywnością biologiczną a także wyższą stabilnością oraz rozpuszczalnością w wodzie, w porównaniu do liganda [23, 45, 56, 59, 63, 66].

W grupie powszechnie stosowanych nieorganicznych leków dosyć popularne są kompleksy jonów bizmutu. Koordynacja tego metalu z cząsteczkami norfloksacyny (**HNr**) doprowadziła do utworzenia pochodnej  $[\text{Bi}(\text{HNr})_4(\text{H}_2\text{O})_2]$ , odznaczającej się wyższą rozpuszczalnością w wodzie oraz wzmoczoną aktywnością przeciwbakteryjną względem *S. ureus*, *B. subtilis*, *E. faecalis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, a także *S. typhimurium* [34, 45, 48, 51, 64]. Warto wspomnieć, że koordynacja trzech cząsteczek norfloksacyny do jonu bizmutu niesie za sobą powstanie kompleksu aktywnego wobec *H. pylori* [25, 34, 45, 66].

Związanie innego antybiotyku chinolonowego – ciprofloksacyny do jonów metali doprowadziła do otrzymania różnorodnych nieorganicznych pochodnych:  $[\text{Mg}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{HCp})_2](\text{NO}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  [23, 56],  $[\text{Bi}(\text{HCp})_3(\text{H}_2\text{O})_2]$  [45, 56],  $[\text{Mn}(\text{HCp})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ ,  $[\text{Fe}(\text{HCp})_3]$ ,  $[\text{Co}(\text{HCp})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$  (Rys. 9),  $[\text{Ni}(\text{HCp})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ ,  $[\text{MoO}_2(\text{HCp})_2]$  [45, 67, 70],  $[\text{Co}(\text{HCp})_2(\text{H}_2\text{O})] \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ ,  $[\text{Zn}(\text{HCp})_2(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ ,  $[\text{Cd}(\text{HCp})_2(\text{Cl})_2] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  [24, 56, 67]. Otrzymane kompleksy odznaczały się znacznie wyższymi właściwościami przeciwbakteryjnymi, lepszą rozpuszczalnością w wodzie oraz efektywniejszym wiązaniem do DNA. Na szczególną uwagę zasłużył tu kompleks  $[\text{Zn}(\text{HCp})_2(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ , który w porównaniu do wolnego leku i pozostałych pochodnych wyróżniał się trzykrotnie wyższą aktywnością wobec *E. coli* oraz *B. dysenteriae*.



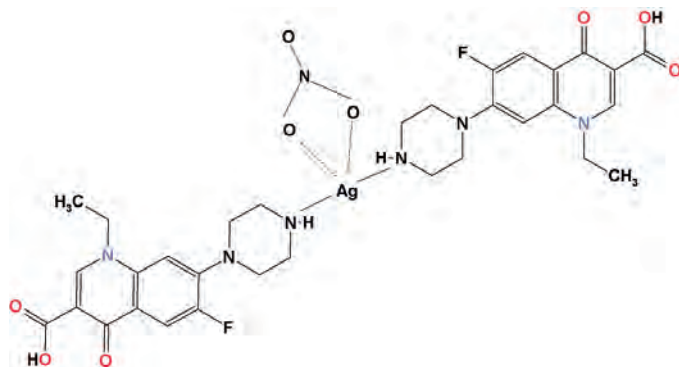
Rysunek 9. (A) Kompleks żelaza(III) z dwukleszczowym ligandem – norfloksacyną, (B) kompleks ciprofloksacyny z jodem platyny(II)

Figure 9. (A) The iron(III) complex of bidentate ligand – norfloxacin, (B) the platinum(II) complex of ciprofloxacin

Koordynacja antybiotyków chinolonowych do jonów metali zachodzić może również z udziałem obu atomów tlenu grupy karboksylowej lub obu atomów azotu pierścienia piperazy. Obie koordynacje, choć spotykane są rzadziej, to również znacznie zmieniają aktywność przeciwdrobnoustrojową leków chinolonowych.



Przykładami tego są kompleksy norfloksacyny z jonami żelaza(III) (Rys. 9A) oraz kobaltu(II). Związki te są wyjątkowo aktywne wobec *E. coli* oraz *B. dysenteriae* [34, 45, 53, 65]. Co ciekawe, ciprofloksacyna, lewofloksacyna, ofloksacyna oraz gatifloksacyna, jako ligandy dwukleszczowe, zdolne są do wiązania jonów  $Pt^{2+}$  (Rys. 9B). Jednak ze względu na ich niską trwałość, związki te nie zostały poddane badaniom mikrobiologicznym [23, 45]. Z kolei koordynacja antybakteryjnego jonu srebra(I) (Rys. 10) przez dwie cząsteczki norfloksacyny, zwiększyła aktywność biologiczną wyjściowej substancji wobec bakterii *P. aeruginosa* oraz szczepu grzybiczego *P. verrucosum* [65,69].

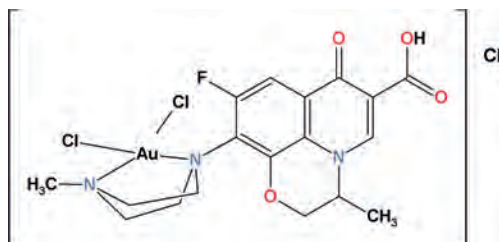


Rysunek 10. Struktura kompleksu srebra(I) z norfloksacyną; jon metalu skoordynowany jest przez jeden azot pierścienia piperazynowego obu cząsteczek norfloksacyny

Figure 10. The structure of silver(I) complex with norfloxacin; metal ion is coordinated to one nitrogen atom from piperazine ring of each norfloxacin molecule

### 5.2.2. Właściwości przeciwnowotworowe

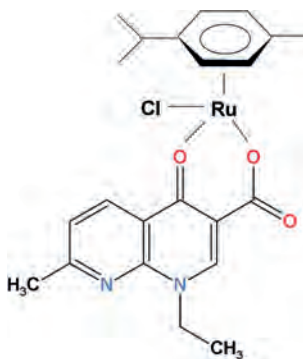
Zdolność hamowania przez chinolony topoiizomerazy II, a tym samym inhibicja systemu naprawczego DNA, a także predyspozycje do bezpośredniego oddziaływania ich kompleksów z kwasami nukleonowymi stanowią przesłanki do podjęcia badań nad potencjalną aktywnością przeciwnowotworową związków zawierających szkielet chinolonowy [34, 56, 61, 68].



Rysunek 11. Struktura kompleksu  $[AuCl_2(\text{lewofloksacyna})]Cl$

Figure 11. The structure of  $[AuCl_2(\text{levofloxacin})]Cl$  complex

Przykładowo, kompleks  $[\text{Cu}(\text{HMs})(\text{H}_2\text{O})_2\text{Cl}]\text{BF}_4$  leku moksfloksacyny (**HMs**), odznaczał się wysoką aktywnością antykanцерогенną *in vitro* wobec czterech linii nowotworów piersi (MCF-7, T47D, MDA-MB-231 oraz BT-20), podczas gdy sam ligand pozostawał nieaktywny względem wszystkich wspomnianych układów [15, 34, 56, 66, 70].



Rysunek 12. Organometaliczny kompleks rutenu(II)

Figure 12. Organometallic ruthenium(II) complex

Kompleksy złota(III) o ogólnym wzorze  $[\text{AuCl}_2\text{L}]\text{Cl}$  (gdzie L = norfloksacyna, lewofloksacyna, Rys. 11) zostały przetestowane wobec różnorodnych linii komórek nowotworowych (A20: chłonnik, B16-F10: szpiku; K562: białaczki) oraz linii zdrowych komórek płuc (L919 oraz MCR-5). Podczas gdy ligandy antybiotykowe pozostawały w przeprowadzonych testach nieaktywne, ich kompleksy charakteryzowały się nie tylko wysoką aktywnością biologiczną, ale także selektywnością jedynie wobec komórek nowotworowych (aktywność praktycznie taka sama, niezależnie od skoordynowanego leku) [24, 56, 70]. Organometaliczny kompleks rutenu(II) (Rys. 12) został zbadany wobec komórek raka płuc (A549), raka jajnika (CH1) oraz raka jelita grubego (SW480). Okazało się, że pomimo zastosowania jonu rutenu, nie udało się otrzymać związku aktywnego wobec badanych linii komórek nowotworowych. Wnioskować, zatem można, że to nie obecność jonów metali, ale sposób ich koordynacji do cząsteczek chinolonów jest czynnikiem warunkującym właściwości biologiczne otrzymanych pochodnych nieorganicznych.

Zastosowanie kompleksów chinolonowych w kontekście terapii antynowotworowych jest trendem nowatorskim i znacznie mniej popularnym niż ich wykorzystywanie w leczeniu infekcji drobnoustrojowych. Mimo to, w ostatnich latach obserwuje się wzrost zainteresowania tym zagadnieniem [12, 25].

## PODZIĘKOWANIE

Naszej kochanej Pani Profesor Małgorzacie Jeżowskiej-Bojczuk dziękujemy za niezwykle chwile, które mogliśmy z Nią spędzić. Na zawsze pozostanie w naszych sercach.

„Czasem wiatr zdmuchnie  
smutek przelotny,  
Ciepłym tchnieniem znów dłonie ogrzeje,  
I przegoni wszystkie kłopoty,  
Więc dziękuję wiatrowi, że wieje.

Czasem deszcz o szyby zadzwoni  
Mokra trawa kroplami łśni  
Łzami łatwiej tęsknotę zasłonić,  
Więc dziękuję deszczowi za łzy.

Czasem słońce w gonitwie do lata  
Znowu ogród barwami roznieci  
Pozapala iskry na kwiatach,  
Więc dziękuję słońcu, że świeci.

No, a czasem się do mnie uśmiechniesz  
Znikną smutki szaro – niebieskie  
Stoisz w progu i słońce masz w oczach,  
Więc dziękuję Ci za to, że jesteś...”

*/Czesław Miłosz/*

Praca powstała dzięki funduszom Narodowego Centrum Nauki nr grantu 2016/23/D/ST5/00269.

## PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] K. Drlica, H. Hiasa, R. Kerns, M. Malik, A. Musta, *Curr. Top. Med. Chem.*, 2009, **9**, 981.
- [2] P. Chander, A. Jain, S. Jain, *Acta Pol. Pharm. Res.*, 2009, **66**, 587.
- [3] L.R. Peterson, *Clin. Inf. Diseases*, 2001, **33**, 180.
- [4] G.S. Tillotson, *J. Med. Microbiol.*, 1996, **44**, 320.
- [5] A. George, *Clin. Inf. Diseases*, 2005, **4**, 120.
- [6] Y. Xia, Z.Y. Yang, S.L. Morris-Natschke, K.H. Lee, *Curr. Med. Chem.*, 1999, **6**, 179.
- [7] A. Dalhoff, I. Shalit, *Lancet Infect. Dis.*, 2003, **3**, 359.

- [8] K. Kaur, M. Jain, R.P. Reddy, R. Jain, *Eur. J. Med. Chem.*, 2010, **45**, 3245.
- [9] K. Eleni, G. Psomas, Y. Sanakis, N. Katsaros, *J. Inorg. Biochem.*, 2007, **101**, 525.
- [10] P.C. Appelbaum, P.A. Hunter, *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2000, **16**, 5.
- [11] A. Lavie-Cambot, M. Cantuel, Y. Leydet, G. Jonusauskas, D. M. Bassani, N.D. McClenaghan, *Coord. Chem. Rev.*, 2008, **252**, 2572.
- [12] D.T.W. Chu, P.B. Fernandes, *Adv. Drug Res.*, 1991, **21**, 39.
- [13] Y. Zhao, Y. Chen, J. Sheu, I. Chen, T. Wang, C. Tzenga, *Bioorg. Med. Chem.*, 2005, **13**, 3921.
- [14] G.L. Patrick, *An Introduction to Medicinal Chemistry*, Oxford University Press, New York 2003.
- [15] M.V. De Almeida, M.F. Saraiva, M.V.N. De Souza, C.F. Da Costa, F.R.C. Vincente, M.C.S. Lourenco, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2007, **17**, 5661.
- [16] G. Anquetin, J. Greiner, N. Mahmoud, *Eur. J. Med. Chem.*, 2006, **41**, 1478.
- [17] E.M. Scholar, *Am. J. Pharm. Educ.*, 2003, **66**, 164.
- [18] F. Van Bambeke, J.-M. Michot, J. Van Eldere, P. M. Tulkens, *Clin. Microbiol. Infect.*, 2005, **11**, 256.
- [19] C.M. Oliphant, *Am. Fam. Phys.*, 2002, **65**, 455.
- [20] D.E. King, R. Malone, S.H. Lilley, *Am. Fam. Phys.*, 2000, **61**, 2741.
- [21] G.G. Zhanel, A. Walkty, L. Vercaigne, J.A. Karlowsky, J. Embil, A.S. Gin, D.J. Hoban, *Can. J. Infect. Dis.*, 1999, **10**, 207.
- [22] V. Uivarosi, *Molecules*, 2013, **18**, 11153.
- [23] J. Cross, *Semin. Pediatr. Infect. Dis.*, 2001, **12**, 211.
- [24] J. Blondeau, *Surv. Ophthalmol.*, 2004, **49**, 73.
- [25] K. Drlica, *Curr. Opin. Microbiol.*, 1995, **2**, 504.
- [26] J. Katie, R. Aldred, J. Kerns, N. Osheroof, *Biochemistry*, 2014, **53**, 1565.
- [27] L.A. Mitscher, *Chem. Rev.*, 2012, **105**, 559.
- [28] K. Drlica, H. Hiasa, R. Kerns, M. Malik, A. Mustaev, X. Zhao, *Curr. Top. Med. Chem.*, 2009, **9**, 981.
- [29] V.E. Anderson, N. Osheroof, *Curr. Pharm. Des.*, 2009, **7**, 337.
- [30] J.J. Champoux, *Annu. Rev. Biochem.*, 2001, **70**, 369.
- [31] Y. Pommier, E. Leo, H. Zhang, C. Marchand, *Chem. Biol.*, 2010, **17**, 421.
- [32] A.C. Gentry, N. Osheroof, *Encyclopedia of Biological Chemistry*, Elsevier Inc., Amsterdam 2013.
- [33] K. Chauhan, P. Singh, V. Kumar, P.K. Shukla, M. Imran, M.S. Chauhan, *Eur. J. Med. Chem.*, 2014, **78**, 442.
- [34] C. Marzano, V. Gandin, M. Pellei, D. Colavito, G. Papini, G. Gioia Lobbia, E. Del Giudice, M. Porchia, F. Tisato, C. Santini, *J. Med. Chem.* 2008, **51**, 798.
- [35] M. Takemura, *Farmaco*, 2001, **56**, 37.
- [36] O.K. Kim, K. Ohemeng, J.F. Barrett, *Opin. Investig. Drugs*, 2004, **10**, 199.
- [37] K. Kawakami, H. Takahashi, H. Ohki, K. Kimura, S. Miyauchi, R. Miyauchi, M. Takemura, *Chem. Pharm. Bull.*, 2010, **48**, 1667.
- [38] N. Hayashi, K. Hashimoto, A. Yazaki, *Antimicrob. Agents Chem.*, 2001, **4**, 556.
- [39] J.C. Jung, Y.J. Jung, O.S. Park, *J. Heterocyclic. Chem.*, 2001, **38**, 61.
- [40] G.S. Tillotson, *GS. J. Med. Microbiol.*, 1996, **44**, 320.
- [41] F. Van Bambeke, J.-M. Michot, J. Van Eldere, P.M. Tulkens, *Clin. Microbiol. Infect.*, 2005, **11**, 256.
- [42] E. Pestova, J.J. Millichap, G.A. Noskin, L.R. Peterson, *J. Antimicrob. Chemother.*, 2000, **45**, 583.
- [43] R. Beyer, E. Pestova, J.J. Millichap, G.A. Noskin, L.R. Peterson, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2000, **44**, 798.
- [44] T.A. Davies, L.M. Kelly, G.A. Pankuch, K.L. Credito, M.R. Jacobs, *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 2000, **44**, 304.
- [45] A.N. Wadworth, K.L. Goa, *Drugs.*, 1991, **42**, 1018.
- [46] R.C. Owens Jr, P.G. Ambrose, *Med. Clin. N. Am.*, 2000, **84**, 1447.

- [47] A. Mohamed, A. Ragh, A. Mohamed, A. Eldesouki, S. Mohamed, *Spectrochim. Acta A*, 2015, **138**, 585.
- [48] J.J. Schentag, *J. Clin. Ther.*, 2000, **22**, 372.
- [49] J. Gong, X. Liu, B. Shang, S. Chen, Y. Zhen, *Oncol. Rep.*, 2010, **23**, 1747.
- [50] World Health Organization, *Antibiotic resistance: Multi-country public awareness survey*, 2015 (ISBN 978 92 4 150981 7).
- [51] G. Alvan, C. Edlund, A. Hedding, *Drug Resist.*, 2011, **14**, 70.
- [52] L.S. Redgrave, S. B. Sutton, M.A. Webber, L.J.V. Piddock, *Trends Microb.*, 2014, **22**, 8.
- [53] D.C. Hooper, *Drugs*, 1999, **58**, 6.
- [54] D.C. Hooper, *Clin. Infect. Dis.*, 2001, **32**, 9.
- [55] B. Fournier, X., Zhao, T. Lu, K. Drlica, D.C. Hooper, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2000, **44**, 2160.
- [56] L.B. Price, A. Vogler, T. Pearson, J.D. Busch, J.M. Schupp, P. Keim, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2003, **47**, 2362.
- [57] S.K. Morgan-Linnell, L. Becnel Boyd, D. Steffen, L. Zechiedrich, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2014, **53**, 235.
- [58] K. Drlica, X. Zhao, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2013, **61**, 377.
- [59] Li, Z. Deguchi, T. Yasuda, M. Kawamura, T. Kanematsu, E. Nishino, Y. Ishihara, S. Kawada, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1998, **42**, 3293.
- [60] A. Robicsek, G.A. Jacoby, D.C. Hooper, *Lancet Infect. Dis.*, 2006, **6**, 629.
- [61] J. Strahilevitz, G.A. Jacoby, D.C. Hooper, *Clin. Microbiol. Rev.*, 2009, **22**, 664.
- [62] J.H. Tran, G.A. Jacoby, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2002, **99**, 5638.
- [63] X. Xiong, E.H. Bromley, P. Oelschlaeger, D.N. Woolfson, J. Spencer, *Nucleic Acids Res.*, 2011, **39**, 3917.
- [64] A. Jemal, R. Siegel, E. Ward, T. Murray, J. Xu, C. Smigal, M.J. Thun, *CA-Cancer J. Clin.*, 2006, **56**, 106.
- [65] B.K. Edwards, M.L. Brown, P.A. Wingo, H.L. Howe, E. Ward, L.A.G. Ries, D. Schrag, P.M. Jamison, A. Jemal, X. Cheng Wu, C. Friedman, L. Harlan, J. Warren, R.N. Anderson, L.W. Pickle, *J. Natl. Cancer Inst.*, 2005, **97**, 1407.
- [66] M.J. Renan, *Mol. Carcinog.*, 1993, **7**, 139.
- [67] D. Hanahan, R.A. Weinberg, *Cell*, 2000, **100**, 57.
- [68] A.A. Rosenkranz, D.A. Jans, A.S. Sobolev, *Immunol. Cell Biol.*, 2000, **78**, 452.
- [69] P. Dozzo, M.S. Koo, S. Berger, T.M. Forte, S.B. Kahl, *J. Med. Chem.*, 2005, **48**, 357.
- [70] Y. Berger, L. Ingrassia, R. Neier, L. Juillerat-Jeanneret, *Bioorg. Med. Chem.*, 2003, **11**, 1343.

Praca wpłynęła do Redakcji 2 czerwca 2018



# FARMAKOLOGICZNA AKTYWNOŚĆ FLAWONOIDÓW I AMINOFLAWONÓW

## PHARMACOLOGICAL ACTIVITIES OF AMINOFLAVONES

**Daria Szeliga<sup>1\*</sup>, Maria Korabik<sup>1</sup>, Justyn Ochocki<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Wydział Chemii, Uniwersytet Wrocławski  
ul. F.Joliot-Curie 14, 50-383 Wrocław

<sup>2</sup> Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Medyczny  
ul. Muszyńskiego 1, 90-151 Łódź

\*e-mail: [daria.szeliga@chem.uni.wroc.pl](mailto:daria.szeliga@chem.uni.wroc.pl)

---

*Pracę dedykujemy pamięci Pani Profesor Małgorzaty Jeżowskiej-Bojczuk*

---

Abstract

Wykaz stosowanych skrótów

Wprowadzenie

1. Kompleksy flawonoidów z jonami metali

1.1. Aktywność przeciwutleniająca kompleksów pochodnych flawonoidów z jonami metali

1.2. Aktywność przeciwnowotworowa kompleksów pochodnych flawonoidów z jonami metali

1.2.1. Właściwości przeciwnowotworowe pochodnych flawonoidów

1.2.2. Aktywność farmakologiczna poszczególnych aminoflawonów

1.2.2.1. 3-aminoflawony

1.2.2.2. 5-aminoflawony

1.2.2.3. 6-aminoflawony

1.2.2.4. 7-aminoflawony

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane

---

**Mgr Daria Szeliga** absolwentka studiów I stopnia Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie (2015). W 2017 roku ukończyła studia II stopnia na Wydziale Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego i w tym samym roku rozpoczęła studia doktoranckie w Zespole Nieorganicznej Chemii Supramolekularnej. Jej zainteresowania naukowe obejmują m. in. badania właściwości fizykochemicznych związków koordynacyjnych d- i f- elektronowych z aktywnymi farmakologicznie ligandami.

**Dr hab. Maria Korabik, prof. UWr**, absolwentka Wydziału Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego. Stopień doktora otrzymała w 1993 r., stopień naukowy doktora hab. w 2012r.. Jej zainteresowania naukowe skupiają się wokół tematyki magnetyków i magnezów molekularnych. Jest członkiem Polskiego Towarzystwa Chemicznego. Od 2012 r. pełni funkcję kierownika Zakładu Dydaktyki Chemii na Wydziale Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego.

**Prof. dr hab. Justyn Ochocki** uzyskał dyplom magistra farmacji w Akademii Medycznej w Łodzi, w roku 1974. Stopień doktora otrzymał w 1984 r., stopień naukowy doktora hab. w 1998 r., a nominację profesorską w 2008 r. Prawo wykonywania zawodu farmaceuty na obszarze Rzeczypospolitej Polskiej uzyskał w 2010 r. W latach 1986, 1987 i 1992 odbył staże naukowe w zespole Profesora Jana Reedijka na Uniwersytecie w Lejdzie (Holandia). W latach 1993, 2001, 2005 był stypendystą DAAD – *Deutscher Akademischer Austauschdienst*, a w 1996, 1997 r. stypendystą programu TEMPUS, w zespole Profesora Bernharda Lipperta. Obecnie pełni funkcję kierownika Katedry Chemii Medycznej i kierownika Zakładu Chemii Nieorganicznej na Wydziale Farmacji Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.



---

**ABSTRACT**

Aminoflavones belong to a group of flavonoids, compounds commonly found in nature. Their pharmacological and biochemical effects include cytotoxic, antioxidant and antitumor properties. The studies have shown that complexes of aminoflavons with metal ions can be potential drugs and seem to be promising in the treatment of ovarian cancer, breast cancer, lung adenocarcinoma and melanoma. In addition aminoflavones have a lower cytotoxic activity towards healthy cells than another compounds. In the view of their wide pharmacological and biological actions, they seem to have great therapeutic potential.

Keywords: flavonoids, flavones, aminoflavones, biological activity, anticancer properties

Słowa kluczowe: flawonoidy, flawony, aminoflawony aktywność biologiczna, właściwości przeciwnowotworowe

---

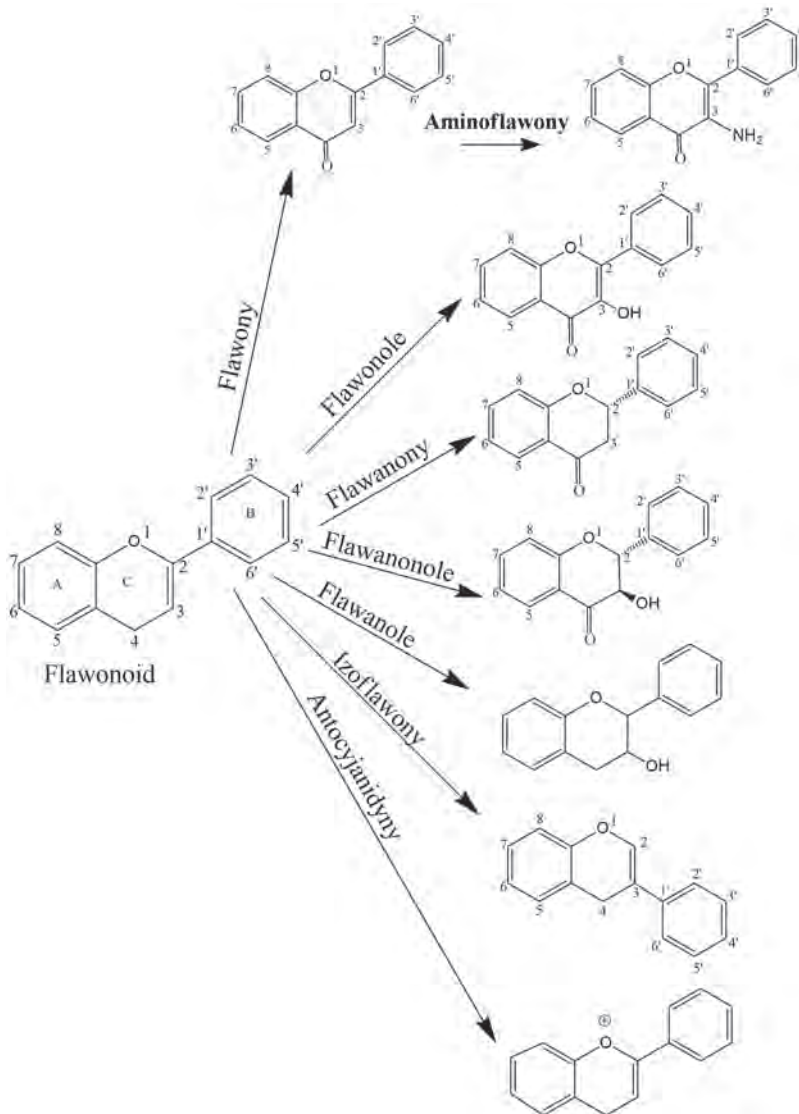
---

## WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

AIDS	– zespół nabytego niedoboru odporności (ang. <i>acquired immune deficiency syndrome</i> )
DNA	– kwas deoksyrybonukleoinowy (ang. <i>deoxyribonucleic acid</i> )
UV	– promieniowanie nadfioletowe (ang. <i>ultraviolet</i> )
ATP	– adenozy-5'-trifosforan (ang. <i>adenosine triphosphate</i> )
MCF	– linia komórkowa nowotworu piersi (ang. <i>Michigan Cancer Foundation-7</i> )
A549	– linia komórkowa gruczolakoraka płuc (ang. <i>human non-small lung cancer cells</i> )
CAOV 3	– linia komórkowa nowotworu jajnika (ang. <i>Human Ovarian Cancer Cell Line</i> )
OVCAR 3	– linia komórkowa nowotworu jajnika (ang. <i>Human Ovarian Cancer Cell Line</i> )
MTT	– Bromek 3-(4,5-dimetylo-2-tiazolilo)-2,5-difenylo-2H-tetrazoliowy (ang. <i>3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide</i> )
BAX	– białko z rodziny Bcl-2 (ang. <i>Bcl-2-associated X protein</i> )
Bcl-2	– heterogenna grupa białek (ang. <i>B-cell lymphoma 2</i> )
BIRC5	– gen kodujący surwiwinę człowieka (ang. <i>Baculoviral IAP Repeat Containing 5</i> )
ER	– receptor estrogenowy (ang. <i>estrogen receptor</i> )
AhR	– receptor węglowodorowy (ang. <i>aryl hydrocarbon receptor</i> )
CYP	– oznaczenie genu kodującego enzym cytochrom P450 (ang. <i>Cytochrome P450</i> )
CYP1A1	– białka cytochromu P450 (ang. <i>Cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1/ polypeptide2</i> )
CYP1A2	
MDA-MB-435	– linia komórkowa czerniaka (ang. <i>melanoma cell line</i> )
HeLa	– linia komórkowa wywodząca się z komórek raka szyjki macicy (ang. <i>Henrietta Lacks</i> )
EAC	– gruczolakorak przętyku (ang. <i>cancer of the external auditory canal</i> )
NM	– guzkowy czerniak (ang. <i>nodular melanoma</i> )
SSM	– czerniak szerzący się powierzchniowo (ang. <i>Superficial spreading melanoma</i> )
IC <sub>50</sub>	– medialne stężenie inhibitora hamujące w 50% funkcje biologiczne i biochemiczne organizmów (ang. <i>the half maximal inhibitory concentration</i> )

## WPROWADZENIE

Aminoflawony są pochodnymi flawonów, należących do grupy flawonoidów-związków powszechnie występujących w roślinach, których aktywność biologiczna została szeroko opisana w literaturze [1]. Flawonoidy stanowią zróżnicowaną klasę wtórnych metabolitów roślinnych: znanych jest ponad 9000 ich struktur. Flawony natomiast stanowią jedną z najliczniejszych podgrup flawonoidów (Rys. 1) [2].



Rysunek 1. Klasy flawonoidów [3]

Figure 1. Subgroups of flavonoids [3]

Wszystkie flawonoidy posiadają wspólny trójcykliczny szkielet węglowy, oznaczany jako A, B i C. Wśród nich pierścień C jest heterocykliczny i zawiera atom tlenu [4]. Natomiast pierścień B jest dołączony do węgla C2, przy węglu C3 zwykle nie ma podstawnika [5].

Flawonoidy można klasyfikować bazując na różnicach w charakterze oraz pozycji odpowiednich podstawników, głównie grup hydroksylowych. Amfipatyczny charakter flawonoidów, czyli obecność hydrofilowych podstawników oraz hydrofobowych cyklicznych szkieletów węglowych, odgrywa kluczową rolę w reakcjach flawonoidów z jednostkami biologicznymi, wpływając na ich aktywność fizjologiczną [4].

Termin „flawon” został użyty po raz pierwszy w 1895 roku przez S. von Konstanteckiego oraz J. Tambora, którzy specjalizowali się w tej klasie flawonoidów [5]. Literatura wskazuje, że flawonoidy wykazują wiele właściwości biologicznych, np. cytostaticzne [6], apoptotyczne (indukujące śmierć komórki) [7, 8] przeciwwzapalne [9–11], przeciwwirusowe [12], antyangiogenne [13], przeciwutleniające [14], przeciwwrzodowe [15] oraz antymutagenne [16]. W dodatku niektóre z flawonoidów są silnymi modyfikatorami zarówno ekspresji, jak i aktywności specyficznych białek, np. cytochromu P450 [17–19]. Flawony z kolei przyciągają uwagę swoimi właściwościami przeciwwzapalnymi, antywirusowymi oraz przeciwnowotworowymi [20]. Ich aminopodstawione pochodne to właśnie aminoflawony [21], których rdzeniem jest pierścień flawonu (Rys. 1). Aminoflawony oraz ich pochodne są płaskie oraz chiralne, co wyróżnia je spośród innych klas flawonoidów [22–29]. Związki te znalazły zastosowanie jako leki antynowotworowe [19], [21], [30–43], leki przeciwwzapalne [40–43], a także leki przeciwdepresyjne [44].

Modyfikacje rdzenia flawonu były podstawą wielu syntetycznych i strukturalnych badań nad poprawą ich aktywności biologicznej [43]. Na podstawie badań zależności struktury i aktywności flawonu stwierdzono, że podwójne wiązanie między węglem C2 a C3, grupa karbonylowa w pozycji 4, grupy -metoksy, -hydroksy oraz grupy aminowe dołączane często w pozycjach 3, 5 i 7 poprawiają aktywność biologiczną [45]. Tego typu pochodne wykazały silne działanie jako środki przeciwnowotworowe, inhibitory niektórych enzymów kinazowych, takich jak np. kinazy cyklozależne, tyrozynowe, aromatazy, topoizomeryazy czy kinazy białkowe C [43]. Ugrupowanie flawonowe, dzięki swoim zróżnicowanym właściwościom farmakologicznym, stanowi potencjalny farmakofor [40] określający grupy funkcyjne potrzebne do związania leku z obiektem docelowym oraz wykazujący aktywność biologiczną, a także sposób przestrzennego rozmieszczenia grup względem siebie [46].

Niemal wszystkie pochodne flawonów zostały rozpoznane w źródłach botanicznych. Powszechnie występują w roślinach naczyniowych [42]. Flawony można odnaleźć we wszystkich nadziemnych i podziemnych częściach roślin – w łodygach, liściach, pąkach, korze, cierniach, kłączach, kwiatach, owocach, nasionach, a także w wysięku z korzeni i liści oraz w żywicy [5]. Dzięki ich aktywności w fotouczulaniu,

transporcie energii i metabolizmie komórkowym, znalazły zastosowanie jako produkty biochemiczne i farmakologiczne w suplementach diety [47, 48]. Natomiast aminoflawony to związki, które nie występują naturalnie, dlatego muszą być syntezowane [40].

## 1. KOMPLEKSY FLAWONOIDÓW Z JONAMI METALI

Wśród różnych właściwości flawonoidów, chelatacja metali jest kluczową cechą, która wywiera duży wpływ na charakter i zdolności farmakologiczne flawonoidów. W ostatnich latach naukowcy podjęli się zsyntezowania i scharakteryzowania związków koordynacyjnych flawonoidów o potencjalnych zastosowaniach w różnych dziedzinach. Struktura tworzonego kompleksu zależy od rodzaju flawonoidu oraz jonu metalu. Od tego zależą także właściwości biologiczne odpowiednich kompleksów. Flawonoidy mają tendencję do pełnienia funkcji dawcy wodoru, co przyczynia się do powstawania związków kompleksowych o dobrej stabilności [4].

Powstająca struktura kompleksu flawonoidu z jonem metalu zależy od wielu czynników. Do nich zaliczyć można liczbę koordynacji i stopień utlenienia centralnego jonu metalu, liczbę dawców elektronów oraz ich bliskość w ligandach, a także warunki chelatujące, takie jak temperatura czy pH. Zazwyczaj proces chelatacji metali do pierścienia flawonoidu przypisuje się obecności i liczbie fenolowych grup hydroksylowych. Ich obecność w pozycji 3 lub 5 w bliskim sąsiedztwie grupy karbonylowej na ogół sprzyja tworzeniu się kompleksów jonów metali z udziałem tych grup [4]. Nawet jeśli ligandy posiadają różną liczbę miejsc wiązania metali, zwykle wiązanie koordynacyjne jest korzystnie utworzone pomiędzy grupą ketonową w czwartej pozycji w pierścieniu C i grupą hydroksylową w piątej pozycji pierścienia A, dając kompleksy 1:1 lub 1:2, a wynikać to może z bliskości grup dawców elektronów. Stosunek jonu metalu do liganda zależy również od natury jonu centralnego i jego liczby koordynacji. Kolejnym powodem różnego stosunku jonu metalu do liganda w tworzonym związku kompleksowym jest czynnik steryczny. Ma to szczególne znaczenie w przypadku ligandów o dużych rozmiarach, gdzie liczba schelatowanych ligandów do centralnego jonu metalu jest ograniczona [49]. Tworzenie związków kompleksowych zależy również od zastosowanych rozpuszczalników [50, 51].

Właściwości medyczne naturalnie występujących flawonoidów są bardzo dobrze znane od wielu lat. Jednak odkrycie, że ich kompleksy z jonami metali są bardziej skuteczne niż same flawonoidy, zmieniło przebieg badań nad lekami. Naukowcy wykazali, że kompleksy te można z powodzeniem stosować w leczeniu szeregu chorób, takich jak cukrzyca, niektóre infekcje bakteryjne oraz nowotwory. Wymienia się również ich rolę w leczeniu chorób neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Huntingtona. Pomagają także w stanach zatrucia metalami ciężkimi. Tego typu kompleksy mogą również wpływać na równowagę żelaza w organizmach

żywych, co jest istotne w leczeniu takich chorób, jak np. ataksja Friedraicha czy Talasemia [52].

Naukowcy na całym świecie próbują zaprojektować skuteczne leki przeciw wciąż nieuleczalnym chorobom, takim jak AIDS, cukrzyca czy nowotwory. Od wielu lat badane są właściwości antynowotworowe kompleksów jonów metali miedzi(II), żelaza(II), żelaza(III) czy platyny(II). Ponadto znane są podobne właściwości samych flawonoidów oraz ich pochodnych. Te dwa fakty skłoniły naukowców do sprawdzenia, czy kompleksy tych metali z flawonoidami jako ligandami będą wykazywały większą aktywność biologiczną niż podstawowe związki [52].

Pochodne flawonoidów, ze względu na obecność grupy karbonylowej oraz grup hydroksylowych i aminowych, mogą koordynować jony metali i tworzyć związki kompleksowe. Jednakże reakcje pomiędzy nimi a jonami metali nie zawsze dotyczą tylko tworzenia wiązań koordynacyjnych. W zależności od rodzaju metalu, występować mogą reakcje redoks pomiędzy jonem metalu a ligandem, ponieważ większość pochodnych flawonoidów ma właściwości redukujące [53]. Jest to szczególnie istotne w przypadku jonów metali o właściwościach utleniających, np. żelaza(III) [54], rutenu(IV) [55], rutenu(III) [56], złota(III) [57] czy osmu(VIII) [58].

Kompleksy flawonoidów z jonami metali są barwne, często wykazują właściwości fluorescencyjne, utleniające lub antyutleniające, a także przeciwdrobnoustrojowe, antyproliferacyjne oraz wiele innych [53].

Złożoność budowy kompleksów pochodnych flawonoidów z jonami metali jest związana z orientacją przestrzenną, która może być odpowiedzialna za aktywność farmakologiczną. Kompleksy z jonami metali mogą wykazywać właściwości podobne jak macierzyste flawonoidy, ale też mogą przejawiać zupełnie inną aktywność biologiczną, ze względu na unikalne cechy strukturalne. Ostatnie doniesienia dotyczące kompleksów flawonoidów z jonami metali wskazują, że związki te wykazują zdecydowanie silniejszą aktywność biologiczną niż same ligandy. Powody tych różnic nie zostały jeszcze dokładnie wyjaśnione, jednak badania w tym kierunku nabierają rozpędu, torując drogę dzięki terapeutycznemu zastosowaniu kompleksów flawonoidów z jonami metali. Tylko nieliczne badania wskazują, że tego typu kompleksy mogą wywołać szkodliwe efekty w układach biologicznych. Wynika to prawdopodobnie z uwolnienia jonów metali z kompleksu, w wyniku dysocjacji lub działania kompleksów na wewnątrzkomórkowe miejsca docelowe [4].

Aminoflawony, z uwagi na obecność podstawionych grup aminowych, tworzą dwukleszczowe kompleksy, wykazując przy tym aktywność cytotoksyczną. Ogólnie przyjmuje się, że związki te łatwo mogą chelatować jony metali i tworzyć kompleksy metaloorganiczne [59].

### 1.1. AKTYWNOŚĆ PRZECIWUTLENIAJĄCA POCHODNYCH FLAWONOIDÓW

Flawonoidy oraz ich pochodne należą do najlepiej zbadanych związków przeciwutleniających. Ich właściwości antyoksydacyjne są silnie skorelowane ze strukturą. Obecność wolnych jonów metalu w organizmie człowieka przyczynia się do powstawania wolnych rodników powodujących stres oksydacyjny, który z kolei może wywołać kaskadę zdarzeń prowadzących do szeregu chorób, m.in. astmy, przedwczesnego starzenia się, chorób układu krążenia, zaburzeń neurologicznych oraz nowotworów [60]. W organizmie ludzkim znajduje się wiele jonów metali, w tym najważniejszego - żelaza. Mimo że żelazo występuje głównie w postaci związanej, może być również dostępne w postaci wolnego jonu żelaza(II) lub żelaza(III), i może być źródłem wolnych rodników, np. w reakcji Fentona, w której nadtlenek reaguje z jonem żelaza(II) i tworzy rodnik hydroksylowy [61]. Flawonoidy działają jako czynniki chelatujące ze względu na obecność karbonylowego tlenu oraz podstawników posiadających wolne pary elektronowe, np. grupy hydroksylowe czy aminowe [60]. Chelatowanie jonów metali skutecznie zmniejsza potencjał redoks danego jonu, tym samym opóźnia jego działania w kierunku tworzenia wolnych rodników. Zmniejszenie ilości żelaza, dzięki koordynacji do odpowiednich flawonoidów, powoduje obniżenie zaburzeń związanych ze stresem oksydacyjnym [62].

### 1.2. AKTYWNOŚĆ PRZECIWNOWOTWOROWA KOMPLEKSÓW POCHODNYCH FLAWONOIDÓW Z JONAMI METALI

Odkrycie przeciwnowotworowej aktywności flawonoidów zapoczątkowało szereg badań w celu zidentyfikowania najbardziej aktywnych flawonoidów i ich pochodnych przeciwko różnym formom nowotworów oraz poznania mechanizmu ich działania. Dane eksperymentalne wykazały, że flawonoidy charakteryzują się od 3 do 5 razy silniejszą aktywnością od innych czynników proapoptotycznych, czyli programujących śmierć komórki [60]. Aktywność przeciwnowotworowa flawonoidów jest głównie związana ze zdolnością do oddziaływania z DNA. Flawonoidy modyfikują ekspresję genów lub indukują fragmentację DNA, która prowadzi do aktywacji szlaków apoptotycznych [63].

Stwierdzono również, że niektóre kompleksy flawonoidów z jonami metali wykazują działanie przeciwnowotworowe, pośrednicząc w zatrzymaniu reakcji cyklu komórkowego, modyfikując strukturę DNA [64] [65]. Aktywność przeciwnowotworowa kompleksów z jonami metali w wielu przypadkach okazała się większa niż macierzystych flawonoidów. Potwierdzają to badania nad komórkami raka szyjki macicy [66], żołądka [67], wątroby [67], jelita grubego [68], komórek kościotwórczych [68], białaczkowych [69] czy ludzkich komórek wątrobiaka [68].

Kompleksy flawonoidów z jonami metali stanowią unikalną klasę pochodnych flawonoidów, które wykazują, w większości przypadków, bardzo dobre właściwości farmakologiczne, takie jak: przeciwutleniające, przeciwbakteryjne, przeciwno-

wotworowe, przeciwzapalne, przeciwcukrzycowe czy prooksydacyjne. Stanowią tym samym ogromny potencjał terapeutyczny. Kompleksowanie metali powoduje silniejszą aktywność farmakologiczną oraz dużą stabilność zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo* [4].

Szereg kompleksów flawonoidów z jonami metali, wykazujących potencjalną aktywność farmakologiczną, nie zostało do końca zbadanych. Na podstawie literatury zaobserwowano, że aktywność biologiczna zależy od struktury flawonoidowych kompleksów, rodzaju liganda i jonu centralnego. Zmiana konformacji czy bardziej płaska struktura kompleksów mogą również wywierać pozytywny wpływ na aktywność farmakologiczną. Systemy biologiczne obfitują w wiele cząsteczek, które mogą chelatować jony metali. Powinowactwo flawonoidu do jonu metalu jest niezwykle istotne w określaniu stabilności powstających kompleksów, dlatego niezbędne są dalsze badania nad wykorzystaniem potencjału klinicznego tych kompleksów [4].

Mechanizm aktywności przeciwnowotworowej pochodnych flawonoidów nie jest jeszcze do końca poznany, ponieważ właściwości biochemiczne zależą od struktury poszczególnych flawonoidów, gdzie każdy związek posiada inne właściwości biologiczne i przejawia różny mechanizm działania [70].

Podstawową cechą flawonoidów jest ich zdolność do wymiatania wolnych rodników. Te właściwości przeciwutleniające są po części odpowiedzialne za działanie przeciwnowotworowe [71]. Związki te zapobiegają uszkodzeniom komórek spowodowanym przez reaktywny tlen powstający zarówno w procesach metabolicznych, jak i powstający z czynników egzogennych, takich jak promieniowanie UV oraz ksenobiotyki, czyli substancje obce. Czynniki te mogą modyfikować fragmenty transkrypcyjne oraz aktywność kinaz białkowych [72], doprowadzając do uszkodzenia DNA, co zwiększa prawdopodobieństwo wystąpienia mutacji. Flawonoidy zapobiegają aktywacji protoonkogenu, czyli genu posiadającego możliwość przekształcenia się w aktywny gen powodujący nowotwór. Zapobiegają również zmianom w genach supresorowych, których rolą jest hamowanie rozwoju choroby nowotworowej [71]. Flawonoidy wykazują działanie antyproliferacyjne, czyli hamujące podziały mitotyczne komórek, a także indukują śmierć komórek nowotworowych. Jako zmiatacze wolnych rodników, hamują procesy inwazji i przerzutowania komórek nowotworowych [70], [73].

### 1.2.1. AKTYWNOŚĆ FARMOKOLOGICZNA AMINOFLAWONÓW

Badania prowadzone nad flawonami dowodzą, że regulują one funkcję makrofagów w usuwaniu komórek nowotworowych oraz są potencjalnymi inhibitorami proliferacji komórek (np. apigenina czy luteolina) [36]. Właściwości przeciwnowotworowe samych aminoflawonów wynikają z ich działania jako konkurencyjne inhibitory kinazy tyrozynowej w stosunku do ATP [74, 75]. Związki te wykazały działanie antyproliferacyjne, m. in. wobec ludzkich komórek raka piersi, linii komórkowej



MCF-7. Ponadto wykazały aktywność *in vitro* oraz *in vivo* przeciwko nowotworowi nerek [76].

Ponieważ aktywność biologiczna zależy od struktury flawonu, każda pochodna musi zostać poddana analizie indywidualnie. Ponadto niezbędne są analizy porównawcze pomiędzy różnymi pochodnymi flawonów, np. w stosunku do badań nad najsilniejszymi działaniami przeciwnowotworowymi [5].

### 1.2.1.1. 3-AMINOFLAWONY

Od czasu kiedy Barnett Rosenberg w 1965 r. odkrył przeciwnowotworową aktywność cisplatyny ( $\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2$ ), zaczęto intensywnie badać związki koordynacyjne metali oraz stosować je w terapii antynowotworowej [30] [77].

Wczesne badania zależności aktywność-struktura cisplatyny sugerują, że ligandy powinny być ustawione w konformacji *cis*, ponieważ tylko ona wykazuje aktywność biologiczną. Niemniej jednak, od lat 90. wiele związków *trans*-platyny znalazło zastosowanie jako leki przeciwnowotworowe [78]. Co więcej: niektóre z tych kompleksów wykazują aktywność w stosunku do tych komórek nowotworowych, na które nie działała *cis*-platyna [79].

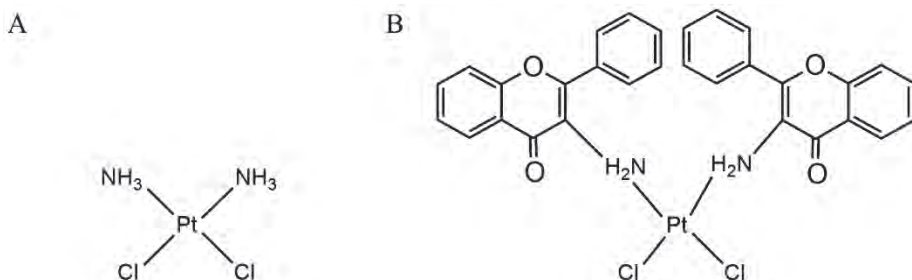
Z uwagi na ograniczenia w stosowaniu leków platynowych, projektowane są nowe związki metali wykazujące działanie przeciwnowotworowe, ale o mniejszych skutkach ubocznych oraz o mniejszej skłonności do indukowania lekooporności [30], ponieważ u wielu pacjentów wystąpiły takie objawy, jak nefrotoksyczność, redukcja komórek szpiku kostnego lub zwiększone ryzyko wystąpienia zakrzepicy żył głębokich [80, 81].

W ciągu ostatnich lat naukowcy skupiają się na kompleksach metali z takimi ligandami, które są istotne pod względem biologicznym i medycznym. Pochodne flawonoidów, posiadające różnorodne właściwości farmakologiczne, są szczególnie interesującymi kandydatami na ligandy.

#### *cis*-Pt(3-af)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

Przeciwnowotworowe i przeciwutleniające właściwości flawonów zachęciły naukowców do zsyntezowania kompleksu *cis*-Pt(3-af)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> i porównania z *cis*-platyną ( $\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2$ ) jego aktywności w odniesieniu do indukowania apoptozy i nekrozy w prawidłowych ludzkich limfocytach krwi obwodowej. Badania wykazały, że zsyntezowany kompleks jest mniej toksyczny wobec zdrowych komórek niż cisplatyna. Indukowanie apoptozy zachodzi w znacznie mniejszym stopniu, przez co *cis*-Pt(3-af)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> może być potencjalnym lekiem przeciwnowotworowym, wykazującym mniejsze skutki uboczne [31, 82, 83].

Kompleks  $cis\text{-Pt}(3\text{-af})_2\text{Cl}_2$  jest strukturalnie związany z cisplatyną, ale zawiera cząsteczki 3-aminoflawonu, zamiast samych cząsteczek amoniaku jako ligandów (Rys. 2) [84].



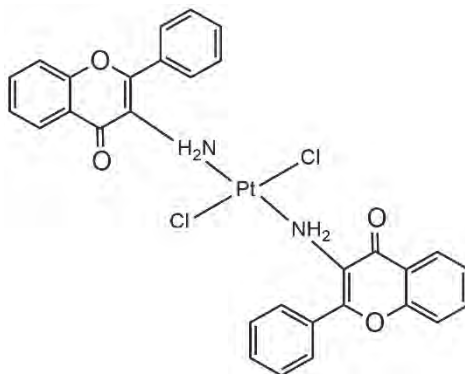
Rysunek 2. Przedstawienie struktur cisplatyny (A) i  $cis\text{-Pt}(3\text{-af})_2\text{Cl}_2$  (B) [32]

Figure 2. Chemical structures of compounds: (A) cisplatin, (B)  $cis\text{-Pt}(3\text{-af})_2\text{Cl}_2$  [32]

Porównano również kompleks  $cis\text{-Pt}(3\text{-af})_2\text{Cl}_2$  oraz cisplatynę pod kątem cytotoksyczności wobec linii komórkowej A549 gruczolakoraka płuc. Stwierdzono, że kompleks ten wykazuje wysoką aktywność w indukowaniu apoptozy i nekrozy komórek nowotworowych. Wyniki wskazują, że  $cis\text{-Pt}(3\text{-af})_2\text{Cl}_2$  może być potencjalnym lekiem chemoterapeutycznym [34, 83, 85, 86].

### $trans\text{-Pt}(3\text{-af})_2\text{Cl}_2$

Potencjalny efekt synergistyczny pomiędzy flawonoidami a jonami metali skłonił do zsyntezowania również  $trans\text{-Pt}(3\text{-af})_2\text{Cl}_2$  [30]. Do syntezy tego związku zachęcały obiecujące właściwości przeciwnowotworowe izomeru  $cis\text{-Pt}(3\text{-af})_2\text{Cl}_2$  [31–33].



Rysunek 3. Struktura  $trans\text{-Pt}(3\text{-af})_2\text{Cl}_2$  [30]

Figure 3. Structure of  $trans\text{-Pt}(3\text{-af})_2\text{Cl}_2$  [30]

Kompleks *trans*-Pt(3-af)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ujawnił znaczącą cytotoksyczność w stosunku do wszystkich testowanych komórek nowotworowych [30, 87].

Stwierdzono, że związek *trans*-Pt(3-af)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> jest nieco mniej cytotoksyczny dla testowanych linii komórkowych raka niż *cis*-platyna, natomiast był również mniej toksyczny wobec prawidłowych limfocytów, w porównaniu z *cis*-platyną, co jest szczególnie istotne w zapobieganiu potencjalnych skutków ubocznych działania leku [30].

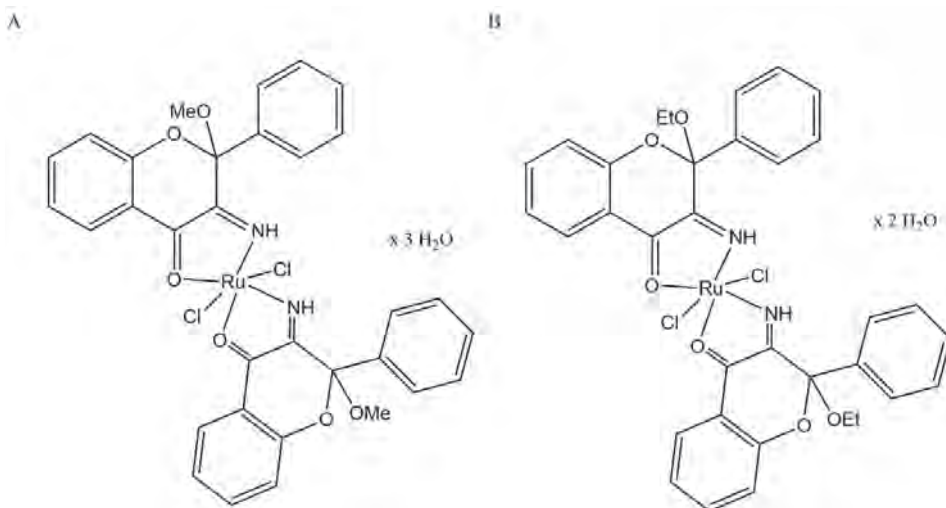
Na szczególną uwagę zasługuje fakt, że związek *trans*-Pt(3-af)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> wykazał aktywność przeciwnowotworową w stosunku do komórek raka jajnika [87]. Jest to nowotwór złośliwy, wykazujący wysokie zróżnicowanie w zależności od pochodzenia, struktury histologicznej, przebiegu choroby i metod leczenia. Nowotwór jajnika jest pochodzenia nabłonkowego, a jego zdolność do rozprzestrzeniania się w jamie otrzewnej jest cechą odróżniającą go od innych. W zaawansowanych stadiach choroby jama otrzewna jest głównym miejscem, w którym występują przerzuty [88] [89].

W badaniach porównano działanie *trans*-Pt(3-af)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> oraz cisplatyny wobec dwóch linii komórek nowotworowych jajnika: CAO V 3 oraz OVCAR 3 [87]. Dla oceny wpływu badanego związku oraz cisplatyny na komórki nowotworowe jajnika, wykonano test MTT. Test ten oparty jest na pomiarze aktywności przemian energetycznych w mitochondriach. Mierzona jest wówczas żywotność komórek za pomocą testu redukcji soli tetrazolowej. Badania wykazały, że wraz ze wzrostem stężenia *trans*-Pt(3-af)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> oraz cisplatyny maleje żywotność zarówno linii komórkowej CAO V 3, jak i OVCAR 3.

Przy nowotworze jajnika obserwuje się zaburzenia w procesie apoptozy, dlatego w badaniach rozpatrzono również ekspresję wybranych genów (BAX, BCL2, BIRC5) zaangażowanych w ten proces. W wyniku ekspozycji genów na *trans*-Pt(3-af)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> oraz cisplatynę zaobserwowano zwiększoną ekspresję genu BAX oraz zmniejszoną ekspresję genów BCL2 i BIRC5 wobec obu badanych związków [87].

***cis*-dichloro-bis (3-imino-2-metoksyflawanon) rutenu(II) · 3H<sub>2</sub>O**  
***cis*-dichlorido-bis (3-imino-2-etoksyflawanon)rutenu(II) · 2H<sub>2</sub>O**

Aktywność przeciwnowotworową opisano również dla dwóch nowych flawanonowych kompleksów rutenu(II), powstających podczas reakcji chlorku rutenu(II) z 3-aminoflawonem rozpuszczonym w alkoholu alifatycznym. Z alkoholu metyloвого otrzymano *cis*-dichloro-bis (3-imino-2-metoksyflawanon)rutenu(II) · 3H<sub>2</sub>O, natomiast z alkoholu etylowego *cis*-dichlorido-bis (3-imino-2-etoksyflawanon) rutenu(II) · 2H<sub>2</sub>O (Rys. 4). 3-aminoflawon został najpierw utleniony, a następnie uległ solwolizie do 3-imino-2-alkoksyflawanonu, będącego już właściwym ligandem dla jonu rutenu(II) [56] [90].



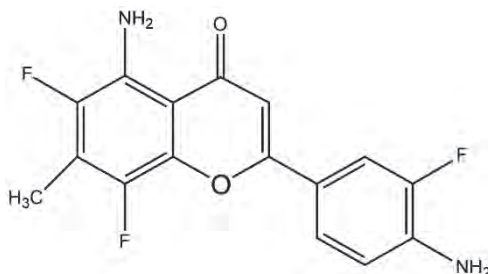
Rysunek 4. Struktura *cis*-dichloro-bis(3-imino-2-metoksyflawanon)rutenu(II) · 3H<sub>2</sub>O (A) oraz *cis*-dichlorido-bis(3-imino-2-etoksyflawanon)rutenu(II) · 2H<sub>2</sub>O (B) [90]

Figure 4. Structures of *cis*-dichlorido-bis(3-imino-2-methoxyflavanone)ruthenium(II)·3H<sub>2</sub>O (A) and *cis*-dichlorido-bis(3-imino-2-ethoxyflavanone)ruthenium(II)·2H<sub>2</sub>O (B) [90]

Aktywność farmakologiczną powstałych kompleksów badano wobec linii komórkowych ludzkiego nowotworu pęcherza moczowego. Badania wykazały, że oba związki cechują się wysoką cytotoksycznością przeciwko komórkom nowotworowym. Jednocześnie badania *in vitro* wykazały niską toksyczność zsyntezowanych kompleksów wobec zdrowych ludzkich limfocytów. Szybka indukcja apoptozy jest częściowo spowodowana obecnością dużych lipofilowych ligandów, strukturalnie opartych na pierścieniu flawanonu ułatwiających transport przez błony [90].

### 1.2.1.2. 5-AMINOFLAWONY

W trakcie poszukiwań nowych czynników przeciwnowotworowych w walce z rakiem piersi, zsyntezowanych i zbadanych zostało wiele związków należący do grupy aminoflawonów. Jeden z nich to 5-aminoflawon (5-amino-2,3-fluorofenylo-6,8-difluoro-7-metylo-4H-1-benzopirano-4-on), wykazujący zróżnicowaną aktywność antyproliferacyjną przeciwko linii komórkowej MCF-7 nowotworu piersi oraz ludzkim komórkom raka sutka [21].



Rysunek 5. Struktura pochodnej 5-aminoflawonu (5-amino-2-(4-amino-3-fluorofenilo)-6,8-difluoro-7-metylo-4H-1-benzopirany-4-onu) [21]

Figure 5. Structure of 4H-1-benzopyran-4-one, 5-amino-2-(4-amino-3-fluorophenyl)-6,8-difluoro-7-methyl [21]

Aby sprawdzić mechanizm działania tego aminoflawonu, badano uszkodzenia DNA w linii komórkowej MCF-7. Analiza komórek wykazała równomierne hamowanie DNA po ekspozycji na aminoflawon [91]. W badaniach skupiono się również na aktywności aminoflawonu wobec arylowego receptora węglowodorowego (AhR). Wyniki wykazały, że cytotoksyczność aminoflawonu dla linii komórkowej MCF-7 nowotworu piersi jest wynikiem zaangażowania transdukcji sygnału za pośrednictwem AhR [21].

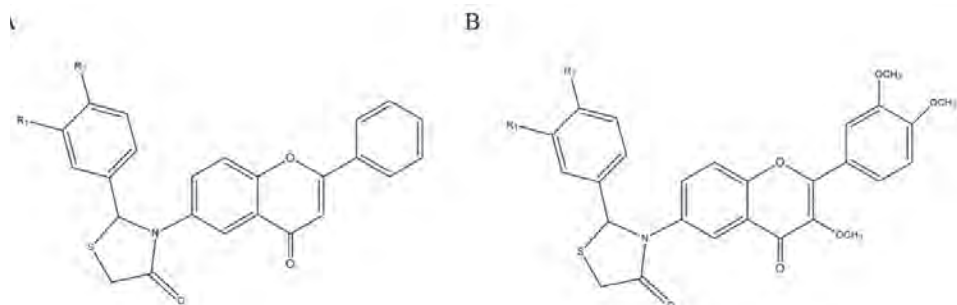
Przeprowadzono również badania, w których pochodna 5-aminoflawonu była intensywnie poddawana przemianom metabolicznym przez cytochromy P450 (CYP) typu 1A1 oraz 1A2, czyli enzymy zaangażowane w metabolizm endogennych substratów i leków. Radioznakowany aminoflawon został przekształcony przez rekombinowane enzymy CYP1A1 oraz CYP1A2 do reaktywnych związków, które kowalencyjnie wiążą makrocząsteczki. Inkubacja 5-aminoflawonu z serią ludzkich komórek nowotworowych spowodowała indukcję ekspresji CYP1A1 oraz CYP1A2, a także wiązania kowalencyjnego aminoflawonu do DNA. W badaniach wykazano, że aminoflawon jest zdolny do indukowania własnej aktywacji metabolicznej za pośrednictwem białek CYP1A1 oraz CYP1A2 i przekształcenia się do cytotoksycznych cząsteczek, niszczących DNA komórek nowotworowych [19].

### 1.2.1.3. 6-AMINOFLAWONY

#### Tiazolidynowe analogi 6-aminoflawonu

Poszukiwania nowych leków przeciwnowotworowych z wykorzystaniem aminoflawonów polegają nie tylko na kompleksowaniu z jonami metali. Zsyntezowano również analogi heterocykliczne przez połączenie pierścienia flawonowego i pierścienia tiazolidynowego, mające wzmacnić przeciwnowotworową aktywność takich pochodnych aminoflawonu, jak: 6-aminoflawon (Rys. 6), 6-amino-3-metoksyfla-

won oraz 6-amino-3-metoksy-3',4'-dimetoksyflawon, różniących się ilością grup metoksylowych. Związki te badano pod kątem ich aktywności przeciwnowotworowej w warunkach *in vitro* oraz *in vivo*. Badania potwierdziły istniejący potencjał cytotoksyczny nowych analogów dla linii komórkowej czerniaka MDA-MB-435 i oraz linii komórkowej HeLa. Co ciekawe, obecność ugrupowań metoksylowych zwiększała potencjał cytotoksyczny wobec komórek nowotworowych nie powodując toksyczności wobec komórek zdrowych. Zgodnie z oczekiwaniami, zesyntezowane związki zwiększyły długość życia myszy chorujących na nowotwór [41].

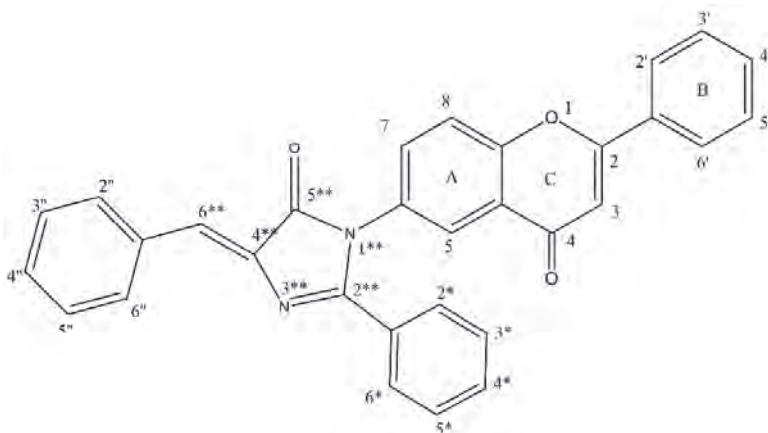


Rysunek 6. Struktura tiazolidinowego analogu 6-aminoflawonu (A) oraz 6-amino-3-metoksy-3',4'-dimetoksyflawonu (B) [41]

Figure 6. Structures of 6-Amino-3-methoxy-3',4'-dimethoxyflavone (B) and its thiazolidinone analog (A) [41]

### Imidazolidynowe analogi 6-aminoflawonu

Przeprowadzono również syntezę imidazolidynowych analogów 6-aminoflawonu w oparciu o założenie, że połączenie tych dwóch związków, będących farmakoforami, może powodować synergiczne działanie przeciwnowotworowe [40]. Ogólną strukturę zaproponowanych analogów przedstawiono na Rysunku 7.



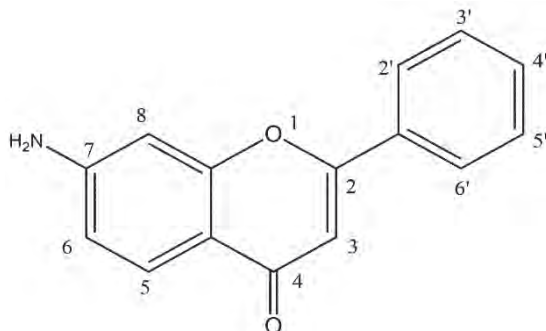
Rysunek 7. Struktura imidazolidynowego analogu aminoflawonu [40]

Figure 7. Structure of imiazolidinone analogue of flavone [40]

Wstępne badania cytotoksyczności *in vitro*, przeprowadzone przy użyciu testu MTT wobec dwóch różnych linii komórkowych, wykazały, że skompleksowanie imidazolidynowych pochodnych z aminoflawonem zwiększyło aktywność cytotoksyczną. Najbardziej aktywnym biologicznie związkiem okazał się ten posiadający 2 grupy metoksyłowe w swojej strukturze. Badania *in vivo*, przeprowadzone na myszach indukowanych nowotworem przełyku EAC, również wykazały dużą aktywność przeciwnowotworową otrzymanych związków. Zbadano je także pod kątem właściwości przeciwzapalnych i zaobserwowano znaczący poziom aktywności [40].

#### 1.2.1.4. 7-AMINOFLAWONY

Badano też aktywność farmakologiczną kompleksów rutenu(II) z 6-aminoflawonem oraz 7-aminoflawonem (Rys. 8) względem komórek czerniaka. W badaniach wykorzystano dwie linie zaawansowanego czerniaka: NM – czyli guzkowy czerniak, najbardziej agresywna forma nowotworu oraz SSM – czerniak szerzący się powierzchniowo, najczęściej występujący. Cytotoksyczność badanych związków oceniano za pomocą cytometrii przepływowej. Badania wykazały, że oba ligandy skutecznie zmniejszyły żywotność komórek nowotworu obu linii. Wartości IC<sub>50</sub> były podobne dla obu linii komórkowych, jednak linia NM była nieco bardziej wrażliwa na otrzymane kompleksy aminoflawonów z rutenem(II) [59].



Rysunek 8. Struktura 7-aminoflawonu [59]

Figure 8. Structure of 7-aminoflavone [59]

## PODSUMOWANIE

Aminoflawony, jako podklasa flawonoidów, stanowią obszerną grupę związków wykazujących aktywność farmakologiczną. Ich działanie cytotoksyczne oraz przeciwutleniające wynika z możliwości tworzenia kompleksów dzięki chelatowaniu jonów metali. Aminoflawony są czynnikami chelatującymi ze względu na obecność w strukturze karbonylowego atomu tlenu oraz grupy aminowej, a także innych podstawników posiadających wolne pary elektronowe.

Celem współczesnej nauki jest projektowanie nowych związków kompleksowych, wykazujących działanie przeciwnowotworowe, ale zmniejszających skutki uboczne i nie wywołujących indukowania lekooporności. Badania skupiają się na syntezie kompleksów jonów metali z ligandami, które same wykazują aktywność biologiczną. Aminoflawony stanowią grupę niemal idealnych kandydatów do kompleksowania z jonami metali. Zsyntezowane kompleksy z aminoflawonami wykazały aktywność cytotoksyczną wobec takich nowotworów, jak gruczolakorak płuc, czerniak, a także nowotwór jajnika oraz piersi. Co więcej, kompleksy te wykazały się niską toksycznością w stosunku do zdrowych komórek.

## PIŚMIENICTWO CYTOWANE

- [1] A.D. Agrawal, *Int. J. Pharm. Sci. Nanotech*, 2011, 2.
- [2] J.B.H. Harborne, *Handbook of Natural Flavonoids*, 1999.
- [3] C. Weng, G. Yen, *Cancer Metastasis Rev.*, 2012, 31, 323.
- [4] S. Selvaraj, S. Krishnaswamy, V. Devashya, S. Sethuraman, U.M. Krishnan, *Medicinal Research Reviews*, 2014, 677.
- [5] S. Martens, A. Mithöfer, *Phytochemistry*, 2005, 66, 2399.
- [6] T. Fotsis, M.S. Pepper, E. Aktas, S. Breit, S. Rasku, H. Adlercreutz, K. Wahala, R. Montesano, L. Schweigerer, *Cancer Res.*, 1997, 57, 2916.



- [7] Y. Azuma, Y. Onishi, Y. Sato, H.J. Kizaki, *Biochem.*, 1995, **118**, 312.
- [8] B. Plaumann, M. Fritsche, H. Rimpler, G. Brandner, R.D. Hess, *Oncogene*, 1996, **13**, 1605.
- [9] M.L. Ferrandiz, M.J. Alcaraz, *Agents Actions*, 1991, **32**, 283.
- [10] N.D.J. Onwukaeme, *Ethnopharmacol.*, 1995, **46**, 121.
- [11] M. Ito, S. Ishimoto, Y. Nishida, T. Shiramizu, H. Yunoki, *Agric. Biol. Chem.*, 1986, **50**, 1073.
- [12] N.D. Meyer, A. Haemers, L. Mishra, H.-K. Pandey, P.L.A.C. Pietres, D.A.V. Berghe, A.J. Vlietinck, *Med. Chem.*, 1991, **34**, 736.
- [13] T. Fotsis, M.S. Pepper, E. Aktas, S. Breit, S. Rasku, H. Adlercreutz, K. Wahala, R. Montesano, L. Schweigerer, *Cancer Res.*, 1997, **57**, 2916.
- [14] T.H. Simpson, N. Uri, *Chem. Ind.*, 1956, 956.
- [15] J.A. Beutler, J.H. Cardellina, L.C. Min, E. Hamel, G.M. Cragg, M.R.B. Boyd, *Med. Chem. Lett.*, 1993, **3**, 581.
- [16] M.E. Wall, M.C. Wani, G. Manikumar, P. Abraham, H. Taylor, T.J. Hughes, J. Warner, R.J. McGivney, *Nat. Prod.*, 1988, **51**, 1084.
- [17] Y.-F. Lu, M. Santostefano, B.D.M. Cunningham, M.D. Threadgill, S. Safe, *Arch. Biochem. Biophys.*, 1995, **316**, 470.
- [18] S. Zhai, R. Dai, F.K. Friedman, R.E. Vestal, *Drug. Metab. Dispos.*, 1998, **26**, 989.
- [19] M. Kuffel, J.C. Schroeder, L.J. Pobst, S. Naylor, J.M. Reid, S.H. Kaufmann, M.M. Ames, *Mol. Pharmacol.*, 2002, **62**, 143.
- [20] F. Marin, M. Frutos, J. Perez-Alvarez, F. Martinez-Sanchez, J. Del Rio, *Stud. Nat. Prod. Chem.*, 2002, **26**, 747.
- [21] A.I. Loaiza-Pe', S. Kenney, J. Boswell, M. Hollingshead, M.C. Alley, C. Hose, H.P. Ciolino, G.C. Yeh, J.B. Trepel, D.T. Vistica, E.A. Sausville, *Mol. Cancer Ther.*, 2004, 3.
- [22] B.A. Siles, H.B. Halsall, J.G. Dorsey, *J. Chromatogr. A*, 1995, **704**, 289.
- [23] E.K. Susłow, J.D. Gładysz, A. Białowska, Z. J. Ciunik, *Mol. Catal. B Enzym.*, 2006, **39**, 18.
- [24] C.H. Lin, W.R. Fang, C.M. Kuo, W.Y. Chang, Y.C. Liu, W.Y. Lin, J.C. Wu, C.E. Lin, *J. Chromatogr. A*, 2008, **1188**, 301.
- [25] R. Cirilli, R. Ferretti, E.D. Santis, B. Gallinella, L. Zanitti, F.L. Torre, *J. Chromatogr. A*, 2008, **1190**, 95.
- [26] J. Y' a~nez, P.K. Andrews, N.M. Davies, *J. Chromatogr. B*, 2007, **848**, 159.
- [27] F. Kanaze, M. Bounartzi, M. Georgarakis, I. Niopas, *Eur. J. Clin. Nutr.*, 2007, **61**, 472.
- [28] E. Cho, Y. Jeon, S. Jung, *Bull. Korean Chem. Soc.*, 2009, 30.
- [29] L.B. Kunde, S.M. Gade, V.S. Kalyani, S.P. Gupte, *Catal. Commun.*, 2009, **10**, 1881.
- [30] M. Fabijańska, K. Studzian, L. Szmigiero, A.J. Rybarczyk-Pirek, A. Pfitzner, B. Cebula-Obrzut, P. Smolewski, E. Zyner, J. Ochocki, *Dalton Trans*, 2014.
- [31] B. Kosmider, R. Osiecka, E. Ciesielska, L. Szmigiero, E. Zyner, J. Ochocki, *Mutation Research*, 2004, **558**, 169.
- [32] B. Kosmider, K. Wyszynska, E. Janik-Spiechowicz, R. Osiecka, E. Zyner, J. Ochocki, E. Ciesielska, W. Wasowicz, *Mutation Research*, 2004, **558**, 93.
- [33] B. Kosmider, I. Zawlik, P.P. Liberski, R. Osiecka, E. Zyner, J. Ochocki, J. Bartkowiak, *Mutation Research*, 2006, **604**, 28.
- [34] B. Kosmider, E. Zyner, R. Osiecka, J. Ochocki, *Mutation Research*, 2004, **563**, 61.
- [35] B. Kosmider, E. Zyner, R. Osiecka, J. Ochocki, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 2004, **82**, 353.
- [36] B. Kosmider, R. Osiecka, *Drug Development Research*, 2004, **63**, 200.
- [37] R. Ghiasi, N. Sadeghi, *J. Chin. Chem. Soc.*, 2017, **64**, 934.
- [38] A.M. Brinkman, J. Wu, K. Ersland, W. Xu, *BMC Cancer*, 2014, **14**, 344.
- [39] M.A. Callero, G.V. Suárez, G. Luzzani, B. Itkin, A.I. Loaiza-Perez, *Int. J. of Onc.*, 2012, **41**, 125.
- [40] S. Moorkoth, K.K. Srinivasan, N.G. Kutty, A. Joseph, M. Naseer, *Med. Chem. Res.*, 2013, **22**, 5066.

- [41] S. Moorkoth, *Chem. Pharm. Bull.*, 2015, **63**, 974.
- [42] Y. Erdogdu, O. Unsalan, M. Amalanathan i I. Hubert Joe, *Journal of Molecular Structure*, 2010, **980**, 24.
- [43] A.Y. Habashneh, M.M. El-Abadelah, M.A. Zihlif, A. Imraish, M.O. Taha, *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.*, 2014, **347**, 415.
- [44] A. Mariana, M. Callero, I. Andrea, A. Loaiza-Pérez, *Int. J. Breast Cancer*, 2011, 9.
- [45] M. Hadjeri, C. Beney, A. Boumendjel, *Curr. Org. Chem.*, 2003, 7.
- [46] G. Patrick, *Chemia leków. Krótkie wykłady*, 2004.
- [47] J.B. Harborne, T.J. Marby, H. Marby, *The flavonoids*, 1975.
- [48] J.B. Harborne, T.J. Marby, *The Flavonoids: Advances in Research*, 1982.
- [49] S. Selvaraj, S. Krishnaswamy, V. Devashya, S. Sethuraman, U.M. Krishnan, 2012, **2**, 2797.
- [50] L. Mira, M.T. Fernandez, M. Santos, R. Rocha, M.H. Florencio, K.R. Jennings *Free Radic. Res.*, 2002, **36**, 1199.
- [51] A. Pekal, M. Biesaga, K. Pyrzyńska, *Biomaterials*, 2011, **24**, 41.
- [52] M. Grazul, E.C. Budzisz, *Chem. Rev.*, 2009, **253**, 2588.
- [53] M.M. Kasprzak, A. Erxleben, J. Ochocki, *RSC Adv.*, 2015, **5**, 45853.
- [54] M. Balcerzak, A. Tyburska, E. Swiecicka-Fuchsel, *Acta Pharm.*, 2008, **58**, 327.
- [55] M. Balcerzak, M. Kopacz, A. Kosiorek, E. Swiecicka, S.A.S. Kus, *Anal. Sci.*, 2004, **20**, 1333.
- [56] J. Ochocki, M. Kasprzak, L. Checinska, A. Erxleben, E. Zyner, L. Szmigiero, A. Garza-Ortiz, J. Reedijk, *Dalton Trans.*, 2010, **39**, 9711.
- [57] M. Balcerzak, A. Kosiorek, E.J. Swiecicka, *Anal. Chem.*, 2006, **61**, 119.
- [58] A. Kosiorek-Rupinska, E. Swiecicka-Fuchsel, M. Balcerzak, *Anal. Lett.*, 2006, **39**, 589.
- [59] A. Pastuszko, K. Majchrzak, M. Czyż, B. Kupcewicz, E. Budzisz, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2016, **159**, 133.
- [60] H.B. Havsteen, *Pharmacol Ther.*, 2002, **96**, 67.
- [61] G. Richard, B.C. Zepp, B.C. Faust, J. Hoigne, *Environ. Sci. Technol.*, 1992, **26**, 313.
- [62] Y. Yu, Y. M. Lan, C.S. Wen, *Food Sci.*, 2006, **27**, 29.
- [63] C. Kandaswami, L.T. Lee, P.P. Lee, J.J. Hwang, F.C. Ke, Y.T. Huang, M.T. Lee, *In Vivo*, 2005, **19**, 895.
- [64] M. Tan, J. Zhu, Y. Pan, Z. Chen, H. Liang, H. Liu, H. Wang, *Bioinorg. Chem. Appl.*, 2009, 347872.
- [65] S. Selvaraj, S. Krishnaswamy, V. Devashya, S. Sethuraman, U.M. Krishnan, *RSC Adv.*, 2012, **2**, 11138.
- [66] K. Durgo, I. Halec, I. Sola, J. Franekic, *Arh. Hig. Rada. Toksikol.*, 2011, **62**, 221.
- [67] M. Tan, J. Zhu, Y. Pan, Z. Chen, H. Liang, H. Liu, H. Wang, *Bioinorg. Chem. Appl.*, 2009, 347872.
- [68] S.B. Etcheverry, E.G. Ferrer, L. Naso, J. Rivadeneira, V. Salinas, P.A. Williams, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2008, **13**, 435.
- [69] D. Malesev, V.J. Kunti, *Serb. Chem. Soc.*, 2007, **72**, 921.
- [70] G. Di Carlo, N. Mascolo, A.A. Izzo, F. Capasso, *Life Sci.*, 1999, **65**, 337.
- [71] R.J. Nijveldt, E. Nood, D.E.C. Hoorn, P.G. Boelens, K. Norren, *Am. J. Clin. Nutr.*, 2001, **74**, 418.
- [72] W. Win, Z. Cao, X. Peng, M. Trush, Y. Li, *Mutat. Res.*, 2002, **213**, 113.
- [73] S. Kuntz, U. Wenzel, H. Daniel, *Eur. J. Nutr.*, 1999, **38**, 133.
- [74] M. Cushman, D.B.D.L. Nagarathnam, R.L. Geahlen, *J. Med. Chem.*, 1991, **34**, 798.
- [75] B.D.M. Cunningham, M.D. Threadgill, P.W. Groundwater, I.L. Dale, J.A. Hickman, *Anti. Cancer Drug*, 1992, **7**, 365.
- [76] M.A. Callero, G.V. Suarez, G. Luzzani, B. Itkin, B. Nguyen, A.I. Loaiza-Perez, *Int. J. Oncol.*, 2012, **41**, 125.
- [77] B. Rosenberg, V. Camp, T. Crigas, *Nature*, 1965, **205**, 698.
- [78] J. Alemán, V. del Solar, A. Alvarez-Valdés, C. Ríos-Luci, J.M. Padrón, C. Navarro-Ranninger, *Med. Chem. Comm.*, 2011, **2**, 789.

- [79] U. Kalinowska-Lis, J. Ochocki, K. Matlawska-Wasowska, *Coord. Chem. Rev.*, 2008, **252**, 1328.
- [80] J. Dudziak, M. Słomczyński, L. Torliński, *Choroby Serca i Naczyn.*, 2009, **2**, 73.
- [81] N. Johnson, J.L. Butour, G. e. a. Villani, *Progress in Clinical Biochemistry and Medicine*, 1989, 1.
- [82] E. Zyner, J. Graczyk, J. Ochocki, *Pharmazie*, 1999, **54**, 945.
- [83] B. Kosmider, S.A. Anuels, D. Evenberg, E. Zyner, L. Bahmed, R. Osiecka, J. Ochocki, *Drug Research.*, 2010, **60**, 149.
- [84] J. Ochocki, E. Zyner, PL Patent Nr P.185585, 2003.
- [85] B. Kośmider, I. Wójcik, R. Osiecka, J. Bartkowiak, E. Zyner, J. Ochocki, P. Liberski, *Investigational New Drugs*, 2005, **23**, 287.
- [86] E. Ciesielska, K. Studzian, E. Zyner, J. Ochocki, L. Szmigiero, *Cellular & Molecular Biology Letters*, 2000, **5**, 441.
- [87] M. Orzechowska, M. Fabijańska, J. Ochocki, M. Małecki, *Ginekologia Polska*, 2017, **2**, 68.
- [88] E. Lengyel, *Am. J. Pathol.*, 2010, **177**, 1053.
- [89] M. Desjardins, J. Xie, H. Gurler, G.G. Muralidhar, J.D. Sacks, J.E. Burdette, M.V. Barbolina, *J. Ovarian Res.*, 2014, **7**, 70.
- [90] M.M. Kasprzak, L. Szmigiero, E. Zyner, J. Ochocki, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2011, **105**, 518.
- [91] L. Meng, G. Kohlhagen, Z. Liao, S. Antony, E. Sausville, Y. Pommier, *Cancer Res.*, 2005, **65**, 12.

Praca wpłynęła do Redakcji 30 maja 2018



**BIAŁKA BŁONY ZEWNĘTRZNEJ *FUSOBACTERIUM*  
*NUCLEATUM* JAKO POTENCJALNY CZYNNIK  
PROMOCJI NOWOTWORU JELITA GRUBEGO**

OUTER MEMBRANE PROTEINS OF *FUSOBACTERIUM*  
*NUCLEATUM* AS A POTENTIAL FACTOR OF  
COLORECTAL CANCER PROMOTION

**Monika K. Lesiów,\* Katarzyna Krupa,\*  
Urszula K. Komarnicka, Paulina K. Walencik**

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

*\*e-mail: monika.lesiow@chem.uni.wroc.pl, katarzyna.krupa@chem.uni.wroc.pl*

---

*Pracę dedykujemy pamięci Pani Profesor Małgorzaty Jeżowskiej-Bojczuk*

---

Abstract

Wprowadzenie

1. Charakterystyka *Fusobacterium nucleatum* (*Fn*)
2. Związek pomiędzy rakiem jelita grubego (CRC) a *Fn*
3. Wybrane białka błony zewnętrznej *Fn*
  - 3.1. FadA
  - 3.2. Fap2
  - 3.3. FomA
  - 3.4. RadD
4. Kompleksy Cu(II)
  - 4.1. Peptydy jako potencjalne miejsca wiązania jonów Cu(II)
  - 4.2. Reaktywność peptydowych kompleksów Cu(II)
5. Reaktywne formy tlenu (RFT) i ich wpływ na struktury komórkowe

Podziękowanie

Piśmiennictwo cytowane

---

**Mgr Monika Katarzyna Lesiów** w latach 2010–2015 studiowała na Wydziale Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego uzyskując w 2015 roku tytuł magistra. Obecnie doktorantka stacjonarnych studiów doktoranckich chemii na Wydziale Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego. Jej zainteresowania naukowe skupiają się wokół chemii bionieorganicznej oraz medycznej.

**Mgr Katarzyna Krupa** w latach 2010–2015 studiowała na Wydziale Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego uzyskując w 2015 roku tytuł magistra. Obecnie doktorantka stacjonarnych studiów doktoranckich chemii na Wydziale Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego. Jej zainteresowania naukowe skupiają się wokół biologicznej chemii nieorganicznej

**Dr Urszula Katarzyna Komarnicka** w roku 2016 obroniła pracę doktorską pt. „Nowe kompleksy miedzi(I) z diiminami i fosfinową pochodną sparfloksacyny: właściwości fizykochemiczne i biologiczne” otrzymując tytuł doktora nauk chemicznych. Obecnie pracuje na Wydziale Chemii UWr., gdzie przede wszystkim syntetyzuje nowe substancje o właściwościach cytotoksycznych. Ponadto zajmuje się badaniem selektywnego transportu cytostatyków do komórek nowotworowych oraz zagadnieniami związanymi z wyjaśnieniem procesów kancerogenezy jelita grubego. Jej zainteresowania naukowe skupiają się wokół chemii medycznej oraz bionieorganicznej.

**Mgr Paulina Katarzyna Walencik** jest doktorantką na Wydziale Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego. W 2012 roku ukończyła studia licencjackie wśród 5% najlepszych absolwentów UWr, a 2 lata później studia magisterskie w ramach Indywidualnego Programu Studiów na tej samej uczelni. Główny nurt jej zainteresowań badawczych stanowi chemia bionieorganiczna. Ważnym uzupełnieniem badań mgr Walencik jest analiza aktywności redoks związków kompleksowych oraz wpływ tej aktywności na wolnorodnikowe mechanizmy kancerogenezy oraz neurodegeneracji.

---

**ABSTRACT**

*Fusobacterium nucleatum* is a Gram-negative, anaerobic bacterium located in an oral cavity. This bacterium can migrate with blood to the different part of the human body *e.g.* colon. The studies suggest participation of *Fn* in a colorectal cancer promotion, but a particular mechanism of this disease is still unclear. Colorectal cancer leads to million of new death cases each year. It is third in the worldwide in terms of mortality. The predictions for the coming years are not optimistic. The statistics encourage researchers to know the details of the mechanism of colorectal cancer. It is suggest, that outer membrane proteins of *Fn* are responsible for development of this disease. Transition metal ions such as Cu(I), Cu(II), Fe(II) can coordinate to proteins and generate free radicals by Fenton reaction. Reactive oxygen species (ROS) destroy important biological macromolecules such as DNA, proteins or lipids and cause different diseases. The paper presents characteristics of *Fn* and its outer membrane proteins, description of copper(II) complexes and their ability to ROS generation.

Keywords: *Fusobacteriumnucleatum*, outer membrane proteins, copper(II) complexes, reactive oxygen species

Słowa kluczowe: *Fusobacterium nucleatum*, białka błony zewnętrznej, kompleksy miedzi(II), reaktywne formy tlenu

---

---

## WPROWADZENIE

Ponad 600 gatunków różnych bakterii występuje naturalnie w jamie ustnej [1]. Część z nich odgrywa patogenną rolę i odpowiada za powstawanie stanów zapalnych. Bakterie mogą koagregować ze sobą, tworząc biofilm, jednocześnie nasilając swoje negatywne działanie na organizm ludzki [2, 3]. *Fusobacterium nucleatum* (*Fn*) jest gatunkiem bakteryjnym powszechnie występującym w jamie ustnej. Ta Gram-ujemna, beztlenowa bakteria stanowi most między wczesnymi i późnymi kolonizatorami (Rys. 1) [1, 4].



Rysunek 1. Koagregacja *Fusobacterium nucleatum* z bakteriami jamy ustnej

Figure 1. *Fusobacterium nucleatum* coaggregation with different bacteria species in the oral cavity

Odgrywa kluczową rolę w kontaktach między mikroorganizmami. Dowiedziono, że oprócz chorób przyzębia, przyczynia się do przedwczesnych i martwych urodzeń, owrzodzeń skóry, chorób serca, syndromu Lemierera, choroby Alzheimera oraz raka jelita grubego (CRC) [4, 5]. Jest to możliwe, ze względu na przedostanie się tej bakterii wraz z krwią do różnych części organizmu, np. jelita [6].

Nowotwór jelita grubego przyczynia się do ponad miliona zgonów rocznie, co plasuje go na trzecim miejscu pod względem umieralności na świecie [7]. Prognozy na najbliższe lata nie są optymistyczne, co skłania do poznania szczegółowego mechanizmu powstawania tej choroby. Podejrzewa się udział białek adhezyjnych błony zewnętrznej bakterii, szczególnie FadA, w zapoczątkowaniu procesu nowotworzenia. Białko FadA wiążąc się do E-kadheryn gospodarza, powoduje uwalnianie  $\beta$ -katenin [5, 8]. *Fn* na swojej błonie zewnętrznej posiada także inne białka,



do których zalicza się: RadD [9], RadA [1], Fap2 [9], FomA [10] czy P1 [11]. Ze względu na zdolność białek do wiązania jonów metali przejściowych (Cu(I), Cu(II), Fe(II)) [12, 13], postuluje się ich udział w generowaniu wolnych rodników w reakcji Fentona [14–16].

Powstałe reaktywne formy tlenu (RFT) niszczą ważne makromolekuły biologiczne, takie jak DNA, białka czy lipidy, przyczyniając się do uszkodzeń materiału genetycznego, struktury białek czy peroksydacji lipidów [17]. Zaburzenie równowagi pomiędzy produkcją RFT, a działaniem przeciwutleniaczy może prowadzić do powstawania stresu oksydacyjnego, a ten z kolei do licznych stanów chorobowych [18]. Obecność białek na błonie zewnętrznej bakterii oraz dostarczanie do organizmu wraz z dietą jonów miedzi(II) [19] i żelaza(II) [20] może skutkować tworzeniem się kompleksów. Dodatkowo, obecność nadtlenu wodoru w niektórych obszarach jelita umożliwia bakterii generowanie wolnych rodników. Ten postulat stanowi nową ścieżkę badań w poznaniu mechanizmu raka jelita grubego.

## 1. CHARAKTERYSTYKA *FUSOBACTERIUM NUCLEATUM* (FN)

*Fusobacterium nucleatum* należy do rodziny *Bacteroidaceae* i jest Gram-ujemną, beztlenową bakterią, która wykazuje duży stopień tolerancji na warunki tlenowe [4, 5]. Bakteria ta jest zdolna do przetrwania w warunkach stresu oksydacyjnego nawet do 60 godzin [4]. Ten najbardziej rozpowszechniony w jamie ustnej gatunek bakterii można podzielić na pięć podgatunków: *animalis*, *fusiforme*, *nucleatum*, *polymorphum* i *vincentii*. Spośród wymienionych, to *nucleatum* najczęściej utożsamiany jest z procesami chorobotwórczymi [5]. *Fn* odgrywa istotną rolę w mikrosystemie jamy ustnej poprzez koagregację z wieloma gatunkami bakterii (np.: *Streptococcus sanguinis* czy *Porphyromonas gingivalis*). Stanowi pomost pomiędzy wczesnymi a późnymi kolonizatorami, zajmując centralne miejsce płytki nazębnej [21]. Tworzenie wiązań pomiędzy komórkami mikroorganizmów prowadzi do powstawania biofilmu bakteryjnego, którego konsekwencją jest wystąpienie stanu zapalnego [22].

Zdolność przylegania (adhezji) jest cechą charakterystyczną tej bakterii i główną przyczyną powstawania chorób przyzębia. *Fn* może jednak migrować wraz z krwią [23] do innych części ciała, wywołując również choroby związane z układem krwionośnym [24], oddechowym [25] i pokarmowym, w tym raka jelita grubego [26]. Podwyższony poziom tej bakterii w stosunku do zdrowej tkanki wykryto u pacjentów z gruczolakorakiem jelita grubego [27]. Wiele ośrodków badawczych potwierdziło te doniesienia, co w dużym stopniu sugeruje udział tej bakterii w rozwoju tego rodzaju raka.

## 2. ZWIĄZEK POMIĘDZY RAKIEM JELITA GRUBEGO (CRC) A *FN*

Dokładny mechanizm powstawania raka jelita grubego z udziałem *Fn* nie został do dziś poznany. Każdego roku z powodu tej choroby umiera milion osób na świecie, a w Stanach Zjednoczonych nowotwór ten plasuje się na drugim miejscu pod względem umieralności [28]. Poznanie i wyjaśnienie ścieżki rozwoju tej choroby okazuje się kluczowym aspektem dla ludzkiego zdrowia. W literaturze istnieje kilka potencjalnych propozycji mechanizmów nowotworzenia przez *Fn*, opisywanych przez badaczy z różnych ośrodków naukowych.

Jeden z nich przedstawił już w 2009 roku Nithianantham i współpracownicy [23]. Zasugerowali oni, że *Fusobacterium nucleatum* przytwierdza się do komórek nabłonkowych gospodarza za pomocą adhezyny FadA i inicjuje reakcje prozapalne. Oddziałując z E-kadherynami, aktywuje wydzielanie  $\beta$ -katenin zapoczątkowując proces namnażania się komórek nowotworowych [5, 23]. Dodatkowo, w 2012 roku dwa zespoły naukowe, prowadząc niezależne badania nad związkiem pomiędzy *Fn* a rakiem jelita grubego, wykazały nadekspresję tej bakterii w tkankach pacjentów z nowotworem [29, 30]. W 2013 roku Rubinstein wraz ze współpracownikami zasugerował istotną rolę białka FadA w mechanizmie powstawania tej choroby [31]. Z kolei najnowsze doniesienia literaturowe (Shang i Liu, 2018 r.) przedstawiają zaangażowanie białka Fap2 błony zewnętrznej *Fn* w proces nowotworzenia. Proteina, oddziałując z ludzkim hamującym receptorem TIGIT, powoduje śmierć komórkową limfocytów, a generując mikrośrodowisko immunosupresyjne, zapoczątkowuje kancerogenezę. Opisane powyżej mechanizmy wskazują na kluczowy udział białek błony zewnętrznej *Fn* w zapoczątkowaniu i rozwoju raka jelita grubego.

## 3. WYBRANE BIAŁKA BŁONY ZEWNĘTRZNEJ *FN*

Proces adhezji, czyli przylegania komórek do siebie, za który odpowiadają białka adhezyjne, jest istotny w wielu procesach, takich jak migracja, wzrost bakterii, dzielenie się struktur komórkowych czy patogenezą. Adhezja odgrywa ważną rolę w koagregacji mikroorganizmów oraz łączeniu się z komórkami gospodarza [32, 33]. *Fn* znajdując się w centrum płytki nazębnej odpowiada za interakcje z innymi gatunkami bakterii poprzez obecne na błonie zewnętrznej białka [34].

### 3.1. FadA

Białko FadA występuje w dwóch formach: dojrzałej – mFadA jest wydzielany na zewnątrz błony komórkowej, oraz zakotwiczonej, która znajduje się po wewnętrznej stronie błony propeptyd pre-FadA. Pod względem strukturalnym, mFadA tworzy długie, cienkie filamenty połączone w układzie „głowa do ogona”. Poszczególne filamenty stabilizowane są przez oddziaływania hydrofobowe pomiędzy resztami

leucyłowymi. Zdolność tego białka do pobudzania wzrostu komórek nowotworowych jest zależna od obecności aktywnego kompleksu FadAc, na który składa się połączony m-FadA i pre-FadA [1, 35].

### 3.2. Fap2

Białko zewnętrznej błony komórkowej Fap2, zaliczane do autotransporterów typu Va, odpowiada za interakcję *F. nucleatum* z *P. gingivalis*. Adhezyna ta przyjmuje strukturę  $\beta$ -baryłki, a ze względu na obecność wielu miejsc aktywnych, odpowiedzialna jest za interakcje międzykomórkowe oraz tworzenie biofilmu [36]. Fap2 jest również zaangażowane w hemaglutynację erytrocytów, oddziaływanie z ludzkimi komórkami TIGIT oraz wywoływanie apoptozy [37].

### 3.3. FomA

Należące do rodziny Gram-ujemnych białek porynowych, główne białko błony zewnętrznej FomA odpowiedzialne jest za agregację *Fusobacterium nucleatum* z gatunkiem *Streptococcus*. Łączenie się FomA z *Porphyromonas gingivalis* skutkuje wzrostem biofilmu, co odgrywa kluczową rolę w chorobach przyzębia [1]. Białko FomA składa się z siedmiu wyekspozowanych na zewnątrz błony komórkowej pętli bogatych w reszty aminokwasowe, które są zdolne do koordynacji jonów metali. Białko porynowe występuje w postaci trimeru, natomiast jego monomer przyjmuje strukturę  $\beta$ -baryłki [38]. Działając jako poryna, tworzy kanał umożliwiający transport niskocząsteczkowych związków [39].

### 3.4. RadD

Białko RadD zaliczane jest do rodziny autotransporterów typu Va. Adhezyna ta odpowiada za łączenie się *Fn* z wieloma gatunkami bakterii Gram-dodatnich, zwłaszcza z gatunku *Streptococcus* (*S. sanguinis*, *S. gordonii*, *S. oralis*), które są wczesnymi kolonizatorami płytki nazębnej [9]. Duży rozmiar domeny białka i obecność wielu miejsc aktywnych pozwala również na liczne interakcje z komórkami gospodarza. Proteina RadD odgrywa także istotną rolę w wywoływaniu apoptozy białek oraz śmierci komórek Jurkata [36].

## 4. KOMPLEKSY Cu(II)

Interakcja jonów metali z biomolekułami jest jedną z najczęściej badanych dziedzin z zakresu biochemii nieorganicznej. Wiele jonów metali odgrywa istotną rolę w procesach biologicznych, np. poprzez kontrolowanie reakcji katalitycznych

[13]. Ze względu na istotną rolę w białkach, enzymach i potencjalnie synergistyczny efekt z lekami, miedź jest jednym z najważniejszych biometali. Kompleksy jonów miedzi(II) z ligandami, takimi jak leki, bardzo często wykazują wzmożone działanie w porównaniu do samych leków. Dodatkowo, miedziowe kompleksy wykazują właściwości przeciwbakteryjne, przeciwnowotworowe, przeciwrzybiczne i przeciwutleniające [40]. Wolne jony miedzi(II) są toksyczne nawet w bardzo niskich stężeniach. Dlatego też ich transport w układach biologicznych jest możliwy tylko w formie kompleksu, gdzie białka i peptydy są najczęstszymi ligandami dla jonów miedzi(II) [41].

#### 4.1. PEPTYDY JAKO POTENCJALNE MIEJSCA WIĄZANIA JONÓW Cu(II)

Peptydy zawierające wiele potencjalnych atomów donorowych stają się bardzo efektywnymi i specyficznymi ligandami dla jonów metali poprzez możliwość tworzenia kompleksów o różnej geometrii i konformacji [12, 42]. Jony miedzi(II) mogą być wiązane przez atom azotu *N*-terminalnej grupy aminowej oraz atom tlenu *C*-końcowej grupy karboksylowej. Dodatkowo w wiązaniu tym mogą uczestniczyć: azot z pierścienia imidazolowego reszty histydylowej, siarka z łańcucha bocznego reszty cysteiny lub metioniny, a także tlen karboksylowy z łańcucha bocznego kwasu asparaginowego bądź glutaminowego, azot reszty aminowej łańcucha bocznego lizyny oraz tlen fenolowy reszty tyrozylowej [42]. Jon miedzi oraz inne jony metali są również zdolne do wymuszenia deprotonacji azotów amidowych z wiązania peptydowego, co dodatkowo zwiększa gamę dostępnych atomów donorowych.

Obecność przynajmniej trzech aminokwasów w sekwencji peptydowej pozwala na wypełnienie sfery koordynacyjnej wokół jonów miedzi(II) w pozycji ekwatorialnej i utworzenie kompleksów o geometrii płaskiego kwadratu. Tworzenie stabilnych chelatowych pierścieni pięcio- i sześciocłonowych wpływa na trwałość powstających kompleksów [43, 44]. Peptydowe kompleksy miedzi(II), w których występuje czteroazotowy model koordynacyjny, są najstabilniejszymi i najtrwałszymi tworzonymi kompleksami [42].

#### 4.2. REAKTYWNOŚĆ PEPTYDOWYCH KOMPLEKSÓW Cu(II)

Koordynacja jonów miedzi(II) z peptydami jest szeroko opisana w literaturze. Wskazuje to na istotną rolę takich układów w przebiegu licznych procesów zachodzących w ludzkim organizmie. Kompleksy miedzi(II) z peptydami mogą uczestniczyć w reakcji Fentona i w obecności  $H_2O_2$  generować rodnik hydroksylowy (Rys. 2) [45].



Rysunek 2. Reakcja Fentona dla kompleksów miedzi(II)  
Figure 2. Fenton reaction for copper(II) complexes

Postuluje się udział powstającego rodnika i innych RFT w procesach chorobotwórczych. Szereg badań skupia się na wyjaśnieniu mechanizmu chorób neurodegeneracyjnych, w które zaangażowane są białka. Jony miedzi(II) przyczyniają się do agregacji  $\beta$ -amyloidu i tworzenia oligomerów, które formują blaszki starcze. Następuje generowanie RFT, które uszkadzają neurony i prowadzą do choroby Alzheimera [46, 47]. Z kolei  $\alpha$ -synukleina przyczynia się do innej choroby neurodegeneracyjnej (choroby Parkinsona), poprzez wiązanie jonów miedzi(II) i tworzenie nadtlenku wodoru [48]. Wykazano także zdolność uczestnictwa peptydu TESHKK pochodzącego z C-terminalnego fragmentu histonu H2A w procesie tworzenia anionorodnika ponadtlenkowego po związaniu jonów miedzi(II) [49]. Opisane w literaturze liczne przykłady peptydowych kompleksów Cu(II), posiadających zdolności tworzenia wolnych rodników, mogą mieć duże znaczenie w poznaniu i zrozumieniu podstaw wielu chorób.

Najnowsze doniesienia literaturowe wskazują na udział kompleksów miedzi(II) z fragmentami głównego białka błony zewnętrznej FomA w generowaniu RFT i ich potencjalnym wpływie na raka jelita grubego. *Fusobacterium nucleatum* migrując z jamy ustnej do jelita grubego koordynuje dostarczane do organizmu wraz z dietą jony miedzi(II). W obecności endogennego nadtlenku wodoru białka powierzchniowe bakterii mogą uczestniczyć w reakcji Fentona i generować RFT. Udowodniono, że dwa fragmenty białka FomA: peptyd Ac-KGHGNG-NH<sub>2</sub> i Ac-PTVHNE-NH<sub>2</sub> wiążą jony miedzi(II) i tworzą stabilne kompleksy w roztworze wodnym. W pH jelita grubego oba peptydy tworzyły trójazotowy model koordynacyjny {N<sub>im</sub>, 2N<sup>-</sup>} z jonem metalu. Dodatkowo kompleksy te w obecności nadtlenku wodoru, kwasu askorbinowego i ich mieszaniny generowały rodnik hydroksylowy, tlen singletowy oraz prawdopodobnie rodnik peroksyłowy.

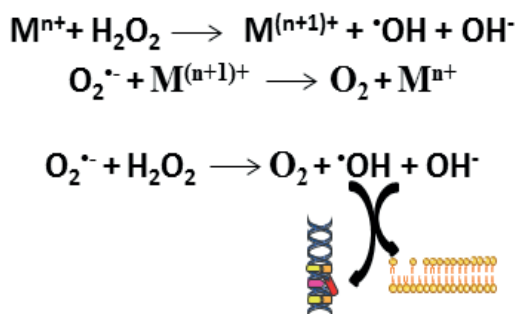
Powstające RFT niszczyły plazmidowe DNA poprzez jedno i dwuniciowe cięcia podwójnej helisy DNA. Uszkodzenia DNA mogą prowadzić do zaburzenia jego funkcjonowania, a w dalszym etapie skutkować np. zapoczątkowaniem procesu kancerogenezy. Ponadto badania wstępne, przeprowadzone na mysiej linii komórkowej raka jelita grubego, potwierdziły zdolność obu kompleksów do stymulowania komórki do tworzenia RFT i stresu oksydacyjnego, w porównaniu do komórek nietraktowanych związkami. Badania wskazują na związek pomiędzy białkami *Fusobacterium nucleatum* i ich kompleksami, a procesem nowotworzenia w jelicie grubym. Białka błony zewnętrznej *Fn* mogą więc przyczynić się do wyjaśnienia niepozanego dokładnie mechanizmu raka jelita grubego z udziałem tej bakterii [50].

## 5. REAKTYWNE FORMY TLENU (RFT) I ICH WPŁYW NA STRUKTURY KOMÓRKOWE

Reaktywne formy tlenu, takie jak rodnik hydroksylowy (<sup>•</sup>OH), anionorodnik ponadtlenkowy (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), tlen singletowy (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>), nadtlenek wodoru (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), rodnik peroksyłowy (ROO<sup>•</sup>), alkoksylowy (RO<sup>•</sup>) są naturalnie produkowane w trakcie

metabolizmu tlenowego komórki. Endogenne RFT powstają w takich organelach komórkowych, jak mitochondrium czy peroksysomy. Do egzogennych czynników sprzyjających ich powstawaniu można natomiast zaliczyć palenie papierosów, spożywanie alkoholu oraz zanieczyszczenia środowiska [51]. Wolne rodniki, które zaliczane są do RFT, mogą również powstawać w reakcji Fentona czy Habera-Weissa. Reakcja ta przebiega pomiędzy jonami metali przejściowych (Cu(I), Cu(II), Fe(II)) lub ich kompleksami, w obecności nadtlenku wodoru (Rys. 3). W trakcie tej reakcji generowany jest wysoce reaktywny rodnik hydroksylowy, który może reagować z każdą otaczającą go cząsteczką [45].

W zdrowym organizmie istnieje równowaga pomiędzy produkcją RFT, a niwelującymi ich działanie przeciwutleniaczami. Zaburzenie tego stanu (nadmiar RFT nad przeciwutleniaczami) skutkuje wystąpieniem stresu oksydacyjnego. Nadmiar RFT w organizmie przyczynia się do niszczenia ważnych biologicznie makromolekuł (białka, lipidy, kwasy nukleinowe), co może prowadzić do zmiany struktury białek, peroksydacji lipidów oraz cięcia podwójnej helisy DNA. Nieprawidłowe funkcjonowanie struktur komórkowych wpływa na pojawienie się stanu chorobowego w ludzkim organizmie [51, 52].



Rysunek 3. Reakcja Fentona i sumaryczna reakcja Habera-Weissa dla jonów metali przejściowych (M-metal)  
Figure 3. Fenton reaction and summary Haber-Weiss reaction for transition metal ions (M-metal)

Choroba Alzheimera, Creutzfeldta-Jakoba, Parkinsona, cukrzyca, miażdżycza czy choroby nowotworowe, to tylko niektóre z licznych chorób będące wynikiem działania stresu oksydacyjnego [53]. Jak udowodniono, oddziaływanie białek błony zewnętrznej *Fusobacterium nucleatum* z jonami miedzi(II) i ich zdolność do produkowania wolnych rodników w obecności utleniaczy może być jedną z dróg prowadzącą do powstawania raka jelita grubego. Określenie zależności pomiędzy tworzeniem RFT przez peptydowe kompleksy miedzi(II), a ich uczestnictwem w wywoływaniu stanu patologicznego stanowi kluczowy aspekt w zapobieganiu licznym chorobom. Daje to szansę na odkrycie nowych leków blokujących powstawanie lub działanie RFT.

## PODZIĘKOWANIE

Praca wykonana w ramach grantu NCN 2014/13/B/ST5/04359

## PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] A.H. Nobbs, H.F. Jenkinson, N.S. Jakobovics, *J. Dent. Res.*, 2011, **90**, 1271.
- [2] M.M.A. Mohammed, V. Kucharowa-Pettersen, A.H. Nerland, H.G. Wiker, V. Bakken, *Anaerobe*, 2017, **44**, 133.
- [3] X. He, W. Hu, Ch. W. Kaplan, L. Guo, W. Shi, R. Lux, *Microb. Ecol.*, 2012, **63**, 532.
- [4] V.L. Silva, C.G. Diniz, D.C. Cara, S.G. Santos, J.R. Nicoli, M.A.R. Carvalho, L.M. Farias, *Microb. Pathog.*, 2005, **39**, 131.
- [5] Y.W. Han, *Curr Opin Microbiol.*, 2015, **23**, 141.
- [6] J. Chhibber-Goel, V. Singhal, D. Bhowmik, R. Vivek, N. Parakh, B. Bhargava, A. Sharma, *Biofilms Microbiomes*, 2017, **7**, 1.
- [7] A. Bhandari, M. Woodhouse, S. Gupta, *J. Investig. Med.*, 2017, **65**, 311.
- [8] E. Yusuf, I. Wybo, D. Pierard, *Anaerobe*, 2016, **39**, 1.
- [9] Ch. W. Kaplan, X. Ma, A. Paranjpe, A. Jewett, R. Lux, S. Kinder-Haake, W. Shi, *Infect. Immun.*, 2010, **78**, 4773.
- [10] C.L. Pocsanschi, H.J. Apell, P. Puntervoll, B. Høgh, H.B. Jensen, W. Welte, J.H. Kleinschmidt, *J. Mol. Biol.*, 2006, **355**, 548.
- [11] S.E. Karpathy, X. Qin, J. Gioia, H. Jiang, Y. Liu, J.F. Petrosino, S. Yerrapragada, G.E. Fox, S. Kinder-Haake, G.M. Weinstick, S.K. Highlander, *PLoS One*, 2007, **8**, 1.
- [12] H. Kozłowski, W. Bal, M. Dyba, T. Kowalik-Jankowska, *Coord. Chem. Rev.*, 1999, **184**, 319.
- [13] L. Rulišek, J. Vondrášek, *J. Inorg. Biochem.*, 1998, **71**, 115.
- [14] P. Kaczmarek, M. Jeżowska-Bojczuk, K. Gatner, W. Bal, *Dalton Trans.*, 2005, **11**, 1985.
- [15] A. Ząbek-Adamska, R. Drożdż, J. W. Naskalski, *Acta Biochim. Pol.*, 2013, **60**, 565.
- [16] C. Cheignon, M. Jones, E. Atrián-Blasco, I. Kieffer, P. Faller, F. Collin, Ch. Hureau, *Chem Sci.*, 2017, **8**, 5107.
- [17] L.A. Rowe, N. Degtyareva, P.W. Doetsch, *Free Radic. Biol. Med.*, 2008, **45**, 1167.
- [18] J.E. Klaunig, Z. Wang, X. Pu, S. Zhou, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2011, **254**, 86.
- [19] M. Bost, S. Houdart, M. Oberli, E. Kalonji, J.F. Huneau, I. Margaritis, *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 2016, **35**, 107.
- [20] N. Abbaspour, R. Hurrell, R. Kelishadi, *J. Res. Med. Sci.*, 2014, **19**, 164.
- [21] P.S. Zilm, A.H. Rogers, *Anaerobe*, 2007, **13**, 146.
- [22] A.M. Edwards, T.J. Grossman, J.D. Rudney, *Infect Immun*, 2006, **74**, 654.
- [23] S. Nithianantham, M. Xu, M. Yamada, A. Ikegami, M. Shoham, Y.W. Han, *J. Biol. Chem.*, 2009, **284**, 3865.
- [24] S.J. Leishman, H.L. Do, P.J. Ford, *J. Oral. Microbiol.*, 2010, **2**, 1.
- [25] K. Nagaoka, K. Yanagihara, Y. Harada, K. Yamada, Y. Migiyama, Y. Morinaga, H. Hasegawa, K. Izumikawa, H. Kakeya, M. Nishimura, S. Kohno, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2013, **57**, 1844.
- [26] A.D. Kostic, E. Chun, L. Robertson, J.N. Glickman, C.A. Gallini, M. Michaud, T.E. Clancy, D.C. Chung, P. Lochhead, G.L. Hold, E.M. El-Omar, D. Brenner, Ch. S. Fuchs, M. Meyerson, W.S. Garrett, *Cell Host Microbe.*, 2014, **14**, 207.

- [27] J. Abed, J.E.M. Emgård, G. Zamir, M. Faroja, G. Almogy, A. Grenov, A. Sol, R. Naor, E. Pikarsky, K.A. Atlan, A. Mellul, S. Chaushu, A.L. Manson, A.M. Earl, N. Ou, C.A. Brennan, W.S. Garrett, G. Bachrach, *Cell Host Microbe.*, 2016, **20**, 215.
- [28] R.L. Siegel, K.D. Miller, S.A. Fedewa, D.J. Ahnen, R.G.S. Meester, A. Barzi, A. Jemal, *Ca. Cancer. J. Clin.*, 2017, **67**, 177.
- [29] A.D. Kostic, D. Gevers, Ch.S. Pedomallu, M. Michaud, F. Duke, A.M. Earl, A. Ojesina, J. Jung, A.J. Bass, J. Taberero, J. Baselga, Ch. Liu, R.A. Shivdasani, S. Ogino, B.W. Birren, C. Huttenhower, W.S. Garrett, M. Meyerson, *Genome Res.*, 2012, **22**, 292.
- [30] M. Castellarin, R.L. Warren, J.D. Freeman, L. Dreolini, M. Krzywinski, J. Strauss, R. Barnes, P. Watson, E. Allen-Vercoe, R.A. Moore, R.A. Holt, *Genome Res.*, 2012, **22**, 299.
- [31] M.R. Rubinstein, X. Wang, W. Liu, Y. Hao, G. Cai, Y.W. Han, *Cell. Host. Microbe.*, 2013, **14**, 195.
- [32] A.R. Horwitz, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 2012, **13**, 805.
- [33] C. Choithia, E.Y. Jones, *Annu. Rev. Biochem.*, 1997, **66**, 823.
- [34] P.E. Kolenbrander, R.N. Andersen, D.S. Blehert, P.G. Eglund, J.S. Foster, R.J. Palmer, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2002, **66**, 486.
- [35] N. Ohtani, *Semin. Immunopathol.*, 2015, **37**, 65.
- [36] B.P. Lima, W. Shi, R. Lux, *Microbiologyopen*, 2016, **6**, 1.
- [37] Ch. Gur, Y. Ibrahim, B. Isaacson, R. Yamin, J. Abed, M. Gamliel, J. Enk, Y. Bar-On, N. Stanietzky-Kaynan, S. Copenhagen-Glazer, N. Shussman, G. Almogy, A. Cuapio, E. Hofer, D. Mevorach, A. Tabib, R. Ortenberg, G. Markel, K. Mikli, S. Jonjic, C. A. Brennan, W. S. Garrett, G. Bachrach, O. Mandelboim, *Immunity*, 2015, **42**, 344.
- [38] H. Kleivdal, P. Puntervoll, H.B. Jensen, *Microbiology*, 2001, **147**, 1059.
- [39] S.K. Haake, X. Wang, *Arch. Oral. Biol.*, 1997, **42**, 19.
- [40] Ch. Tolia, A.N. Papadopoulos, C.P. Raptopoulou, V. Psycharis, C. Garino, L. Salassa, G. Psomas, *J. Inorg. Biochem.*, 2013, **123**, 53.
- [41] A. Matera, J. Brasuń, M. Cebrat, J. Świątek-Kozłowska, *Polyhedron*, 2008, **27**, 1539.
- [42] J. Nagaj, K. Stokowa-Sołtys, I. Zawisza, M. Jeżowska-Bojczuk, A. Bonna, W. Bał, *J. Inorg. Biochem.*, 2013, **119**, 859.
- [43] R.R. Khoury, G.J. Sutton, D. Ebrahimi, D.B. Hibbert, *Inorg. Chem.*, 2014, **53**, 1278.
- [44] J. Brasuń, H. Czapor, A. Matera-Witkiewicz, A. Kotynia, A. Sochacka, M. Cebrat, *Dalton Trans.*, 2010, **39**, 6518.
- [45] K. Jomova, M. Valko, *Toxicol.*, 2011, **283**, 65.
- [46] T. Kowalik-Jankowska, M. Ruta-Dolejsz, K. Wiśniewska, L. Łankiewicz, *J. Inorg. Biochem.*, 2002, **92**, 1.
- [47] P. Faller, *Chem. Bio. Chem.*, 2009, **10**, 2837.
- [48] Ch. Wang, L. Liu, L. Zhang, Y. Peng, F. Zhou, *Biochem.*, 2010, **49**, 8134.
- [49] M. Mylonas, G. Malandrinos, J. Plakatouras, N. Hadjiliadis, K.S. Kasprzak, A. Krężel, W. Bał, *Chem. Res. Toxicol.*, 2001, **14**, 1177.
- [50] M.K. Lesiów, U.K. Komarnicka, K. Stokowa-Sołtys, K. Rolka, A. Łęgowska, N. Ptaszyńska, R. Wiczorek, A. Kyzioł, M. Jeżowska-Bojczuk, *Dalton Trans.*, 2018, (in press).
- [51] S. Prasad, S.C. Gupta, A.K. Tyagi, *Cancer Lett.*, 2017, **387**, 95.
- [52] S.Y. Kim, O. J. Kwon, J. Park, *Biochimie.*, 2001, **83**, 437.
- [53] A. Szwed, K. Miłowska, *Postepy Hig. Med. Dosw.*, 2012, **66**, 187.

\* Katarzyna Krupa i Monika K. Lesiów w równym stopniu przyczyniły się do opracowania tej publikacji i powinny być uważane za pierwszych autorów.



# PEPTYDY JAKO POTENCJALNE LIGANDY WIĄŻĄCE JONY METALI PRZEJŚCIOWYCH

## PEPTIDES AS POTENTIAL LIGANDS BINDING TRANSITION METAL IONS

**Katarzyna Krupa\***, **Monika K. Lesiów\***,  
**Teresa Kowalik-Jankowska**

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

*\*e-mail: katarzyna.krupa@chem.uni.wroc.pl, monika.lesiow@chem.uni.wroc.pl*

---

*Pracę dedykujemy pamięci Pani Profesor Małgorzaty Jeżowskiej-Bojczuk*

---

### Abstract

#### Wprowadzenie

1. Peptydy jako ligandy wiążące jony metali przejściowych
2. Reszty aminokwasowe biorące udział w procesie koordynacji jonów metali
3. Wpływ różnych czynników na sposób koordynacji
  - 3.1. Blokada grupy aminowej lub karboksylowej (N- lub C-końcowej) peptydu
  - 3.2. Obecność niekoordynujących i koordynujących łańcuchów bocznych w sekwencji peptydu
  - 3.3. Pozycja reszty histydylowej w sekwencji aminokwasowej peptydu
  - 3.4. Wpływ ilości reszt histydylowych na trwałość tworzących się kompleksów
4. Aktywność biologiczna peptydowych kompleksów z jonami metali przejściowych

Piśmiennictwo cytowane

---

**mgr Katarzyna Krupa** – w latach 2010–2015 studiowała na Wydziale Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego uzyskując w 2015 roku tytuł magistra. Obecnie doktorantka stacjonarnych studiów doktoranckich chemii na Wydziale Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego. Jej zainteresowania naukowe skupiają się wokół biologicznej chemii nieorganicznej.

**mgr Monika Katarzyna Lesiów** – w latach 2010–2015 studiowała na Wydziale Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego uzyskując w 2015 roku tytuł magistra. Obecnie doktorantka stacjonarnych studiów doktoranckich chemii na Wydziale Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego. Jej zainteresowania naukowe skupiają się wokół chemii bionieorganicznej oraz medycznej.

**prof. dr hab. Teresa Kowalik-Jankowska** – ukończyła studia na Wydziale Matematyki, Fizyki, Chemii i Astronomii Uniwersytetu Wrocławskiego. Uzyskała stopień doktora i doktora habilitowanego na rodzimej uczelni. Obecnie jako profesor zwyczajny pracuje na Wydziale Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego. Zainteresowania w pracy naukowej koncentrują się na oddziaływaniu jonów metali ( $\text{Cu}^{2+}$ ) z ligandami o znaczeniu biologicznym.

---

**ABSTRACT**

Peptides are crucial ligands for transition metal ions and form complexes with them, that can have important biological activity. Many factors impact on the creation of complexes such as: protection of amine group from *N*-terminal or carboxylate group from *C*-terminals of the protein, the presence of noncoordinating and coordinating side chains in the peptide sequence, the number of histidyl residues and their location in the peptide chain. In complexes the metal ion can be bound by various donor atoms from amino acids residues (*e.g.* nitrogen, oxygen or sulphur). In general, the protection of *N*- or *C*-terminal groups influences the less stable formation of complexes. Stable complexes are created, if the free amine group from the *N*-terminal is involved in the coordination process. Peptides with noncoordinating side chains include alanine or glycine. Glycine complexes are more stable than these with alanine. Histidyl residue is the most effective amino acid residue in binding metal ions. The amine group of the lysyl residue, thiol from cysteine or carboxylate from aspartyl or glutamyl residues are also functional groups that coordinate metal ions. The coordination process is initiated by a group that anchors metal ion. A free amine group from *N*-terminus or imidazole nitrogen are the best examples of anchor groups. The metal ions can also be bound through amide nitrogens, after their forced deprotonation by the anchor group and formation of chelate rings. Peptides containing two or more histidyl residues exhibit high structural diversity in the complexes formation. In addition, these peptides can also form macrochelates and polynuclear complexes. The location of amino acid residues in the peptide chain (especially histidyl residue) also results in the thermodynamically stable formation of complexes.

Keywords: peptides, histidine residue, metal complexes, coordination mode

Słowa kluczowe: peptydy, reszta histydyłowa, kompleksy metali, model koordynacyjny

---

---

## WPROWADZENIE

Jony metali przejściowych są niezbędne do prawidłowego funkcjonowania organizmu. Biorą udział w wielu procesach biochemicznych, np.: oddychaniu komórkowym, reakcjach enzymatycznych i przekazywaniu impulsów nerwowych [1, 2]. W przestrzeni międzykomórkowej nie występują w wolnej formie, lecz najczęściej są związane przez aminokwasy, peptydy lub białka [3, 4]. Skompleksowanie jonu metalu może skutkować różnymi właściwościami powstających kompleksów, np. ich aktywnością biologiczną.

Białka lub peptydy posiadające wiele potencjalnych atomów donorowych, zdolnych do wiązania jonów metali, są dla nich idealnymi i specyficznymi ligandami. Azot oraz tlen wchodzące w skład głównego łańcucha peptydowego są najczęstszymi atomami donorowymi dla takich jonów metali, jak: Cu(II), Ni(II) czy Zn(II) [5, 6]. Dodatkowo, niektóre aminokwasy posiadają koordynujący łańcuch boczny, który jest zdolny do tworzenia wiązań koordynacyjnych z jonem metalu. Najbardziej efektywnym donorem jest, jak się wydaje imidazolowy azot reszty histydylowej [7]. Sekwencje bogate w reszty histydylowe oraz multi-histydylowe są najbardziej charakterystycznymi motywami w białkach wiążących jony Cu(II). Co ciekawe, pozycja tej reszty aminokwasowej w sekwencji peptydowej ma duży wpływ na rodzaj tworzącego się kompleksu oraz jego trwałość. Dla reszt aminokwasowych zawierających niekoordynujący łańcuch boczny istotną rolę w kotwiczeniu jonów metali przejściowych pełni *N*-terminalna grupa aminowa. Ułożenie przestrzenne reszt aminokwasowych wokół centrum metalicznego ma wpływ na aktywność powstających kompleksów. Oddziaływania kation- $\pi$  miedziowych kompleksów zawierających hydrofobowe, aromatyczne pierścienie tryptofanu, tyrozyny czy fenyloalaniny decydują o ich aktywności redoks. Odgrywają one również istotną rolę w stabilizowaniu struktury białek [6, 8, 9].

### 1. PEPTYDY JAKO LIGANDY WIĄŻĄCE JONY METALI PRZEJŚCIOWYCH

Peptydy są efektywnymi ligandami zawierającymi reszty aminokwasowe zdolnymi do koordynowania jonów metali przejściowych. Ich związanie może powodować zmianę struktury powstałych kompleksów oraz specyficzne ułożenie łańcuchów bocznych reszt aminokwasowych [10, 11].

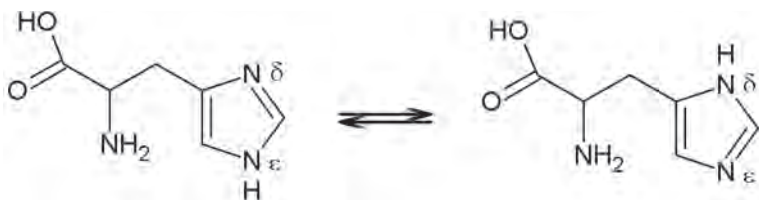
Stabilność peptydowych kompleksów ma fundamentalne znaczenie w projektowaniu biologicznie aktywnych kompleksów. Pozwala ona na zrozumienie i wyjaśnienie procesów biologicznych [4]. Czynnikiem wpływającymi na trwałość powstających kompleksów są: rodzaj jonu metalu, zdolność do tworzenia trwałych pierścieni chelatowych, a także możliwość tworzenia silnych wiązań koordynacyjnych jonu metalu z atomem donorowym reszty aminokwasowej [12].

Najbardziej efektywna w wiązaniu jonów metali jest reszta histydylowa, której rola została szeroko opisana w literaturze [3]. Ponadto, lizyna, kwas glutaminowy

i asparaginy, cysteina czy metionina to przykłady innych aminokwasów potencjalnie wiążących jony metali. Proces koordynacji rozpoczyna się poprzez zakotwiczenie jonu metalu przez atom donorowy reszty aminokwasowej, pochodzący z głównego bądź bocznego łańcucha peptydowego. Donorami mogą być: atom azotu, tlenu czy siarki. Co ważne, możliwe jest wymuszenie deprotonacji azotów amidowych, pochodzących z wiązań peptydowych przez wcześniejsze związanie się jonu metalu do innych ugrupowań i utworzenie 5- bądź 6-członowych pierścieni chelatowych. Blokada grup końcowych, obecność łańcuchów bocznych zdolnych do koordynacji, pozycja reszty aminokwasowej w sekwencji łańcucha peptydowego oraz jej ilość mogą wpływać na sposób wiązania jonów metali do fragmentów białek. Jeśli peptyd posiada wolną grupę aminową na *N*-końcu, to bierze ona udział w procesie koordynacji. Zablockowanie tej grupy, uniemożliwia ten proces [7].

## 2. RESZTY AMINOKWASOWE BIORĄCE UDZIAŁ W PROCESIE KOORDYNACJI JONÓW METALI

Peptydy zawierające reszty aminokwasowe, takie jak histydyna, lizyna, kwas asparaginy, cysteina, posiadające wiele atomów donorowych (azot z pierścienia imidazolowego, azot *N*-końcowej grupy aminowej, tlen grupy karboksylowej lub karbonylowej, siarka z ugrupowania tiolowego) są idealnymi ligandami dla jonów metali przejściowych, (m.in. Cu(II), Ni(II), Zn(II)) [11, 13, 14]. Spośród wyżej wymienionych, to właśnie histydyna jest najefektywniejszym aminokwasem, mającym aż trzy miejsca donorowe zdolne do wiązania jonów metali (azot grupy aminowej, tlen grupy karboksylowej oraz azot z pierścienia imidazolowego). Dzięki temu możliwe jest utworzenie dwóch trwałych termodynamicznie pierścieni chelatowych 5- i 6-członowego [10]. Dzięki występowaniu zjawiska tautomerii jon metalu może być wiązany zarówno przez atom azotu:  $\delta N$ , jak i  $\epsilon N$ , pochodzący z pierścienia imidazolowego (Rys. 1) [11].



Rysunek 1. Wzór strukturalny histydyny  
Figure 1. Structural formula of histidine

### 3. WPŁYW RÓŻNYCH CZYNNIKÓW NA SPOSÓB KOORDYNACJI

#### 3.1. BLOKADA GRUPY AMINOWEJ LUB KARBOKSYLOWEJ (N- LUB C-KOŃCOWEJ) PEPTYDU

Protekcja *N*-końcowej grupy aminowej bądź *C*-końcowej grupy karboksylowej ma istotny wpływ na przebieg procesu koordynacji jonu metalu do peptydu. Szczególnie istotna okazuje się *N*-końcowa grupa aminowa. Jeśli jest ona wolna, bardzo często działa jako ugrupowanie kotwiczące jon metalu. Jeśli zostanie zablokowana, np. przez acetylację ( $-\text{COCH}_3$ ), koordynację musi rozpocząć donor łańcucha bocznego reszty aminokwasowej zdolnej do wiązania jonu metalu [5, 15]. Jak się okazuje, uczestnictwo wolnej grupy aminowej ma duży wpływ na stabilność powstających kompleksów. Najbardziej stabilnymi kompleksami metali są te, w których w proces wiązania zaangażowana jest wolna *N*-końcowa grupa aminowa. W literaturze opisano model koordynacyjny dwóch fragmentów białka angiogeniny z jonami Cu(II). Wybrane fragmenty różnią się jedynie tym, że jeden posiada wolną grupę aminową na *N*-końcu (Ang(1-17)), a drugi *N*-blokującą grupę acetylową (Ac(Ang1-17)). Istotna różnica występuje w grupie kotwiczącej jon Cu(II). W Ang(1-17) to wolna grupa aminowa z *N*-końca rozpoczyna proces koordynacji jonu metalu, natomiast azot z ugrupowania imidazolowego jest potencjalnym miejscem kotwiczenia w AcAng(1-17). Miareczkowanie potencjometryczne pozwoliło na wyznaczenie stałych dysocjacji ligandów oraz stałych trwałości dla obu kompleksów [16]. Porównanie wartości stałych jasno wskazuje, że powstające kompleksy dla peptydu z niezablokowaną terminalną grupą aminową są trwalsze, w porównaniu do tych z zablokowaną grupą [17]. Najczęściej występujące sposoby wiązania peptydowych kompleksów Cu(II), Ni(II) z wolną grupą aminową oraz zawierających resztę histydyny to: 1)  $\{\text{NH}_2, \text{N}_{\text{im}}^-\}$  – model histaminowy, 2)  $\{\text{NH}_2, \text{N}_{\text{am}}^-, \text{N}_{\text{im}}^-\}$  – model Gly-His. W przypadku peptydów o dłuższej sekwencji aminokwasowej zazwyczaj obserwuje się sposób wiązania  $\{\text{NH}_2, \text{N}_{\text{am}}^-, \text{N}_{\text{am}}^-, \text{N}_{\text{im}}^-\}$  dla sekwencji Xaa-Yaa-His lub  $\{\text{N}_{\text{am}}^-, \text{N}_{\text{am}}^-, \text{N}_{\text{am}}^-, \text{N}_{\text{im}}^-\}$  dla peptydów *N*-acylowych zawierających resztę histydyny [9].

#### 3.2. OBECNOŚĆ NIEKOORDYNUJĄCYCH I KOORDYNUJĄCYCH ŁAŃCUCHÓW BOCZNYCH W SEKWENCJI PEPTYDU

Aminokwasy posiadają charakterystyczne łańcuchy boczne różniące się rozmiarem, kształtem, ładunkiem, zdolnością do tworzenia wiązań wodorowych oraz reaktywnością chemiczną [18]. Ich sfunkcjonalizowane łańcuchy boczne są szczególnie ważne, ponieważ warunkują aktywność centrów enzymów. W roztworze jony metali przejściowych, tj. Cu(II), Pd(II) i Ni(II) reagują z peptydami, które zawierają aromatyczne oraz alifatyczne łańcuchy boczne. Jeśli są one rozgałęzione tak jak w leucynie, tryptofanie, tyrozynie oraz są usytuowane w sąsiedztwie pierścienia chelatowego, mogą oddziaływać z jonem metalu.

W koordynacji jonów metali przejściowych mogą brać udział zarówno aminokwasy posiadające koordynujący, jak i niekoordynujący łańcuch boczny. Peptydy z niekoordynującymi łańcuchami bocznymi mają tylko trzy lub cztery typy centrów donorowych dostępnych dla jonu metalu. Są to: aminowy lub amidowy atom azotu i karbonylowy lub karboksylowy atom tlenu. Najważniejszym z nich atomem donorowym jest *N*-terminalny azot. Sąsiadujący tlen karbonylowy jest drugim atomem donorowym uzupełniającym pierścień chelatowy [13]. Wraz ze wzrostem wartości pH, jony Cu(II) są zdolne do sukcesywnej deprotonacji azotów peptydowych tworząc wiązania Cu-N-. Oligopeptydy składające się z glicyny lub alaniny są dobrymi przykładami prostych peptydów z niekoordynującymi łańcuchami bocznymi. Wiązanie jonów Cu(II) lub Ni(II) do tych peptydów zaczyna się przez *N*-terminalną grupę aminową, która działa jako miejsce kotwiczące, chroniąc jednocześnie przed hydrolizą jonu metalu. Peptydy oparte na motywie glicylowym tworzą silniejsze kompleksy niż ich odpowiedniki alaninowe [10]. Peptyd NSF<sub>2</sub>RY-NH<sub>2</sub> jest najbardziej efektywnym ligandem dla jonów Cu(II) spośród wszystkich oligopeptydów z niekoordynującymi łańcuchami bocznymi. Stałe trwałości dla kompleksów, w których jon metalu skoordynowany jest przez cztery atomy azotu (4N), są prawie pięć rzędów wyższe, w porównaniu do pentaalaniny [19]. Ponadto badania kompleksów Cu(II) i Ni(II) z peptydowymi fragmentami białka prionowego dowiodły, że obecność niekoordynujących łańcuchów bocznych wpływa na stosunek izomerów koordynacyjnych. Aromatyczne pierścienie fenyloalaniny, tyrozyny lub tryptofanu czy alifatyczne hydrofobowe łańcuchy reszt aminokwasowych mogą zwiększać stabilność kompleksu przez bezpośrednie interakcje elektronowe z jodem metalu, „*stacking*” pomiędzy dwoma pierścieniami aromatycznymi lub efekty hydrofobowe [15, 19, 20, 21].

Wysokie powinowactwo peptydowych ligandów do wiązania jonów metali wymaga obecności silnie koordynujących łańcuchów bocznych zawierających ugrupowania karboksylowe, karbonylowe, tiolowe lub imidazolowe. Peptydowe fragmenty hormonu tymopoetyny działają jako najprostsze modele do badania wpływu grupy karboksylowej z łańcucha bocznego reszty kwasu asparaginowego na proces tworzenia kompleksów. Obecność grupy β-COO- kwasu asparaginowego w sekwencji aminokwasowej peptydu zawsze zwiększa termodynamiczną stabilność kompleksów. Ponadto, grupa β-karboksylowa reszty kwasu asparaginowego (Asp) chroni ligand przed deprotonacją kolejnych azotów amidowych. Jeśli kwas asparaginowy jest usytuowany w trzeciej pozycji łańcucha peptydowego (Xaa-Xaa-Asp-Xaa), wówczas tworzy się w wysokich wartościach pH kompleks, w którym jony Cu(II) skoordynowane są przez trzy atomy azotu {NH<sub>2</sub>, N<sub>am</sub><sup>-</sup>, N<sub>am</sub><sup>-</sup>} oraz atom tlenu grupy karboksylowej. Doniesienia literaturowe wskazują na większą rolę stabilizującą grupy β-COO- pochodzącej z kwasu asparaginowego niż kwasu glutaminowego [22].

Łańcuch boczny reszty lizylowej odgrywa znaczącą rolę w procesie koordynacji jonu metalu. Grupa ε-NH<sub>2</sub> z łańcucha bocznego reszty lizylowej jest potencjal-

nym miejscem wiążącym jon metalu, jednak grupa ta nie może współzawodniczyć z silnymi atomami donorowymi reszty histydylowej czy kwasu asparaginowego. Co interesujące, wyniki uzyskane dla dipeptydów z resztą lizylową (Gly-Lys, His-Lys, Ala-Lys) pokazują, że grupa  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> może mieć istotne znaczenie w tworzeniu mostków w dijadrowych kompleksach. Badania potencjometryczne często wskazują na obniżenie wartości pK<sub>a</sub> reszty lizylowej w kompleksie w porównaniu z wartością pK<sub>a</sub> tej grupy w wolnym ligandzie. Nie oznacza to jednak, że reszta ta bezpośrednio bierze udział w wiązaniu jonu metalu, a jedynie znajduje się ona blisko centrum koordynacji [23, 24].

Grupa tiolowa reszty cysteinyłowej wykazuje największe powinowactwo do jonów Zn(II). Takie kompleksy odgrywają istotną rolę w zmianie struktury peptydu i ich aktywności biologicznej. Przykładem kompleksu, w którym reszty cysteinyłowe wiążą jon Zn(II), jest palec cynkowy Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub>. Jest to szczególnie ważna klasa białek wiążąca jony tego metalu, oddziałująca z DNA i kontrolująca ekspresję genów. W palcu cynkowym (Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub>) centrum koordynacyjne tworzą dwa wiązania jonu Zn(II) z atomami siarki reszt cysteinyłowych i dwa imidazolowe atomy azotu reszt histydyłowych [25].

### 3.3. POZYCJA RESZTY HISTYDYLOWEJ W SEKWENCJI AMINOKWASOWEJ PEPTYDU

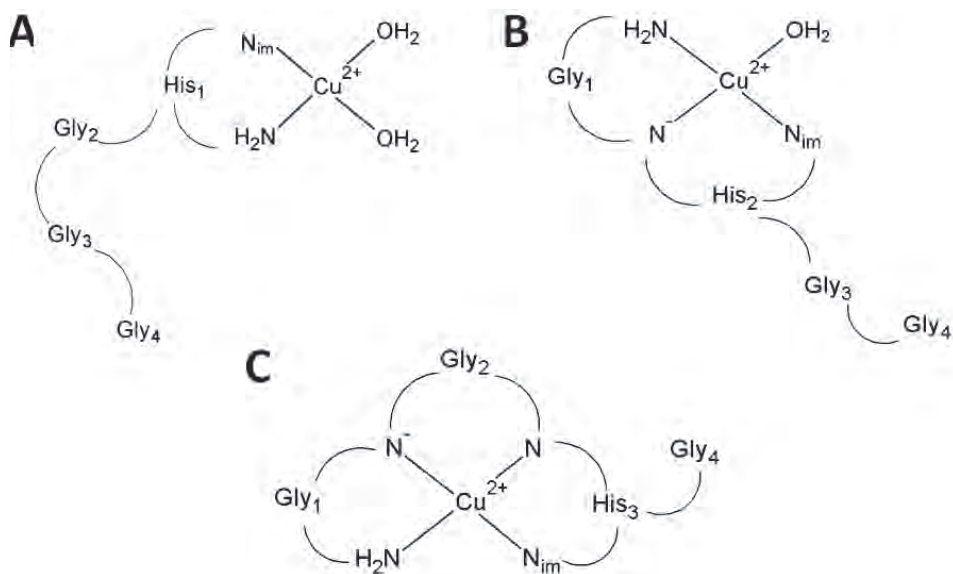
Zdolność peptydu do wiązania jonów metalu silnie zależy od pozycji reszty histydyłowej w sekwencji aminokwasowej peptydu. Imidazolowy atom azotu działa zazwyczaj jako grupa kotwicząca jon metalu. W peptydach z wolnym *N*-końcem grupa aminowa często konkuruje z imidazolem o pierwszeństwo w wiązaniu jonu Cu(II). Co więcej, oba atomy azotów tych grup, usytuowane blisko siebie, mogą tworzyć efektywne makrochelaty [10].

Peptydy o dłuższym łańcuchu głównym, zawierającym resztę histydyłową w pierwszej pozycji (**His1**) sekwencji aminokwasowej mogą tworzyć dimeryczne kompleksy. Zablokowanie *N*-końcowej grupy powoduje jednoczesne rozpoczęcie procesu koordynacji przez imidazolowy atom azotu i dwa lub trzy azoty amidowe. Prowadzi to do powstawania termodynamicznie mniej stabilnych 7-członowych pierścieni chelatowych i jednego lub dwóch stabilnych 5-członowych pierścieni, jeśli koordynacja imidazolowego atomu azotu reszty histydyliny zachodzi w kierunku *C*-końca. Jeśli koordynacja azotu imidazolowego zachodzi w kierunku *N*-końca, wówczas tworzy się stabilniejszy pierścień 6-członowy [10, 26].

Reszta histydyłowa w drugiej pozycji (**His2**) łańcucha peptydowego z niezablokowaną *N*-terminalną grupą umożliwia jednoczesne zaangażowanie azotu aminowego, imidazolowego i amidowego w wiązanie jonu Cu(II). W zakresie pH od 4–9 dominującym kompleksem jest CuH<sub>-1</sub>L z następującym sposobem koordynacji: {NH<sub>2</sub>, N<sub>am</sub><sup>-</sup>, N<sub>im</sub><sup>-</sup>}. Bardzo wysoka trwałość tego kompleksu wynika z tworzenia 5- i 6-członowego pierścienia chelatowego [5].



Peptydy zawierające zablokowaną grupę aminową na *N*-końcu oraz resztę histydylową w trzeciej pozycji (**His3**) wykazują szczególne powinowactwo do jonów Cu(II), wynikające ze zdolności do tworzenia trzech pierścieni chelatowych, będących wynikiem koordynacji Cu(II) do czterech atomów azotu (4N) {N<sub>im</sub>, N<sub>am</sub><sup>-</sup>, N<sub>am</sub><sup>-</sup>, N<sub>am</sub><sup>-</sup>}. Natomiast peptydy z wolną *N*-końcową grupą aminową działają jak motyw ATCUN. Sekwencje aminokwasowe oparte na tym motywie często tworzą kompleksy o następującym sposobie wiązania: 4N {NH<sub>2</sub>, N<sub>am</sub><sup>-</sup>, N<sub>am</sub><sup>-</sup>, N<sub>im</sub>} z trzema termodynamicznie stabilnymi pierścieniami chelatowymi (jeden pierścień 6-członowy i dwa 5-członowe). Tworzone w ten sposób czteroazotowe kompleksy {NH<sub>2</sub>, N<sub>am</sub><sup>-</sup>, N<sub>am</sub><sup>-</sup>, N<sub>im</sub>} są najbardziej trwałe spośród wszystkich kompleksów tworzonych przez ligandy peptydowe. Kompleksy Ni(II) są bardzo podobne do tworzonych przez jony Cu(II) [5, 8, 10, 26].



Rysunek 2. Struktury kompleksów Cu(II) z peptydami zawierającymi resztę histydyny w różnych pozycjach sekwencji aminokwasowej A) His-Gly-Gly-Gly (CuL), B) Gly-His-Gly-Gly (CuH<sub>1</sub>L), C) Gly-Gly-His-Gly (CuH<sub>2</sub>L)

Figure 2. Structures of Cu(II) complexes with peptides containing a histidine residue in different positions of amino acid sequence A) His-Gly-Gly-Gly (CuL), B) Gly-His-Gly-Gly (CuH<sub>1</sub>L), C) Gly-Gly-His-Gly (CuH<sub>2</sub>L)

### 3.4. WPŁYW ILOŚCI RESZT HISTYDYLOWYCH NA TRWAŁOŚĆ TWORZĄCYCH SIĘ KOMPLEKSÓW

Peptydy zawierające dwie lub więcej reszt histydylowych wykazują bardzo wysoką różnorodność strukturalną w reakcjach tworzenia kompleksów z jonami metali. Umożliwiają one tworzenie się makrochelatów i/lub polijądrowych kompleksów [5]. Multihistydynowe peptydy są często obiecującymi modelami naśla-

dującymi strukturę i aktywność katalityczną różnych metalo-enzymów, (np.: Cu, Zn-SOD i oksydazy zawierające miedź). Polihistydylowe regiony tworzą stabilne kompleksy z jonami metalu, tj.: Cu(II), Ni(II) i Zn(II) [3, 26]. W blokowanych peptydach na *N*-końcu z grupą acylową z motywem His-His (Ac-GHHRHG i Ac-HHGHRG) koordynacja jonu Cu(II) rozpoczyna się poprzez tworzenie kompleksu zawierającego imidazolowy atom azotu w sferze koordynacji jonu metalu (1N). Dla peptydów typu His-Xaa-His (Ac-HRHGHG i Ac-HGHRHG) najpierw tworzy się kompleks, w którym jony metalu wiązane są przez dwa imidazolowe atomy azotu reszt histydyny (2N).

His-His jest najprostszym peptydem posiadającym więcej niż jedną resztę histydylową. W pH 4 dominującą formą jest CuHL z histaminowym typem koordynacji  $\{NH_2, N_{im}^-\}$ . W zakresie pH 5–6 tworzy się kompleks CuL z następującym sposobem wiązania jonów Cu(II):  $\{NH_2, N_{am}^-, N_{im}^-\}$ . W pH około 7 tworzy się dimer karnozynowy  $Cu_2H_2L_2$ . W peptydach z dwoma resztami histydylowymi acetylacja grupy aminowej ma duży wpływ na struktury tworzących się kompleksów [3]. W ligandzie Ac-11-16H (Ac-EVHHQK-NH<sub>2</sub>) imidazolowy atom azotu działa jako miejsce kotwiczące. W zakresie pH od 4–7 jon Cu(II) jest związany przez dwa azoty imidazolowe  $\{N_{im}^-, N_{im}^-\}$ , a wraz ze wzrostem pH azoty amidowe uczestniczą w procesie koordynacji jonów metali. Rozdzielenie dwóch reszt histydylowych resztą aminokwasową (His-Xaa-His, Xaa-His-Yaa-His) zmienia zdolności koordynacyjne tych peptydów. Dla His-Gly-His-Gly dominującą formą w roztworze jest czteroazotowy kompleks  $CuH_2L$   $\{NH_2, N_{am}^-, N_{am}^-, N_{im}^-\}$ . *N*-terminalna grupa aminowa wraz z ugrupowaniem imidazolowym jest zaangażowana w tworzenie kompleksów miedzi z pentadeca peptydami, zawierającymi reszty histydylowe, rozdzielone między sobą dwoma resztami aminokwasowymi. Przykładem peptydu z takim sposobem koordynacji jest 114–128 fragment białka SPARC- TLEDTKKGHKLHLDY oparty na motywie His-Xaa-Yaa-His. Acetylacja grupy aminowej indukuje tworzenie się kompleksów z zaangażowaniem dwóch reszt histydylowych [8].

#### 4. AKTYWNOŚĆ BIOLOGICZNA PEPTYDOWYCH KOMPLEKSÓW Z JONAMI METALI PRZEJŚCIOWYCH

Kompleksy metali przejściowych odgrywają istotną rolę w dziedzinach naukowych, takich jak medycyna, biologia oraz farmacja. Jony metali mogą mieć istotny wpływ na strukturę naturalnych i syntetycznych oligopeptydów i ich aktywność biologiczną [27, 28]. Ponadto, peptydowe kompleksy Cu(II) mogą być bardziej odporne na enzymatyczną degradację, w porównaniu do wolnych ligandów [29]. Kompleksy Cu(II) z amyloidem  $\beta$  ( $A\beta$ ) mają istotne znaczenie w inicjowaniu chorób neurodegeneracyjnych (szczególnie choroby Alzheimer) [4].  $A\beta$  może koordynować jony metali przejściowych, tj.: Cu(II), Fe(II), Zn(II) i tworzyć z nimi aktywne kompleksy. Jak udowodniono, przyczyniają się one do generowania reaktywnych form tlenu (RFT) w mózgu. Zaburzenie równowagi pomiędzy produkcją RFT, a działaniem

przeciwnutleniający może prowadzić do stresu oksydacyjnego, który przyczynia się do inicjowania chorób neurodegeneracyjnych [3].

Kompleksy Cu(II) z di-, tri i tetra- peptydami, zawierającymi tylko reszty glicylowe (GG, GGG i GGGG) i histydylowe w różnej pozycji (HGG, GHG, GGH i GGHG), wykazują aktywność dysmutazy ponadtlenkowej [30]. Wygaszają one toksyczny anionorodnik ponadtlenkowy produkowany w wielu układach biologicznych.

Neb-kolostatyna jest peptydem o następującej sekwencji aminokwasowej: SIVPLGLPVPVIGPIVVGPR, indukującym apoptozę w komórkach Mącznika młynarka. Jest to szkodnik powszechnie występujący w Stanach Zjednoczonych, dodatkowo wywołujący liczne alergie [31]. Kompleksy Cu(II) z Neb-kolostatyną wykazują silniejszą aktywność proapoptyczną na hemocyty owadów, w porównaniu do wolnych peptydów [32].

*Fusobacterium nucleatum* (*Fn*) jest beztlenową Gram-ujemną bakterią, bytującą w jamie ustnej człowieka. Jej obecność wiązana jest z wieloma chorobami, takimi jak: choroby płuc, przyzębia, zespół Lemierre'a oraz nowotwory. Dowiedzono, że istnieje związek pomiędzy tą bakterią, a rakiem jelita grubego. Peptydowe kompleksy Cu(II) z fragmentami białek błony zewnętrznej *Fn* (FadA i FomA) w obecności nadtlenu wodoru generują reaktywne formy tlenu (RFT). Niszczą one ważne biologicznie makromolekuły np. DNA, co może przyczyniać się do procesów mutagenyzy, a następnie prowadzić do kancerogenezy [33, 34].

Peptyd –TESHHK- wiążąc efektywnie jony Cu(II) i Ni(II) tworzy stabilne kompleksy zdolne do generowania RFT. Poprzez generację rodnika tlenowego dochodzi do indukowania promutagennej 8-okso-2'-deoksyguanozyny. Badania te dostarczają informacji na temat mechanizmów toksyczności peptydowych kompleksów z jonami metali przejściowych [35].

#### PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] Z. Wu, F.A. Fernandez-Lima, D.H. Russell, *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.*, 2010, **21**, 522.
- [2] K. Zavitsanos, A.M. Nunes, G. Malandrinos, N. Hadjiliadis, *J. Inorg. Biochem.*, 2011, **105**, 102.
- [3] J. Wątyły, A. Hecel, M. Rowińska-Żyrek, H. Kozłowski, *Inorg. Chim. Acta.*, 2018, **472**, 119.
- [4] T. Kowalik-Jankowska, M. Ruta, K. Wiśniewska, L. Łankiewicz, *J. Inorg. Biochem.*, 2003, **95**, 270.
- [5] J. Wątyły, A. Hecel, P. Kołkowska, H. Kozłowski, M. Rowińska-Żyrek, *Curr. Med. Chem.*, 2018, **25**, 22.
- [6] M. Z. Wiloch, U.E. Wawrzyniak, I. Ufnalska, G. Piotrowski, A. Bonna, W. Wróblewski, *PLoS One*, 2016, **11**, 1.
- [7] J. Brasuń, H. Czapór, A. Matera-Witkiewicz, A. Kotynia, A. Sochacka, M. Cebat, *Dalton Trans.*, 2010, **39**, 6518.
- [8] S. Timári, C. Kállay, K. Ósz, I. Sóvágó, K. Várnagy, *Dalton Trans.*, 2009, **48**, 1962.
- [9] K. Várnagy, J. Szabó, I. Sóvágó, G. Malandrinos, N. Hadjiliadis, D. Sanna, G. Micera, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 2000, **4**, 467.
- [10] H. Kozłowski, W. Bal, M. Dyba, T. Kowalik-Jankowska, *Coord. Chem. Rev.*, 1999, **184**, 319.

- [11] G.Y. Park, J.Y. Lee, R.A. Himes, G.S. Thomas, N.J. Blackburn, K.D. Karlin, *J. Am. Chem. Soc.*, 2014, **136**, 12532.
- [12] S. Medici, M. Peana, V.M. Nurchi, M.A. Zoroddu, *Molecules*, 2013, **18**, 12396.
- [13] I. Sóvágó, K. Várnagy, K. Ósz, *Comment. Inorg. Chem.*, 2010, **23**, 149.
- [14] A. Matera, J. Brasuń, M. Cebrat, J. Świątek-Kozłowska, *Polyhedron*, 2008, **27**, 1539.
- [15] Á. Grenács, A. Kaluha, C. Kállay, V. Józai, D. Sanna, I. Sóvágó, *J. Inorg. Biochem.*, 2013, **128**, 17.
- [16] I. Zawisza, M. Rózga, W. Bal, *Coord. Chem. Rev.*, 2012, **256**, 2297.
- [17] A. Magri, A. Munzone, M. Peana, S. Medici, M.A. Zoroddu, O. Hansson, C. Satriano, E. Rizzarelli, D. La Mendola, *Int. J. Mol. Sci.*, 2016, **17**, 1240.
- [18] P. Hu, C. Sorensen, M.L. Gross, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 1995, **6**, 1079.
- [19] W. Bal, M. Dyba, F. Kasprzykowski, H. Kozłowski, R. Latajka, L. Łankiewicz, Z. Maćkiewicz, L.D. Pettit, *Inorg. Chim. Acta.*, 1998, **283**, 1.
- [20] W. Bal, M. Dyba, H. Kozłowski, *Acta Biochim Pol.*, 1997, **44**, 467.
- [21] A. Kadej, M. Kuczer, E. Czarniewska, A. Urbański, G. Rosiński, T. Kowalik-Jankowska, *J. Inorg. Biochem.*, 2016, **163**, 147.
- [22] C. Kállay, Z. Nagy, K. Várnagy, G. Malandrinos, N. Hadjilias, I. Sóvágó, *Bioinorg. Chem. Appl.*, 2007, **2007**, 30394.
- [23] F.A. Bettelheim, W.H. Brown, M.K. Campbell, S.O. Farrell, O.J. Torres, *Introduction to Organic and Biochemistry*, Brooks/Cole, Cengage Learning, Belmont 2013.
- [24] G.C. Barrett, J.S. Davies, *Amino acids, peptides and proteins*, The Royal Society of Chemistry, Cambridge 2002.
- [25] N.J. Pace, E. Weerapana, *Biomolecules*, 2014, **4**, 419.
- [26] H. Kozłowski, T. Kowalik-Jankowska, M. Jeżowska-Bojczuk, *Coord. Chem. Rev.*, 2005, **249**, 2323.
- [27] K. Kochman, A. Gajewska, H. Kochman, H. Kozłowski, E. Masiukiewicz, B. Rzeszotarska, *J. Inorg. Biochem.*, 1997, **65**, 277.
- [28] L. Mazur, B. Modzelewska-Banachiewicz, R. Paprocka, M. Zimecki, U.E. Wawrzyniak, J. Kutnowska, G. Ziółkowska, *J. Inorg. Biochem.*, 2012, **114**, 55.
- [29] A. Herman, H. Kozłowski, M. Czauderna, K. Kochman, K. Kulon, A. Gajewska, *J. Physiol. Pharmacol.*, 2012, **63**, 69.
- [30] R. Pogni, M.C. Baratto, E. Busi, R. Basosi, *J. Inorg. Biochem.*, 1999, **73**, 157.
- [31] D.C. Schroeckenstein, S. Meier-Davis, R.K. Bush, *J. Allergy Clin Immunol.*, 1990, **86**, 182.
- [32] T. Kowalik-Jankowska, A. Kadej, M. Kuczer, E. Czarniewska, *Polyhedron*, 2017, **134**, 365.
- [33] M.K. Lesiów, U.K. Komarnicka, K. Stokowa-Sołtys, K. Rolka, A. Łęgowska, N. Ptaszyńska, R. Wiczorek, A. Kyzioł, M. Jeżowska-Bojczuk, *Dalton Trans.*, 2018, **47**, 5445.
- [34] K. Krupa, M. Lesiów, K. Stokowa-Sołtys, R. Starosta, N. Ptaszyńska, A. Łęgowska, K. Rolka, M. Wernecki, M. Cał, M. Jeżowska-Bojczuk, *in press*.
- [35] P. Kaczmarek, M. Jeżowska-Bojczuk, K. Gatner, W. Bal, *Dalton Trans.*, 2005, **0**, 1985.

\* Katarzyna Krupa i Monika K. Lesiów w równym stopniu przyczyniły się do opracowania tej publikacji i powinny być uważane za pierwszych autorów.

Praca wpłynęła do Redakcji 30 maja 2018

## SPEKTROMETRIA MAS W ANALIZIE BIAŁEK I PEPTYDÓW: ZNACZNIKI JONIZACYJNE

### MASS SPECTROMETRY IN ANALYSIS OF PEPTIDES AND PROTEINS: IONIZATION MARKERS

**Remigiusz Bąchor, Monika Biernat, Marek  
Cebrat, Monika Kijewska, Alicja Kluczyk\*,  
Mariola Kuczer, Aneta Paluch, Mateusz Waliczek,  
Magdalena Wierzbicka, Piotr Stefanowicz,  
Zbigniew Szewczuk**

*Wydział Chemii, Uniwersytet Wrocławski  
ul. F. Joliot-Curie 14, 50-383 Wrocław  
\*e-mail: alicja.kluczyk@chem.uni.wroc.pl*

---

*Pracę dedykujemy pamięci Pani Profesor Małgorzaty Jeżowskiej-Bojczuk*

---

Abstract

Wykaz stosowanych symboli i oznaczeń

Wprowadzenie

1. Spektrometria mas w badaniu białek i peptydów
2. Znaczniki izotopowe w proteomice ilościowej
3. Modyfikacje potranslacyjne; 3.1. Fosforylacja; 3.2. Glikacja i glikozylacja
4. Syntetyczne znaczniki jonizacyjne; 4.1 Czwartorzędowe sole amoniowe; 4.2. Sole azoniaspiranowe; 4.3. Sole pirydyniowe
5. Zastosowanie znaczników jonizacyjnych w analizie bibliotek kombinatorycznych
6. Znaczniki jonizacyjne w badaniu markerów chorobowych

Uwagi końcowe

Podziękowania

Piśmiennictwo cytowane

---

**Zespół Chemii i Stereochemii Peptydów i Białek** Wydziału Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego skupia chemików, zajmujących się projektowaniem i syntezą biologicznie aktywnych peptydów i ich pochodnych organicznych, poszukiwaniem nowych metod syntezy peptydomimetyków i koniugatów peptydowych oraz wykorzystaniem spektrometrii mas do badania struktury biopolimerów.

Badania naukowe Kierownika Zespołu, **prof. dr hab. Zbigniewa Szewczuka** oraz **dr hab. Piotra Stefanowicza**, prof. UWr. koncentrują się wokół zastosowań zaawansowanych metod spektrometrii mas do rozwiązywania problemów biochemicznych. **Dr hab. Mariola Kuczer** specjalizuje się w chemii peptydów owadzych, **dr Alicja Kluczyk** zajmuje się syntezą koniugatów peptydowych ze związkami heterocyklicznymi, **dr Monika Kijewska** prowadzi prace nad wykrywaniem zaawansowanych produktów glikacji, **dr Monika Biernat** bada dimeryczne analogi biologicznie aktywnych peptydów, **dr Marek Cebrat** syntezuje koniugaty peptydów z safirynami, **dr Remigiusz Bąchor** analizuje biblioteki kombinatoryczne peptydów, **dr Mateusz Waliczek** opracowuje nowe izobaryczne znaczniki jonizacyjne do analizy peptydów, **mgr Magdalena Wierzbicka** pracuje nad otrzymywaniem peptydów o złożonych strukturach drugorzędowych, **mgr Aneta Paluch** studiuje zateżanie modyfikowanych potranslacyjnie peptydów na nośniku stałym.

## ABSTRACT

High sensitivity, accuracy, and ability to provide structural information makes mass spectrometry (MS) the method of choice for both qualitative and quantitative analysis in proteome research. Peptide sequencing by tandem mass spectrometry (MS/MS) was successfully applied to discover new peptide sequences and modifications. Insufficient ionization of some peptides is one of the main limitations of MS-based peptide identification. The development of sensitive detection techniques for the efficient analysis of such samples is very important. Differences in ionizability cause difficulties in quantification studies, which could be overcome by derivatization of peptides to improve both the detectability and the selectivity of an analysis. Incorporation of ionization markers and isotopic labels (particularly the isobaric tags) is often used for this reason. Isobaric labeling reagents (including commercially available iTRAQ, TMT, DiLeu and DiART) have found a wide application in quantitative proteomics.

Mass spectrometry is a very good tool for the determination of posttranslational modifications (PTMs), but the modified proteins are usually present in low concentrations. The development of ionization tags specific to a particular PTM and suitable for sensitive analysis of the modified proteins is required. For the analysis of phosphorylated peptides, a combination of  $\beta$ -elimination and the reaction of resulting  $\alpha,\beta$ -dehydroamino acid residues with the nucleophilic thiol group could be used to detect a labile PTM. Such reaction may be used to introduce derivatizing reagents at the original site of phosphorylation, to enhance ionization in MS analysis. Glycation and glycosylation of proteins are other very important PTMs associated with many natural processes as well as diseases. We have designed and synthesized bifunctional quaternary ammonium salt derivatives of phenylboronic acids for selective detection of carbohydrates and peptide-derived Amadori products by ESI-MS.

The attachment of a fixed charge (e.g. in a form of a quaternary ammonium salt) to the amino groups in peptides leads to the enhancement of a precursor ion signal in mass spectra. We have developed several new QAS-containing ionization reagents including bicyclic tags with DABCO, ABCO or azoniaspiro groups. It is worth noting that 2,4,6-substituted pyrylium salts react with amino groups in peptides introducing a stable positive charge and improve peptide detection by MS.

The newly developed ionization tags were successfully applied for the analysis of OBOC combinatorial libraries as well as for studying possible biomarkers of pre-eclampsia, a pregnancy disorder.

**Keywords:** mass spectrometry, posttranslational modifications, ionization markers, phosphorylation, glycation, combinatorial libraries

**Słowa kluczowe:** spektrometria mas, modyfikacje potranslacyjne, znaczniki jonizacyjne, fosforylacja, glikacja, biblioteki kombinatoryczne

---

---

## WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

ABCO	– grupa 1-azoniabicyklo[2.2.2]oktyloamoniowa
AGE	– zaawansowane produkty glikacji (ang. <i>advanced glycation endproducts</i> )
CID	– dysocjacja zderzeniowa (ang. <i>collision induced dissociation</i> )
DABCO	– grupa 4-aza-1-azoniabicyklo[2.2.2]oktyloamoniowa
DiART, DiLeu	– izotopowe znaczniki <i>N,N</i> -dimetyloleucynowe (ang. <i>Deuterium isobaric Amine-Reactive Tag</i> )
ESI, ESI-MS	– jonizacja typu elektrosprej, spektrometria mas z elektrosprejowym źródłem jonów (ang. <i>electrospray ionization</i> )
FAB	– bombardowanie szybkimi atomami (ang. <i>fast atom bombardment</i> )
HILIC	– chromatografia oddziaływań hydrofilowych (ang. <i>hydrophilic interaction liquid chromatography</i> )
iTRAQ	– znaczniki izobaryczne do względnej i bezwzględnej analizy ilościowej (ang. <i>isobaric Tag for Relative and Absolute Quantitation</i> )
LC-MS	– chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas (ang. <i>liquid chromatography mass spectrometry</i> )
MALDI	– jonizacja/desorpcja laserowa wspomagana matrycą (ang. <i>matrix assisted laser desorption and ionization</i> )
MRM	– monitorowanie reakcji wielokrotnych, monitorowanie reakcji prekursor/produkt (ang. <i>multiple reaction monitoring</i> )
MS/MS	– tandemowa spektrometria mas
OBOC	– biblioteki kombinatoryczne typu jedno ziarno jeden związek (ang. <i>one-bead one-compound</i> )
ODS	– wypełnienie krzemionkowe modyfikowane grupami oktadecylowymi (ang. <i>octadecylsilane stationary phase</i> )
PE	– stan przedrzucawkowy, preeklampsja (ang. <i>preeclampsia</i> )
PTMs	– modyfikacje potranslacyjne (ang. <i>posttranslational modifications</i> )
QAS	– czwartorzędowe sole amoniowe (ang. <i>quaternary ammonium salts</i> )
SRM	– monitorowanie wybranych reakcji (ang. <i>selected reaction monitoring</i> )
TEA	– trietyloamina
TMT	– izobaryczny znacznik fragmentacyjny (ang. <i>tandem mas tag</i> )
TOF	– analizator czasu przelotu (ang. <i>time of flight</i> )



## WPROWADZENIE

Spektrometria mas jest jedną z podstawowych metod badania białek. Dostarcza nie tylko informacji o ich budowie, ale pozwala na analizę oddziaływań międzybiałkowych oraz monitorowanie stężeń białek w różnych stanach fizjologicznych. Prace prowadzone od wielu lat w Zespole Chemii i Stereochemii Peptydów i Białek Wydziału Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego koncentrują się na problemach zwiększania czułości pomiarów poprzez chemiczną modyfikację analizowanych związków. Projekty badawcze dotyczą poszukiwania metod selektywnej detekcji modyfikacji potranslacyjnych w białkach, projektowania i syntezy znaczników jonizacyjnych i opracowania nowych metod znakowania analitów do oznaczeń ilościowych metodą rozcieńczenia izotopowego za pomocą tandemowej spektrometrii mas. Uzyskane wyniki, prezentowane w poniższym opracowaniu, stanowią przegląd nowoczesnych zastosowań spektrometrii mas w analizie peptydów i białek.

### 1. SPEKTROMETRIA MAS W BADANIU BIAŁEK I PEPTYDÓW

Spektrometria mas jeszcze do końca lat siedemdziesiątych ubiegłego stulecia była wykorzystywana głównie do badania mało polarnych, lotnych substancji, których masy cząsteczkowe nie przekraczały 2000 Da. Pierwszą metodą jonizacji, która pozwoliła na uzyskanie widm mas białek i polipeptydów, była technika FAB (ang. *fast atom bombardment*). Zastosowanie tej metody pozwalało na pomiary mas cząsteczkowych peptydów i niewielkich białek, jednak czułość detekcji była niezadowalająca, a zakres pomiarowy ograniczony [1].

Rutynowe zastosowanie spektrometrii mas do analizy białek stało się powszechne dopiero w latach osiemdziesiątych XX wieku, po wprowadzeniu miękkich metod jonizacji ESI i MALDI. Opracowanie efektywnych technik jonizacji białek zostało uhonorowane Nagrodą Nobla, którą w roku 2002 otrzymali John Fenn i Koishi Tanaka [2].

Bezpośrednia analiza białek techniką spektrometrii mas jest obecnie powszechnie wykorzystywana w badaniach biochemicznych i biotechnologicznych [3] (zgodne z oczekiwaniami widmo ESI-MS pozwala na potwierdzenie tożsamości białka i określenie stopnia jego czystości), jak również w kontroli jakości białkowych preparatów farmaceutycznych, takich jak przeciwciała [4]. Obecnie, pomimo dużych postępów, jakie dokonały się w spektrometrii mas białek, uzyskanie dobrych widm mas tych substancji napotyka trudności. Częstym problemem jest mikroheterogeniczność próbki, wynikająca z częściowej hydrolizy białek przez egzopeptydazy, a także obecność soli nieorganicznych, tworzących addukty z badanymi białkami, co zmniejsza czułość ich detekcji. Uzyskanie danych dotyczących sekwencji białka możliwe jest dwiema metodami – przez bezpośrednią fragmentację w fazie gazowej (*top down*) i z wykorzystaniem hydrolizy enzymatycznej połączonej z analizą uzyskanych fragmentów techniką LC-MS (*bottom up*) [5]. Ze względu na trudno-

ści związane z fragmentacją białek w fazie gazowej, obecnie dominuje podejście *bottom up*.

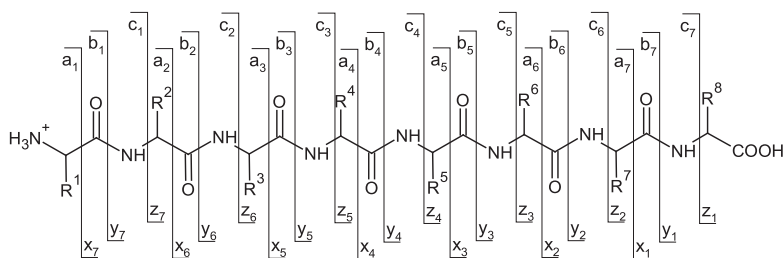
Ponieważ metoda ta jest obecnie powszechnie stosowana w proteomice, wykrywanie i oznaczanie peptydów techniką LC-MS stało się bardzo istotne w badaniach biochemicznych i klinicznych zarówno w odniesieniu do produktów proteolizy białek, jak i w analizie peptydów endogennych. Wiele naturalnych peptydów wykazuje aktywność biologiczną (neuropeptydy, hormony peptydowe) [6], tak więc ich wykrywanie i oznaczanie ma rosnące znaczenie w naukach przyrodniczych [7]. Zastosowanie techniki LC-MS pozwala analizować próbki o bardzo dużej złożoności i wykrywać peptydy w ilościach nano- a nawet attomolowych [8].

Pomimo bardzo szybkiego rozwoju spektrometrii mas, nadal istotny problem stanowi niewystarczająca czułość metody w analizie śladowych ilości substancji, spowodowana niską wydajnością jonizacji analitów peptydowych. W eksperymencie ESI-MS poziom jonizacji peptydów zależy od właściwości kwasowo-zasadowych tworzących je reszt aminokwasowych. Jony powstają głównie w wyniku protonowania lub deprotonowania odpowiednich grup funkcyjnych, a ich źródłem są przede wszystkim *N*-końcowa grupa aminowa peptydu oraz grupy aminowe łańcuchów bocznych aminokwasów, a w przypadku deprotonacji – grupy karboksylowe. Wyjątkowo podatne na protonację są peptydy zawierające reszty lizyny (pKa 10) lub argininy (pKa 12), a sygnały odpowiadające takim peptydom na widmie MS są wielokrotnie wyższe od pochodzących od peptydów niezasadowych. Ponadto, porównując intensywność sygnałów pochodzących od peptydów zawierających resztę argininy lub lizyny, można zaobserwować ponad 10-krotnie wyższą intensywność tych pierwszych [9]. Obecność argininy powoduje supresję pozostałych jonów, co sprawia, że sygnały pochodzące od innych peptydów są trudne do identyfikacji. Na intensywność otrzymywanych sygnałów ma również wpływ długość oraz struktura drugorzędowa peptydów [10], a także ich hydrofobowość, która determinuje zdolność cząsteczki do przemieszczania się na powierzchnię tworzącej się kropli w procesie jonizacji ESI [11].

Chociaż masy cząsteczkowe peptydów powstających w wyniku hydrolizy enzymatycznej białka mogą być wykorzystane do jego identyfikacji, w bardziej skomplikowanych przypadkach należy uwzględnić fragmentację peptydów. Eksperyment prowadzony techniką MS/MS polega na wyodrębnieniu jonu prekursorowego peptydu za pomocą kwadrupolowego filtra mas. W wyniku zderzenia z atomami gazu obojętnego jon ulega aktywacji prowadzącej do otrzymania produktów fragmentacji (jonów potomnych). Analiza uzyskanych fragmentów umożliwia określenie sekwencji badanego peptydu.

Fragmentacja peptydów prowadzi do powstania kilku charakterystycznych serii jonów [12], których nazewnictwo przedstawiono na Rysunku 1. Która z tych serii okaże się dominująca, zależy nie tylko od sekwencji peptydu, ale także od zastosowanej metody fragmentacji. Najczęściej wykorzystuje się metodę CID (ang. *collision induced dissociation*), w której – po nadaniu jonowi energii kinetycznej –

poddawany jest on kolizji z obojętnym gazem (zwykle z argonem) [13]. Powoduje to wzrost energii oscylacyjnej zjonizowanego peptydu, a w konsekwencji rozpad na jony potomne. Zastosowanie umiarkowanych energii kolizji (kilkadziesiąt eV) prowadzi do utworzenia głównie serii jonów *b* i *y* (Rys. 1). Zwiększenie energii kolizji do kilku tysięcy elektronowoltów sprawia, że na widmie pojawia się więcej serii jonów (dodatkowo *a*, *c*, *z* oraz *x*). Odmiennie przebiega fragmentacja jonów peptydów z wykorzystaniem aktywacji elektronami. Metoda ta może być stosowana wyłącznie do jonów o ładunku większym niż 1+. Oddziaływanie wielokrotnie naładowanego peptydu bezpośrednio z niskoenergetycznymi elektronami (energia kilku eV) lub z cząsteczkami, które są przenośnikami elektronów, prowadzi do aktywacji peptydu i rozpadu na jony potomne. W metodzie tej powstają głównie jony typu *c* oraz nieparzystoelektronowe jony (*z*+1), o strukturze podobnej do jonów *z* [14].



Rysunek 1. Nomenklatura jonów powstających w wyniku fragmentacji peptydów (na podstawie [15, 16])  
Figure 1. Nomenclature of peptide fragment ions (according to [15, 16])

Interpretacja widm fragmentacyjnych peptydów o wysokich masach cząsteczkowych napotyka trudności, gdyż w widmach tych występują różne typy jonów fragmentacyjnych. Przebieg fragmentacji peptydu można jednak znacząco zmienić stosując odpowiednią modyfikację chemiczną (np. umieszczenie grupy funkcyjnej o trwałym, dodatnim lub ujemnym ładunku na C- lub N-końcu peptydu). Taka modyfikacja pozwala na uzyskanie widm, w których przeważa seria jonów *y* lub *b*, co bardzo upraszcza przeprowadzenie analizy sekwencji.

Zarówno białka, jak i peptydy odgrywają kluczową rolę w różnych procesach biologicznych, a większość dotychczas zidentyfikowanych biomarkerów procesu chorobowego to białka lub ich fragmenty, które fizjologicznie występują w surowicy w wysokich stężeniach, jak na przykład fibrynogen i fibrynopeptydy, hemoglobina, amyloid A czy apolipoproteina A. Ich analiza może ułatwić wczesną diagnostykę stanów chorobowych, pomóc w monitorowaniu procesu leczenia lub zapobieganiu chorobom [17, 18].

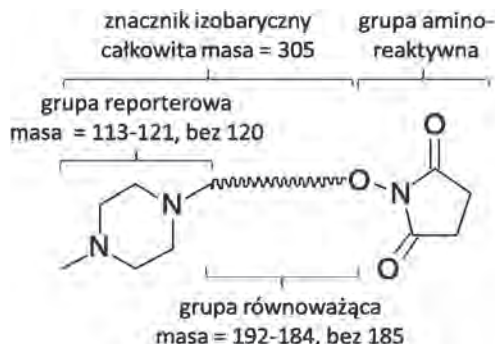
## 2. ZNACZNIKI IZOTOPOWE W PROTEOMICE ILOŚCIOWEJ

Pomimo znacznej czułości pomiarów metodą spektrometrii mas, wciąż występują problemy z wykryciem i ilościowym oznaczeniem białek, zwłaszcza przy niskich stężeniach. Jedną z możliwych metod rozwiązania tego problemu jest chemiczna modyfikacja peptydów ukierunkowana na zwiększenie intensywności sygnału MS tych związków [19]. Podobne problemy pojawiają się przy analizie ilościowej białek. Jednym z podstawowych zagadnień w badaniach procesów biochemicznych jest śledzenie zmian stężenia poszczególnych białek w danym układzie biologicznym pod wpływem określonych czynników. Porównanie stężeń białek w stanie fizjologicznym i patologicznym pozwala na identyfikację białek bezpośrednio związanych z rozwojem danej choroby, co z kolei może wskazać nowe kierunki poszukiwania molekularnego podłoża chorób i doprowadzić do uzyskania nowych leków i terapii.

Zastosowanie spektrometrii mas do analizy ilościowej białek jest możliwe dzięki temu, iż intensywność sygnału na widmie MS jest proporcjonalna do ilości danej substancji w próbce. Badania ilościowe utrudnia jednak fakt, że intensywność sygnałów zależy także od innych czynników, na przykład od efektywności jonizacji lub składu badanej mieszaniny i oddziaływania jej składników. Najskuteczniejszym sposobem na ograniczenie negatywnego wpływu tych czynników na wyniki analizy ilościowej jest zastosowanie wzorców wewnętrznych, a jedną z możliwych strategii jest znakowanie próbki trwałymi izotopami (ang. *stable isotope labeling*), takimi jak  $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  lub  $^{18}\text{O}$ . Cząsteczki o zmienionym składzie izotopowym doskonale nadają się do roli wzorca wewnętrznego, gdyż z jednej strony mają praktycznie identyczne właściwości fizykochemiczne (w tym parametry rozdziału chromatograficznego i efektywność jonizacji), a z drugiej strony, ze względu na różnice mas analitu i wzorca wewnętrznego, są one łatwe do rozróżnienia przez spektrometr mas [20].

Niektóre strategie analizy ilościowej wykorzystujące znakowanie trwałymi izotopami, przewidują takie zaprojektowanie znaczników, by różnica ich mas ujawniała się dopiero po procesie fragmentacji, czyli na widmie MS/MS. Na takim założeniu opiera się między innymi strategia iTRAQ (ang. *isobaric Tag for Relative and Absolute Quantitation*) [21]. Tego typu reagenty składają się z dwóch zasadniczych elementów: grupy reporterowej (ang. *reporter group*) i grupy równoważącej (ang. *balance group*), połączonych wiązaniem, które łatwo ulega rozpadowi w spektrometrze mas. Znacznik występuje w kilku wariantach różniących się składem izotopowym grupy reporterowej i równoważącej, przy czym sumaryczna nominalna masa całego znacznika jest w każdym przypadku praktycznie taka sama, co oznacza, że związek znakowany tymi znacznikami daje zazwyczaj pojedynczy sygnał na widmie masowym. W wyniku fragmentacji, powstają różniące się masą cząsteczkową jony reporterowe, których stosunek intensywności pozwala na określenie różnic ilościowych między próbkami znakowanymi różnymi wariantami znacznika. Obecna wersja znaczników iTRAQ obejmuje zestaw 8 izobarycznych wariantów ( $m/z$  dla jonów reporterowych wynosi 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119 i 121), a więc pozwala na równoczesne porównanie nawet ośmiu różnych próbek (Rys. 2). Znaczniki te

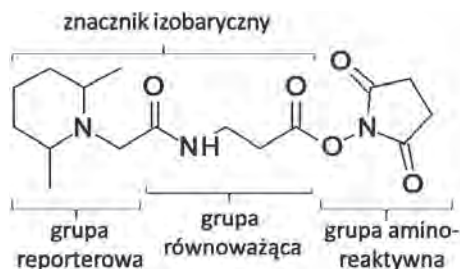
dostępne są w postaci estrów *N*-hydroksysukcynimidowych, które efektywnie reagują z pierwszorzędowymi grupami aminowymi peptydów i białek.



Rysunek 2. Struktura znaczników iTRAQ (wersja oktapleks). Dzięki wykorzystaniu różnych izotopów węgla, azotu i tlenu, wszystkie warianty znacznika mają tę samą masę całkowitą (305), ale różne masy grupy reporterowej i równoważcej

Figure 2. Structure of iTRAQ reagents (octaplex version). The molecular weight of the whole marker is the same (305), but the reporter and balance groups differ in mass due to the presence of different isotopes of carbon, nitrogen and oxygen

Na podobnej zasadzie zbudowane są znaczniki TMT (ang. *tandem mas tag*) [22], które w obecnej wersji pozwalają na równoczesne badanie do 10 różnych próbek [23]. Podobnie jak znaczniki iTRAQ, TMT reagują z pierwszorzędowymi grupami aminowymi, co pozwala na efektywne znakowanie peptydów powstałych w wyniku enzymatycznej hydrolizy białek (Rys. 3).

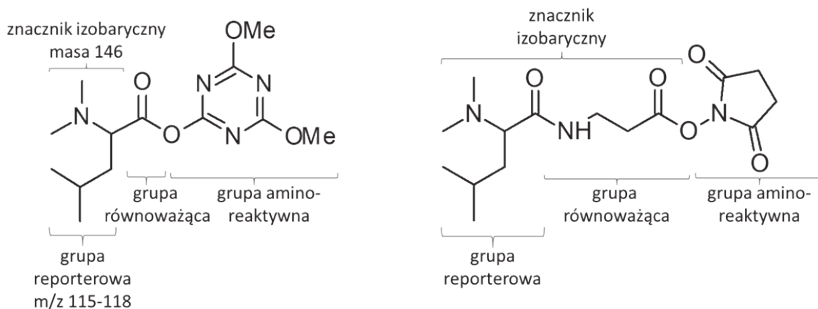


Rysunek 3. Struktura znaczników TMT

Figure 3. Structure of the TMT reagents

Inny znacznik izobaryczny, DiLeu, jest pochodną leucyny podwójnie metylowanej na grupie  $\alpha$ -aminowej [24]. Jony reporterowe, powstające w wyniku fragmentacji tego znacznika, w trakcie pomiarów MS/MS mają strukturę jonów immonioowych i posiadają masy nominalne 115, 116, 117 i 118. Przy zastosowaniu wysokorozdzielczego spektrometru mas, możliwe jest rozróżnienie jonów izobarycznych o tych samych masach nominalnych, co w przypadku znacznika DiLeu pozwala uzyskać do 12 różnych jonów reporterowych [25]. Podobnie jak iTRAQ

i TMT, znaczniki DiLeu reagują z grupami aminowymi, przy czym grupą aktywną w tym przypadku jest ester dimetoksytriazynowy (Rys. 4).



Rysunek 4. Struktura znaczników DiLeu i DiART  
Figure 4. Structure of the DiLeu and DiART reagents

Znaczniki iTRAQ, TMT i DiLeu wykorzystują ciężkie izotopy węgla, azotu i tlenu ( $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{18}\text{O}$ ), aby zapobiec separacji chromatograficznej izotopomerów, zdarzającej się, gdy w miejsce protonu podstawiony zostanie deuter. Ten niekorzystny efekt podstawienia deuterem można jednak zminimalizować ograniczając liczbę wprowadzanych atomów  $^2\text{H}$  oraz umieszczając je w obrębie grup hydrofiliowych. Na podstawie tej obserwacji, Zhang i in. opracował znakowane deuterem (a przez to tańsze) znaczniki DiART (ang. *Deuterium isobaric Amine-Reactive Tag*) [26]. Znacznik ten stosowany jest w postaci estru *N*-hydroksysukcynimidowego. W wyniku fragmentacji MS/MS, uzyskuje się jony reporterowe o masach 114–119, co pozwala na równoczesną analizę 6 próbek.

Dużą zaletą metod wykorzystujących opisane wyżej znaczniki izobaryczne jest to, że znakowanie nie ma wpływu na pozostałe fragmenty cząsteczki, co pozwala na wykorzystanie tego samego widma MS/MS i do identyfikacji, i do ilościowej analizy peptydu. Interpretacja wyników ilościowych jest bardzo prosta, gdyż polega na bezpośrednim porównaniu intensywności sygnałów dla jonów reporterowych uzyskanych dla danej cząsteczki. Metody te nie są jednak pozbawione wad. Ponieważ analiza ilościowa opiera się na śledzeniu jonów reporterowych, powstających w wyniku fragmentacji MS/MS, metody te są dużo wolniejsze od opartych o zwykły pomiar MS, a ponadto wymagają spektrometrów zdolnych do rejestracji widm MS/MS z bardzo wysoką częstotliwością. Niskie masy uzyskiwanych jonów reporterowych, w porównaniu z masą całego peptydu, utrudniają wykorzystanie do tego typu pomiarów powszechnie używanych spektrometrów z pułapką jonową.

### 3. MODYFIKACJE POTRANSLACYJNE

Modyfikacje potranslacyjne (PTMs) są to modyfikacje chemiczne, którym ulegają białka po procesie translacji. Polegają na kowalencyjnym przyłączeniu określonych grup funkcyjnych do łańcuchów bocznych reszt aminokwasowych budujących białka, zmieniając ich właściwości fizykochemiczne, stabilność oraz aktywność biologiczną. PTMs wpływają zatem na funkcje białek, przez co pełnią ważną rolę w wielu procesach biologicznych [27]. W ostatnich latach PTMs cieszą się dużym zainteresowaniem wśród biologów i biochemików [28], a do najczęściej badanych modyfikacji należą fosforylacja, glikozylacja, glikacja, acylacja, amidacja, hydroliza i utlenianie [29].

Spektrometria mas jest obecnie główną metodą analityczną stosowaną do identyfikacji i detekcji PTMs, ponieważ wprowadzenie nowej grupy funkcyjnej powoduje zmianę masy cząsteczkowej białka, co można zaobserwować na widmie masowym [30]. Niestety, metoda ta, pomimo wielu zalet, posiada również pewne ograniczenia podczas identyfikacji PTMs. Wynikają one głównie z niewielkiej ilości, w jakiej PTMs występują w próbkach biologicznych, w porównaniu z białkami niemodyfikowanymi, co może powodować efekt supresji w analizie MS. Dlatego też wciąż poszukiwane są nowe metody ich wzbogacenia i analizy.

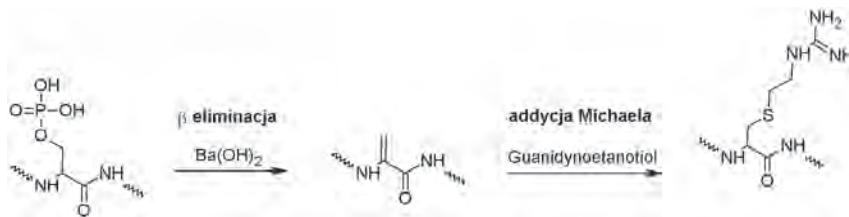
#### 3.1. FOSFORYLACJA

Fosforylacja polega na przyłączeniu grupy  $\gamma$ -fosforanowej z cząsteczki ATP do łańcucha bocznego odpowiedniej reszty aminokwasowej, najczęściej seryny, treoniny lub tyrozyny. Reakcja jest katalizowana enzymatycznie za pomocą kinaz białkowych. Odłączenie grupy fosforanowej zachodzi na drodze reakcji hydrolizy (defosforylacji), w wyniku działania enzymów zwanych fosfatazami.

Fosforylacja należy do jednej z najważniejszych modyfikacji potranslacyjnych, jednak identyfikacja miejsca fosforylacji jest utrudniona, ze względu na śladowe ilości fosforylowanych białek w próbkach biologicznych, niestabilność grupy fosforanowej w warunkach pomiaru MS oraz tłumienie jonizacji w trybie jonów dodatnich, spowodowane obecnością anionowej grupy fosforanowej, co powoduje zmniejszenie intensywności sygnałów na widmach masowych [31].

Do identyfikacji fosforylowanych peptydów i białek stosuje się modyfikację chemiczną, polegającą na reakcji  $\beta$ -eliminacji grupy fosforanowej w środowisku silnie zasadowym. W wyniku tej reakcji, powstaje  $\alpha,\beta$ -dehydroaminokwas, który następnie może ulegać addycji Michaela ze związkami zawierającymi grupę tiolową oraz znacznik umożliwiający zwiększenie wydajności jonizacji w analizie MS. Taką metodę zastosowali między innymi Ahn i in. [32]. Identyfikacji miejsca fosforylacji dokonali przeprowadzając reakcję  $\beta$ -eliminacji z jednoczesną derywatyzacją za pomocą guanidynoetanotolu (Rys. 5). Otrzymane związki poddano analizie

MALDI-TOF MS. Na uzyskanych widmach masowych zaobserwowano znacznie intensywniejsze sygnały dla tak zmodyfikowanych peptydów.



Rysunek 5. Reakcja  $\beta$ -eliminacji grupy fosforanowej i addycja guanidynoetanotiolu do układu nienasyconego reszty  $\alpha,\beta$ -dehydroaminokwasu [32]

Figure 5. Phosphate group  $\beta$ -elimination and addition of guanidinoethanethiol to the resulting  $\alpha,\beta$ -dehydro amino acid residue [32]

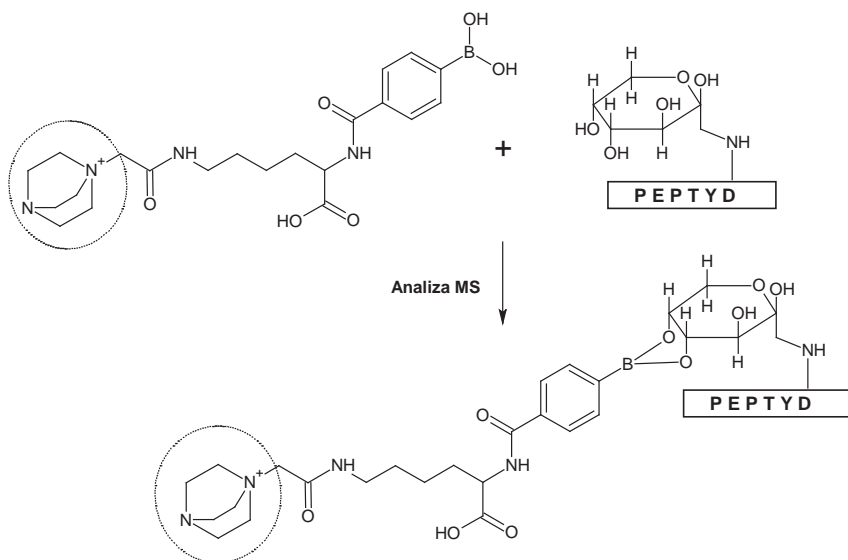
### 3.2. GLIKACJA I GLIKOZYLACJA

Glikozylacja jest jedną z najczęstszych modyfikacji potranslacyjnych, której ulega znaczna część białek powierzchniowych i wydzielniczych komórki [33]. Skład glikanów zależy od aktywności enzymów (glikozylotransferaz i glikozydaz) odpowiedzialnych za syntezę oligosacharydów oraz od stanu fizjologicznego komórek, a także działania czynników zewnętrznych. Glikozylacji podlegają kluczowe białka komórek układu odpornościowego. Na istotne znaczenie tego procesu w układzie odpornościowym wskazują wyniki licznych badań zmian glikozylacji w różnych stanach patologicznych układu immunologicznego [34]. Analiza glikozylowanych peptydów za pomocą wysokorozdzielczej spektrometrii mas, sprzężonej z chromatografią ciekową (LC-MS), jest utrudniona ze względu na niewystarczającą jonizację tych peptydów oraz niestabilność reszt cukrowych w warunkach pomiarów fragmentacyjnych (MS/MS). Niezwykle użyteczne w analizie sacharydów/oligosacharydów za pomocą MS okazały się pochodne hydrazyny [35]. Dostępny handlowo odczynnik Girarda T, jest rutynowo wykorzystywany jako odczynnik derywatyzujący do analizy małych oligosacharydów metodą MALDI-MS [36]. Bereman i in. [37] opracowali nowy hydrazyd kationowy zwiększający hydrofobowość, a tym samym ułatwiający jonizację glikanów w warunkach analizy ESI-MS. Jednakże odczynniki hydrazydowe mogą reagować tylko z glikanami zawierającym cukier redukujący na końcu łańcucha, co utrudnia bezpośrednią analizę wszystkich glikozylowanych peptydów występujących w mieszaninie, nie można więc uznać tej metody za uniwersalną.

Przykładem modyfikacji potranslacyjnej, zachodzącej bez udziału enzymów, jest reakcja glikacji. Glikacja jest wieloetapową reakcją polegającą na przyłączeniu cząsteczki cukru redukującego do pierwszorzędowej grupy aminowej biomolekuł (białek, peptydów) [38]. Spośród białek podlegających nieenzymatycznej glikacji duże znaczenie w przypadku cukrzycy odgrywają białka krwi – hemoglobina, albu-



mina oraz białka o długim okresie życia – kolagen i krystalina. Analityczne oznaczenie glikowanych białek (szczególnie albuminy i hemoglobiny) jest wykorzystywane w diagnostyce hiperglikemii do monitorowania postępów leczenia cukrzycy, gdyż może dostarczać informacji na temat wyrównania metabolizmu cukrów [39, 40]. Ponadto, produkty reakcji glikacji mogą być także przyczyną starzenia oraz chorób neurodegeneracyjnych, w tym choroby Alzheimera [41]. Nasze badania skupiały się na peptydowym produkcie przegrupowania Amadoriego (pochodne *N*-(1-amino-1-deoksyfruktozy), gdyż związek ten jest kluczowym produktem pośrednim w tworzeniu zaawansowanych produktów glikacji (AGE). Analiza glikowanych białek osocza krwi jest trudna, ze względu na niskie stężenie glikowanych peptydów, skomplikowaną matrycę oraz niedostateczny stopień jonizacji peptydów. Zaprojektowaliśmy i zsyntetyzowaliśmy więc znacznik, będący pochodną czwartorzędowej soli amoniowej oraz kwasu fenyloboronowego [42], w celu selektywnej detekcji i możliwości wzmocnienia jonizacji glikowanych peptydów (Rys. 6). Otrzymany znacznik w niewielkim stopniu zwiększa jonizację produktu Amadoriego, ale przede wszystkim stabilizuje aminofruktozę w analizie fragmentacyjnej tych związków. Charakterystyczne jony, powstające w wyniku strat neutralnych podczas analizy MS/MS mają znacznie mniejszą intensywność, co zdecydowanie ułatwia sekwencjonowanie i wskazanie miejsca modyfikacji w łańcuchu peptydowym. Dodatkowo znaczniki te zastosowano do detekcji oligosacharydów, które wcześniej można było analizować tylko jako jony ujemne, co w analizie MS bywa kłopotliwe. Wprowadzenie ładunku dodatniego oraz wzmocnienie jonizacji zdecydowanie ułatwiło analizę [43], o czym będzie mowa w kolejnym rozdziale.



Rysunek 6. Zastosowanie bifunkcyjnego reagentu do selektywnego wychwytu peptydowych produktów przegrupowania Amadoriego

Figure 6. The application of bifunctional reagent for selective capture of peptide-linked Amadori products

## 4. SYNTETYCZNE ZNACZNIKI JONIZACYJNE

### 4.1. CZWARTORZĘDOWE SOLE AMONIOWE

Jedną z metod zwiększania jonizowalności próbki jest derywatyżacja grup aminowych, podczas której analizowany związek jest przeprowadzany w pochodne czwartorzędowych soli amoniowych (ang. *quaternary ammonium salts*, QAS). Obecność w cząsteczce trwałego ładunku dodatniego powoduje wielokrotny wzrost wydajności jonizacji, a tym samym wzrost czułości analiz wykonywanych metodą ESI-MS.

W pierwszej metodzie syntezy pochodnych QAS, Kidwell i in. zastosowali bezpośrednią reakcję peptydu z jodkiem metylu, podczas której grupę aminową zmodyfikowano do soli trimetyloamoniowej (Rys. 7A). Choć obecność stabilnego ładunku dodatniego w badanym peptydzie pozwalała na analizę pikomolowych ilości substancji za pomocą spektrometrii mas, ze względu na niską wydajność reakcji, metoda ta okazała się mało użyteczna [44].

Kolejna metoda syntezy była oparta na reakcji dwuetapowej. W pierwszym kroku, *N*-końcową grupę aminową acetylowano przy użyciu chlorku chloroacetylu, a w kolejnym - atom chloru podstawiano trietyloaminą (Rys. 7B) [45]. Ograniczeniem w obu przypadkach był brak selektywności wobec *N*-końcowej grupy aminowej.

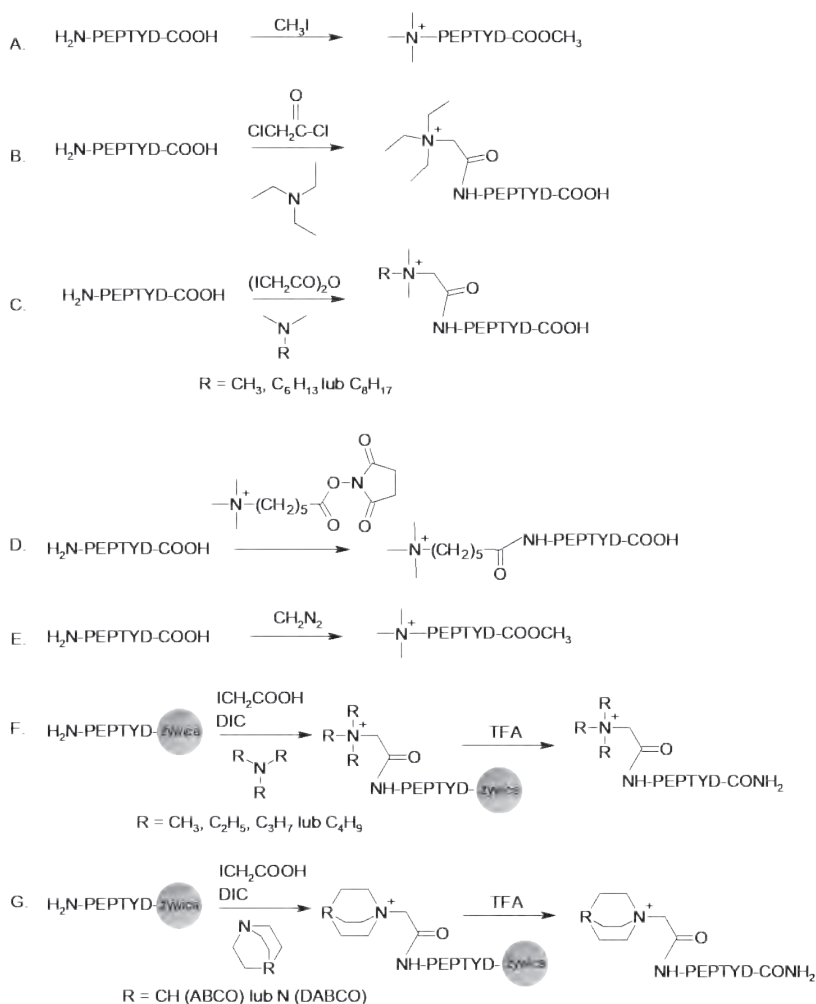
W 1993 r. Stults i in. zaproponowali również procedurę dwuetapową, z użyciem bezwodnika kwasu jodooctowego i amin trzeciorzędowych (Rys. 7C) [46]. W metodzie tej, wykorzystując różnice w wartościach pK<sub>a</sub>, można było selektywnie zmodyfikować *N*-końcową grupę  $\alpha$ -aminową, w obecności grupy  $\epsilon$ -aminowej łańcucha bocznego lizyny. Ponadto, wprowadzenie ugrupowania dimetyloheksyloamoniowego lub dimetylooktyloamoniowego do peptydu powodowało ponad trzykrotny wzrost wydajności jonizacji, a także ułatwiło analizę danych uzyskanych z eksperymentu MS/MS.

W 1997 r. Bartlet-Jones i in. opracowali jednoetapową metodę derywatyżacji, polegającą na bezpośrednim przyłączeniu do peptydu pochodnej trimetyloamoniowej estru *N*-hydroksysukcynimidowego (Rys. 7D). Wykorzystując tę procedurę, można było oznaczyć 50 femtomolową ilość peptydu przy użyciu MALDI MS [47].

Zaproponowana modyfikacja grup aminowych z wykorzystaniem pochodnych estrów *N*-hydroksysukcynimidowych znalazła szerokie zastosowanie do modyfikowania peptydów w roztworze, przede wszystkim w badaniach proteomicznych, do oznaczeń ilościowych [48, 49].

Inną procedurę syntezy koniugatów peptydowych czwartorzędowych soli amoniowych opracował Wasslen i in. (Rys. 7E) [50]. Derywatyżację grup aminowych peptydów immobilizowanych na żywicy kationowej przeprowadzono za pomocą eterowego roztworu diazometanu. Zastosowana modyfikacja pozwoliła na uzyskanie *N,N,N*-trimetylowanych pochodnych peptydowych, które zwiększały jonizację

analizowanych peptydów, ułatwiając ich oznaczenie w rozpuszczalnikach aprotycznych. Dodatkowo, ze względu na powstawanie w eksperymentach MS/MS charakterystycznego fragmentu  $a_2$ , zaproponowany sposób derywatywacji ułatwił analizę danych uzyskanych z pomiarów ilościowych w trybie MRM (ang. *multiple reaction monitoring*).



Rysunek 7. Wybrane reakcje otrzymywania pochodnych peptydowych zawierających czwartorzędowe sole amoniowe. N- i C-końcowe grupy funkcyjne zostały wyodrębnione w celu uproszczenia równań reakcji

Figure 7. Selected methods of formation of quaternary ammonium salt derivatives of peptides. The terminal functional groups were presented as separated to simplify the reaction schemes

Opracowaliśmy metodę syntezy na nośniku stałym koniugatów peptydowych zawierających QAS (Rys. 7F i 7G) [51–53] i określiliśmy wpływ wydłużenia łań-

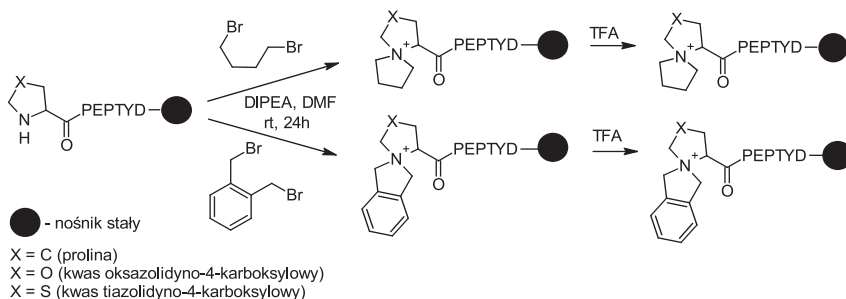
cuchów alkilowych przy czwartorzędowym atomie azotu na wydajność jonizacji [51] oraz mechanizmy fragmentacji otrzymanych cząsteczek [52]. Niestety, w trakcie eksperymentów MS/MS pochodnych peptydowych zawierających alifatyczne czwartorzędowe sole amoniowe zachodziła eliminacja aminy trzeciorzędowej lub eliminacja Hofmanna, prowadząca do powstania alkeny [52].

W kolejnych badaniach do derywatywacji grupy aminowej w peptydach zaproponowaliśmy bicykliczne sole amoniowe: 4-aza-1-azoniabicyklo[2.2.2]oktyloamoniową (DABCO) oraz 1-azoniabicyklo[2.2.2]oktyloamoniową (ABCO) [51, 53]. Wyniki pomiarów MS wykazały, iż bicykliczne czwartorzędowe sole amoniowe nie ulegają rozpadowi podczas eksperymentów MS/MS [53]. Ponadto, przeprowadzone na peptydach modyfikacje pozwoliły na obniżenie granicy ich wykrywalności, co umożliwiło oznaczenia substancji w ilościach femtomolowych.

#### 4.2. SOLE AZONIASPIRANOWE

Układy azoniaspiranowe cechują się połączeniem dwóch cyklicznych układów alkilowych za pomocą czwartorzędowego, dodatnio naładowanego atomu azotu. Zgodnie z badaniami przeprowadzonymi dla znaczników bicyklicznych ABCO, układy te nie ulegają eliminacji Hofmanna [53], a ponadto są odporne na utratę aminy trzeciorzędowej, obserwowaną dla układów ABCO w eksperymentach MS/MS.

W chemii peptydów tego typu układy mogą być syntezowane jako pochodne proliny [54]. Zsyntezowane zostały układy: 5-azoniaspiro[4.4]nonylowy (ASN<sup>+</sup>-CO) i 7,8-benzo-5-azoniaspiro[4.4]nonylowy (BASN<sup>+</sup>-CO) z wykorzystaniem reakcji substytucji nukleofilowej *N*-końcowej reszty proliny z 1,4-dibromobutanem lub dibromoortoksylenem, w aprotycznym rozpuszczalniku organicznym na nośniku stałym (Rys. 8). Podobnie, otrzymano znaczniki: 2-oksa-5-azoniaspiro[4.4]nonylowy (2-oxa-ASN<sup>+</sup>-CO) oraz 2-tia-5-azoniaspiro[4.4]nonylowy (2-thia-ASN<sup>+</sup>-CO) [55], wychodząc od kwasu tiazolidyno-4-karboksylowego (Thz) oraz oksazolidyno-4-karboksylowego (Oxa), pochodnych odpowiednio tia- oraz oksaproliny (Rys. 8).



Rysunek 8. Schemat syntezy znaczników azoniaspiranowych

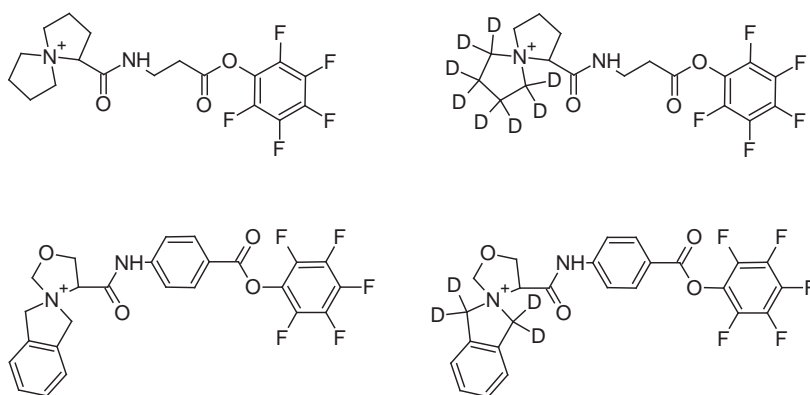
Figure 8. The synthesis of azoniaspiro derivatives

Znaczники  $\text{ASN}^+\text{-CO}$  oraz  $\text{BASN}^+\text{-CO}$  zwiększają od 10 do 100-krotnie efektywność jonizacji peptydów. Za pomocą LC-ESI-MRM, dla znakowanych w ten sposób peptydów wyznaczono granicę wykrywalności na poziomie subfemtomolowym, aż do attomolowego [54, 55]. Sole azoniaspiranowe są bardzo stabilne w eksperymentach MS/MS, dzięki czemu mogą być potencjalnie stosowane do identyfikacji i sekwencjonowania *de novo* śladowych ilości peptydów i hydrolizatów białek [56]. Znaczniki 2-oxa- $\text{ASN}^+\text{-CO}$  oraz 2-thia- $\text{ASN}^+\text{-CO}$  umożliwiają również powstanie stabilnych jonów reporterowych w ilościowych eksperymentach SRM (ang. *selected reaction monitoring*) [55].

Znaczники azoniaspiranowe, podobnie jak inne pochodne betainy [57, 58] łatwo ulegają podstawieniu wodoru-deuteru na atomie  $\alpha\text{-C}$  modyfikowanej reszty proliny, w środowisku 1% TEA w  $\text{D}_2\text{O}$ , a wymiana ta jest trwała w środowisku kwasowym, natomiast wymiana zwrotna zachodzi przy użyciu 1% TEA w  $\text{H}_2\text{O}$  [59, 60]. Czyni to z niej więc szybką i tanią metodę otrzymywania deuterowanych izotopologów do celów proteomiki ilościowej, tym bardziej że zaobserwowano koelucję obydwu analogów podczas rozdzielania HPLC na kolumnach HILIC oraz ODS.

Badania nad wymianą wodoru-deuteru pozwoliły zaobserwować po raz pierwszy racemizację modyfikowanej reszty proliny w warunkach wymiany [60]. Obydwa izotopologi soli  $\text{BASN}^+\text{-CO-Abu-OEt-BPh}_4$  wykazują odmienne skręcalności optyczne. Mechanizm racemizacji poprzez płaską formę enolanu został zaproponowany na podstawie doniesień Richarda i in. [61].

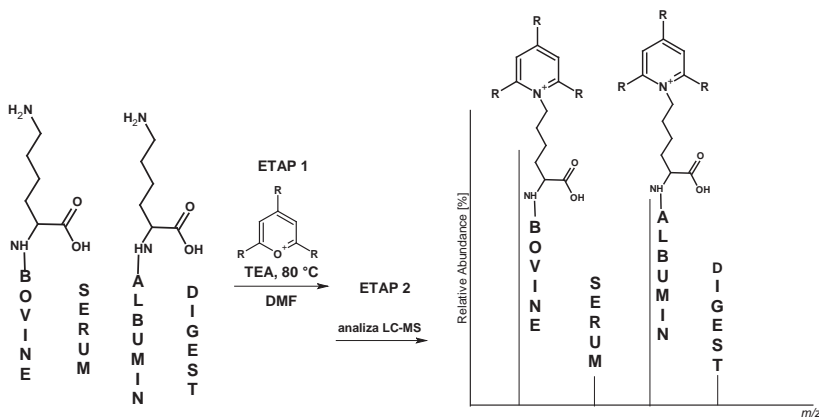
Zalety znaczników azoniaspiranowych, ze względu na wysoką wydajność jonizacyjną, stabilność w eksperymentach MS/MS, łatwość otrzymywania izotopologów i ich koelucję, zostały wykorzystane do stworzenia nowej wersji odczynnika iTRAQ, którego analogi: lekki oraz ciężki, zostały przedstawione na Rysunku 9. Znacznik, w formie pentafluorofenyowego estru aktywnego, można łatwo wprowadzić do grup aminowych i tiolowych peptydów [54, 55].



Rysunek 9. Pary lekkich i ciężkich izotopologów azoniaspiranowych do oznaczeń ilościowych  
Figure 9. The pairs of heavy and light azoniaspiro isotopologues for quantitative analysis

## 4.3. SOLE PIRYDINIOWE

Sole piryliowe są heterocyklicznymi cząsteczkami, podobnymi do pirydyny, i zawierają sześcioczłonowy pierścień aromatyczny, w którym jeden atom węgla jest zastąpiony przez dodatnio naładowany atom tlenu. Pionierami w syntezie soli piryliowych byli Balaban oraz Dimroth, którzy w latach sześćdziesiątych ubiegłego stulecia opublikowali metody syntezy soli piryliowych. Jedna z nich, pozwalająca na syntezę różnych symetrycznych soli piryliowych, polega na kondensacji chlorków acylowych z alkoholem *tert*-butylovym [62]. Dimroth i in. opublikowali metodę pozwalającą na otrzymanie soli 2,4,6-trifenylpiryliowej w oparciu o dwuetapową syntezę. Pierwszy etap polegał na kondensacji aldolowej acetofenonu i benzaldehydu [63]. Otrzymany benzaloacetofenon został w kolejnym etapie poddany kondensacji z acetofenonem, z użyciem kwasu trifluorometanosulfonowego. Na szczególną uwagę zasługuje reakcja soli piryliowych z aminami. Produktem reakcji tych związków z I-rzędowymi aminami są sole pirydyniowe. 2,4,6-Trójpodstawione sole piryliowe reagują z I-rzędowymi grupami aminowymi aminokwasów, szczególnie z grupami niezatłoczonymi sterycznie, np. grupą  $\alpha$ -aminową glicyny lub  $\epsilon$ -aminową lizyny. Prowadzone przez nas badania wykazały, że reakcja ta jest szczególnie selektywna względem grupy  $\epsilon$ -aminowej reszt lizyny. Skutkiem takiej modyfikacji jest wprowadzenie stałego ładunku dodatniego do cząsteczki peptydu, dzięki czemu sole pirydyniowe znalazły zastosowanie jako wzmacniacze jonizacyjne w analizie peptydów metodą spektrometrii mas [64]. Na Rysunku 10 pokazano schemat derywatywacji amin za pomocą 2,4,6-trójpodstawionej soli piryliowej.



Rysunek 10. Derywatywacja peptydów za pomocą 2,4,6-trójpodstawionej soli piryliowej  
Figure 10. The application of 2,4,6-trisubstituted pyrylium salt for derivatization of peptides

Derywatyzację tę przeprowadza się w obecności nadmiaru 2,4,6-trójpodstawionej soli piryliowej, równoważnikowej ilości trietyloaminy (w stosunku do odczynnika derywatyzującego) przez 20 min, w *N,N*-dimetyloformamidzie (DMF), w temperaturze 70°C. Ze względu na opisaną powyżej regioselektywność reakcji soli

piryliowych, są one szczególnie użyteczne w derywatywacji peptydów pochodzących z hydrolizy enzymatycznej katalizowanej trypsyną, która prowadzi do powstania mieszaniny peptydów zawierających reszty lizyny lub argininy na C-końcu. Badania wykazały, że peptydy zawierające znacznik 2,4,6-trifenylopirydyniowy wykazują znaczący wzrost intensywności sygnałów na widmie masowym, w porównaniu z peptydami niemodyfikowanymi. Ponadto, dla dipeptydu glicyloleucyny zawierającego znacznik pirydiniowy zostało zarejestrowane widmo masowe na poziomie 1 attomola ( $1 \times 10^{-18}$ ), w trybie MRM (ang. *multiple reaction monitoring*). Na widmach MS/MS peptydów zawierających znacznik jonizacyjny na C-końcu łańcucha peptydowego występuje charakterystyczna seria jonów typu  $\gamma$ , co znacznie ułatwia sekwencjonowanie i analizę widm masowych peptydów [43].

## 5. ZASTOSOWANIE ZNACZNIKÓW JONIZACYJNYCH W ANALIZIE BIBLIOTEK KOMBINATORYCZNYCH

Peptydowe biblioteki kombinatoryczne typu jedno ziarno jeden związek (ang. *one-bead one-compound*, OBOC), stanowią niezastąpione narzędzie w analizie specyficzności substratowej enzymów proteolitycznych, odgrywających kluczową rolę w funkcjonowaniu szlaków sygnalizacyjnych, powstawaniu infekcji i stanów zapalnych, apoptozie, krzepnięciu krwi oraz kontrolowaniu cyklu komórkowego [65]. Dotychczas prowadzone badania umożliwiły zaprojektowanie specyficznych substratów, inhibitorów oraz markerów pozwalających monitorować aktywność wielu enzymów w testach *in vivo* i *in vitro* [66]. Syntezę bibliotek peptydowych OBOC przeprowadza się na nośniku stałym, a identyfikacji aktywnych produktów dokonuje się bezpośrednio na ziarnach żywicy lub w roztworze.

Jedną z najczęściej wykorzystywanych metod analitycznych w chemii kombinatorycznej jest spektrometria mas ESI-MS [67]. Pomimo szybkiego rozwoju tej techniki w ostatnich latach, jej podstawowym ograniczeniem jest śladowa ilość substancji uwolnionej z pojedynczego ziarna żywicy, często niewystarczająca do pełnej analizy. Z uwagi na zbyt małą wydajność jonizacji niektórych peptydów, ich analiza sekwencyjna metodą MS/MS wymaga zastosowania większej ilości peptydów od tej, która znajduje się na pojedynczym ziarnie żywicy. Rozwiązaniem tego problemu może okazać się zaprojektowana przez nas [68, 69] wydajna derywatywacja komponentów bibliotek OBOC znacznikiem jonizacyjnym w postaci czwartorzędowej grupy amoniowej, która zwiększa jonizowalność śladowych ilości analitów uzyskanych z pojedynczych ziaren OBOC, ułatwiając ich jednoznaczne sekwencjonowanie metodą ESI-MS/MS. Wprowadzenie takiej modyfikacji wymagało zaprojektowania nowego typu bibliotek kombinatorycznych OBOC, w których peptydy przyłączone były do żywicy za pomocą linkera, zawierającego grupę umożliwiającą selektywne uwolnienie związku, wysięgnik zwiększający odległość od powierzchni żywicy oraz grupę funkcyjną umożliwiającą wprowadzenie znacznika jonizacyjnego. Po syntezie bibliotek peptydowych na żywicy wyposażonej w tak zaprojektowany linker, N-koń-

cowe grupy aminowe sekwencji peptydowych zostały zablokowane przez acetylację. Hydroliza enzymatyczna wiązania peptydowego powoduje utworzenie wolnych grup aminowych. Do ich identyfikacji zaproponowaliśmy znany w chemii, barwny test Kaisera, bazujący na reakcji I-rzędowej grupy aminowej z ninhydryną i prowadzący do utworzenia purpury Ruhemana [70].

W celu potwierdzenia użyteczności zaproponowanej metody w analizie bibliotek kombinatorycznych OBOC, zsyntezowano modelowe biblioteki dla chymotrypsyny, katepsyny G oraz kaspazy 3 i 7 [71]. Po hydrolizie enzymatycznej i reakcji ninhydrynowej, ziarna zabarwione na kolor fioletowy (zawierające aktywne, hydrolizowane przez enzym sekwencje peptydowe) oddzielono od ziaren niezabarwionych, a następnie produkty uwolnione z pojedynczych ziaren żywicy poddano analizie ESI-MS/MS. Uzyskane wyniki badań są w pełni zgodne ze znanymi specyficznościami substratowymi enzymów proteolitycznych zastosowanych w tych eksperymentach, co wskazuje na użyteczność zaproponowanej metody w analizie kombinatorycznej.

Z uwagi na niską wydajność hydrolizy enzymatycznej peptydów osadzonych na nośniku stałym i acetylację reszt aminokwasowych *N*-końca, w zaproponowanych bibliotekach kombinatorycznych analiza fragmentu peptydu uwolnionego do roztworu po hydrolizie enzymatycznej nie była możliwa. Dlatego w toku dalszych badań zaproponowaliśmy nowy typ bibliotek peptydowych OBOC, w których znacznik jonizacyjny znajdował się na *N*-końcu peptydów przyłączonych do żywicy za pomocą odpowiedniego wysięgnika. Po hydrolizie enzymatycznej, do roztworu uwalniany jest peptyd modyfikowany grupą zwiększającą jonizowalność i umożliwiającą ultraczułą analizę metodą ESI-MS. Dodatkowo, obecność znacznika jonizacyjnego we fragmencie uwalnianym do roztworu pozwala na monitorowanie aktywności enzymatycznej i szybkości hydrolizy wiązania peptydowego na nośniku stałym. Przydatność tego typu bibliotek kombinatorycznych w badaniach enzymatycznych została sprawdzona na przykładzie modelowych substratów peptydowych dla kaspazy 3 i 7. Uzyskane wyniki pozwoliły potwierdzić znaną specyficzność substratową tych proteaz i dowodzą, że zaproponowane biblioteki mogą stanowić nowe narzędzie analityczne w badaniach szybkości reakcji enzymatycznych na nośniku stałym.

## 6. ZNACZNIKI JONIZACYJNE W BADANIU MARKERÓW CHOROBYCH

Stan przedrzucawkowy (preeklampsja, ang. *preeclampsia*, PE) jest zespołem objawów chorobowych, który może się pojawić po 20 tygodniu ciąży, charakteryzującym się nadciśnieniem tętniczym oraz objawami uszkodzenia narządów wewnętrznych, zwłaszcza nerek i wątroby [72, 73]. Dotyczy on dużej liczby kobiet ciężarnych (3–7%) i bywa często przyczyną śmierci matki oraz jej nienarodzonego dziecka. PE wiąże się z wysokim ryzykiem wystąpienia komplikacji przedporodo-



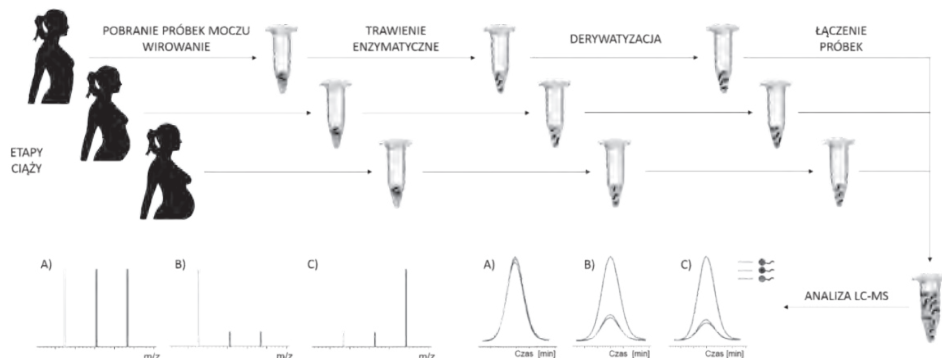
wych, przedwczesnego porodu, poważnych objawów niedorozwoju fizycznego i psychicznego a nawet śmierci noworodka. Dlatego tak ważna jest wczesna diagnostyka PE oraz odpowiednia opieka przedporodowa, umożliwiająca kobietom cierpiącym na PE urodzenie zdrowego dziecka. Niestety, diagnoza PE na etapie bezobjawowym jest niemożliwa, z uwagi na niedostateczną czułość współczesnych metod badawczych. PE związana jest z uszkodzeniem podocytów, co w konsekwencji prowadzi do upośledzenia funkcji nerek. Obecnie uważa się, że wykrycie podocytów w moczu (podocytouria) u ciężarnych kobiet świadczy o PE, co umożliwia prognozowanie dalszego rozwoju tej choroby.

W 2013 roku Garovic i in. zaproponowali zastosowanie spektrometrii mas w trybie monitorowania reakcji wielokrotnych (MRM, ang. *multiple reaction monitoring*), połączonej z rozdzielaniem chromatograficznym mieszaniny peptydów tryptycznych uzyskanych po proteolizie próbek moczu pochodzących od kobiet ciężarnych ze zdiagnozowaną preeklampsją [74]. Podejście to bazowało na oznaczeniu tryptycznego fragmentu podocyny o sekwencji  $^{39}\text{H-QEAGPEPSGSGR-OH}^{50}$ , w oparciu o identyfikację powstałych z niego jonów fragmentacyjnych w metodzie MRM. Takie podejście w analizie proteomicznej daje jednoznaczne potwierdzenie obecności danego białka w badanej mieszaninie, a dodatkowo przedstawiony tryb pracy znacznie zwiększa czułość prowadzonych analiz. Zaproponowana sekwencja peptydowa jest charakterystyczna dla ludzkiej podocyny, a dzięki obecności reszty argininy na C-końcu, modelowy peptyd charakteryzuje się wysoką wydajnością jonizacji w analizie MS, co pozwala na jego czułą identyfikację. Przeprowadzone badania wykazały korelację między obecnością modelowego peptydu wybranego do badań i występującymi w moczu pacjentek podocytami, których obecność potwierdzono metodami immunologicznymi.

W roku 2014 Simon i in. zasugerowali, że N-końcowa reszta aminokwasowa (glutamina) w sekwencji peptydowej, zaproponowanej przez Garovic i in. [74], może w warunkach eksperymentu MS/MS ulegać cyklizacji do kwasu piroglutaminowego, co może wpływać na wiarygodność wykonanych analiz [75]. W związku z tym, zaproponowano kolejny tryptyczny fragment podocyny o sekwencji  $^{59}\text{H-APA-ATVVDVDEVR-OH}^{71}$ , mogący stać się peptydem diagnostycznym umożliwiającym identyfikację podocyny w próbkach moczu. Obecność modelowego peptydu także wykazano w próbkach moczu pochodzących od pacjentek ze zdiagnozowaną preeklampsją.

Zaproponowane podejście do analizy peptydowych fragmentów podocyny w tryptycznych hydrolizatach moczu bazuje na identyfikacji peptydów zawierających silnie jonizujące się reszty argininy, podczas gdy hydroliza enzymatyczna przy udziale tripsyny prowadzi także do utworzenia peptydów zawierających na C-końcu resztę lizyny. Peptydy takie często charakteryzują się niższą wydajnością jonizacji, przez co ich identyfikacja w złożonych próbkach biologicznych jest utrudniona. Opracowaliśmy metodę derywatywacji tryptycznych hydrolizatów osadów moczu, polegającą na wprowadzeniu znacznika jonizacyjnego w formie grupy

2,4,6-trifenylopirydyniowej na łańcuch boczny reszty lizyny (Rysunek 11). Taka modyfikacja pozwoliła na ultraczułą analizę peptydów na poziomie attomolowym [76]. Zaproponowaliśmy także inne sekwencje peptydowe stanowiące fragmenty tryptyczne podocyny, które mogą okazać się dobrymi peptydami diagnostycznymi, których identyfikacja w hydrolizacie osadu moczu pozwoli na stwierdzenie obecności podocyny we wczesnym etapie rozwoju preeklampsji. Metoda ta umożliwiła stwierdzenie obecności podocyny w badanych próbkach moczu, co zostało także potwierdzone innymi technikami diagnostyki medycznej.



Rysunek 11. Schemat analizy proteomicznej białek obecnych w moczu pochodzącym od tej samej pacjentki w różnych stadiach PE. Próbki pobrane w różnym czasie są modyfikowane znacznikami o różnym składzie izotopowym, łączone i analizowane techniką LC-MS

Figure 11. Proteomic analysis of proteins present in patient's urine during various stages of preeclampsia. The samples were labeled with isotopic markers, pooled and analysed using LC-MS

## UWAGI KOŃCOWE

Znaczniki jonizacyjne wyraźnie zwiększają czułość analizy peptydów za pomocą spektrometrii mas [77]. Różnorodność obecnie stosowanych reagentów pozwala na wprowadzenie znaczników jonizacyjnych do wielu grup funkcyjnych analizowanych substancji. Można oczekiwać, że znaczniki jonizacyjne umożliwią zidentyfikowanie nowych biomarkerów, do tej pory nieodkrytych z uwagi na niedostateczną czułość współczesnych metod analitycznych.

Szczególne nadzieje można wiązać z izobarycznymi znacznikami jonizacyjnymi [78], gdyż umożliwiają ilościowe badania porównawcze analitów występujących w ilościach śladowych.

## PODZIĘKOWANIA

Przygotowanie publikacji było możliwe dzięki wynikom uzyskanym w trakcie realizacji projektów finansowanych przez Narodowe Centrum Nauki (UMO-2016/23/B/ST4/01036 i UMO-2015/17/D/ST5/01329).

## PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] M. Barber, R.S. Bordoli, G. J. Elliott A.N. Tyler J.C. Bill, B.N. Green, *Biomed. Mass Spectrom.*, 1984, **11**, 182.
- [2] [https://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/2002/index.html](https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2002/index.html), [data dostępu 17.05.2018]
- [3] B. Domon, R. Aebersold, *Science*, 2006, **312**, 212.
- [4] Z. Zhang, H. Pan, X. Chen, *Mass Spectrom. Rev.*, 2009, **28**, 147.
- [5] N.L. Kelleher, H.Y. Lin, G.A. Valaskovic, D.J. Aaserud, E.K. Fridriksson, F.W. McLafferty, *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, **121**, 806.
- [6] A.B. Hummon, A. Amare, J.V. Sweedler, *Mass Spectrom. Rev.*, 2006, **25**, 77.
- [7] K.F. Medzihradsky, R.J. Chalkley, *Mass Spectrom. Rev.*, 2015, **34**, 43.
- [8] R. Bąchor, P. Mielczarek, M. Rudowska, J. Silberring, Z. Szewczuk, *Int. J. Mass Spectrom.*, 2014, **362**, 32.
- [9] E. Krause, H. Wenschuh, P. Jungblut, *Anal. Chem.*, 1999, **71**, 4160.
- [10] H. Wenschuh, P. Halada, S. Lamer, P. Jungblut, E. Krause, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 1998, **12**, 115.
- [11] T. Nishikaze, M. Takayama, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2006, **20**, 376.
- [12] I.A. Papayannopoulos, *Mass Spectrom. Rev.*, 1995, **14**, 49.
- [13] V.H. Wysocki, G. Tsapralis, L.L. Smith, L.A. Breci, *J. Mass Spectrom.*, 2000, **35**, 1399.
- [14] *Spektrometria mas*, P. Suder, A. Bodzoń-Kuślakowska, J. Silberring (Red.), Wydawnictwo AGH, Kraków 2016.
- [15] P. Roepstorff, J. Fohlman, *Biomed. Mass Spectrom.*, 1984, **11**, 601.
- [16] K. Biemann, *Methods Enzymol.*, 1990, **193**, 886.
- [17] D.L. Chappell, M.E. Lassman, T. McAvoy, M. Lin, D.S. Spellman, O.F. Laterza, *Bioanalysis*, 2014, **6**, 1843.
- [18] E.F. Petricoin, L.A. Liotta, *Clin. Chem.*, 2003, **49**, 533.
- [19] P. Stefanowicz, A. Kluczyk, Z. Szewczuk, *Amino Acids, Peptides and Proteins*, 2016, **40**, 36.
- [20] T. Higashi, S. Ogawa, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2016, **130**, 181.
- [21] S. Wiese, K.A. Reidegeld, H.E. Meyer, B. Warscheid, *Proteomics*, 2007, **7**, 340.
- [22] A. Thompson, J. Schafer, K. Kuhn, S. Kienle, J. Schwarz, G. Schmidt, T. Neumann, C. Hamon, *Anal. Chem.*, 2003, **75**, 1895.
- [23] T. Werner, G. Sweetman, M.F. Savitski, T. Mathieson, M. Bantscheff, M.M. Savitski, *Anal. Chem.*, 2014, **86**, 3594.
- [24] F. Xiang, H. Ye, R.B. Chen, Q. Fu, L. J. Li, *Anal. Chem.*, 2010, **82**, 2817.
- [25] D.C. Frost, T. Greer, L.J. Li, *Anal. Chem.*, 2015, **87**, 1646.
- [26] J. Zhang, Y. Wang, S. Li, *Anal. Chem.*, 2010, **82**, 7588.
- [27] C. Choudhary, M. Mann, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2010, **11**, 427.
- [28] W.P. Heal, E.W. Tate, *Org. Biomol. Chem.*, 2010, **8**, 731.
- [29] G.A. Houry, R.C. Baliban, C.A. Floudas, *Sci. Rep.*, 2011, **1**, 90.

- [30] F.Y. Meng, A.J. Forbes, L.M. Miller, N.L. Kelleher, *Mass Spectrom. Rev.*, 2005, **24**, 126.
- [31] K. Kowalewska, P. Stefanowicz, T. Ruman, T. Frączyk, W. Rode, Z. Szewczuk, *Biosci. Rep.*, 2010, **30**, 433.
- [32] Y.H. Ahn, E.S. Ji, J.Y. Lee, K. Cho, J.S. Yoo, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2007, **21**, 2204.
- [33] M. Ząbczyńska, E. Pocheć, *Post. Bioch.*, 2015, **61**, 129.
- [34] G.A. Rabinovich, Y. van Kooyk, B.A. Cobb, *Ann NY Acad. Sci.*, 2012, **1253**, 1.
- [35] E. Lattova, H. Perreault, *Mass Spectrom. Rev.*, 2013, **32**, 366.
- [36] J.W. Gouw, P.C. Burgers, M.A. Trikoupi, J.K. Terlouw, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2002, **16**, 905.
- [37] M.S. Bereman, D.L. Comins, D.C. Muddiman, *Chem. Commun.*, 2010, **46**, 237.
- [38] S.J. Cho, G. Roman, F. Yebo, Y. Konishi, *Curr. Med. Chem.*, 2007, **14**, 1653.
- [39] C. Weykamp, W.G. John, A. Mosca, *J. Diabetes. Sci. Technol.*, 2009, **3**, 439
- [40] R. Kisugi, T. Kouzuma, T. Yamamoto, S. Akizuki, H. Miyamoto, Y. Someya, J. Yokoyama, I. Abe, N. Hirai, A. Ohnishi, *Clin. Chim. Acta*, 2007, **382**, 59
- [41] A. Lapolla, P. Traldi, D. Fedele, *Clin. Biochem.*, 2005, **38**, 103
- [42] M. Kijewska, A. Kuc, A. Kluczyk, M. Waliczek, A. Man-Kupisinska, J. Łukasiewicz, P. Stefanowicz, Z. Szewczuk, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2014, **25**, 966.
- [43] M. Waliczek, M. Kijewska, M. Rudowska, B. Setner, P. Stefanowicz, Z. Szewczuk, *Sci. Rep.*, 2016, **6**, 37720.
- [44] D.A. Kidwell, M.M. Ross, R.J. Colton, *J. Am. Chem. Soc.*, 1984, **106**, 2220.
- [45] J.E. Vath, K. Biemann, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process.*, 1990, **100**, 287.
- [46] J.T. Stults, J. Lai, S. McCune, R. Wetzelt, *Anal. Chem.*, 1993, **65**, 1703.
- [47] M. Bartlet-Jones, W.A. Jeffery, H.F. Hansen, D.J.C. Pappin, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 1994, **8**, 737.
- [48] B. Spengler, F. Luetzenkirchen, S. Metzger, P. Chaurand, R. Kaufmann, W. Jeffery, M. Bartlet-Jones, D.J.C. Pappin, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process.*, 1997, **70**, 127.
- [49] Y. He, J.P. Reilly, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2008, **47**, 2463.
- [50] K.V. Wasslen, L.H. Tan, J.M. Manthorpe, J.C. Smith, *Anal. Chem.*, 2014, **86**, 3291.
- [51] M. Cydzik, M. Rudowska, P. Stefanowicz, Z. Szewczuk, *J. Pept. Sci.*, 2011, **17**, 445.
- [52] M. Cydzik, M. Rudowska, P. Stefanowicz, Z. Szewczuk, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2011, **22**, 2103.
- [53] B. Setner, M. Rudowska, E. Klem, M. Cebzat, Z. Szewczuk, *J. Mass Spectrom.*, 2014, **49**, 995.
- [54] B. Setner, M. Rudowska, A. Kluczyk, P. Stefanowicz, Z. Szewczuk, *Anal. Chim. Acta*, 2017, **986**, 71.
- [55] B. Setner, Z. Szewczuk, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2018, **410**, 1311.
- [56] M. Wierzbicka, B. Setner, Z. Szewczuk, *Acta Phys. Pol. B, Proc. Suppl.*, 2016, **9**, 345.
- [57] M. Rudowska, D. Wojewska, A. Kluczyk, R. Bąchor, P. Stefanowicz, Z. Szewczuk, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2012, **23**, 1024.
- [58] R. Bąchor, A. Kluczyk, P. Stefanowicz, Z. Szewczuk, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2015, **407**, 6557.
- [59] B. Setner, M. Wierzbicka, L. Jerzykiewicz, M. Lisowski, Z. Szewczuk, *J. Pept. Sci.*, 2016, **22**, S74.
- [60] B. Setner, M. Wierzbicka, M. Lisowski, Z. Szewczuk, *Org. Biomol. Chem.*, 2018, **16**, 825.
- [61] G. Williams, E.P. Maziarz III, T.L. Amyes, T.D. Wood, J.P. Richard, *Biochemistry*, 2003, **42**, 8354.
- [62] A.T. Balaban, C.D. Nenitzescu, *Org. Synth.*, 1964, **44**, 98.
- [63] K. Dimroth, C. Reichardt, K. Vogel, *Org. Synth.*, 1969, **49**, 114.
- [64] M. Waliczek, M. Kijewska, M. Rudowska, B. Setner, P. Stefanowicz, Z. Szewczuk, *Sci. Rep.*, 2016, **6**, 37720.
- [65] M. Poręba, M. Drąg, *Curr. Med. Chem.*, 2010, **17**, 3968.
- [66] E. Deu, M. Verdoes, M. Bogyo, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2012, **19**, 9.
- [67] D.B. Kassel, *Chem. Rev.*, 2001, **101**, 255.

- [68] R. Bąchor, M. Cydzik, M. Rudowska, A. Kluczyk, P. Stefanowicz, Z. Szewczuk, *Mol. Divers.*, 2012, **16**, 613.
- [69] R. Bąchor, A. Kluczyk, P. Stefanowicz, Z. Szewczuk, *Mol. Divers.*, 2013, **17**, 605.
- [70] E. Kaiser, R.L. Colescott, C.D. Bossinger, P.I. Cook, *Anal. Biochem.*, 1970, **34**, 595.
- [71] R. Bąchor, A. Kluczyk, P. Stefanowicz, Z. Szewczuk, *J. Pept. Sci.*, 2016, **22**, S54.
- [72] K. Panek-Laszczyńska, A. Konieczny, E. Milewska, K. Dąbrowska, R. Bąchor, W. Witkiewicz, Z. Szewczuk, *Biomarkers*, 2018, **23**, 207
- [73] E.V. Kuklina, C. Ayala, W.M. Callaghan, *Obstet. Gynecol.* 2009, **113**, 1299
- [74] V.D. Garovic I.M. Craici, S.J. Wagner, W.M. White, B.C. Brost, *Nephrol. Dial. Transplant.*, 2013, **28**, 1555.
- [75] R. Simon, J. Lemoine, C. Fonbonne, A. Jaffuel, J.F. Léonard, J.C. Gautier, O. Pasquier, A. Salvador, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2014, **94**, 84.
- [76] M. Waliczek, M. Kijewska, M. Rudowska, B. Setner, P. Stefanowicz, Z. Szewczuk, *Sci. Reports*, 2016, **6**, 37720.
- [77] A. Leitner, *Anal. Chim. Acta*, 2018, **1000**, 2.
- [78] B. Setner, P. Stefanowicz, Z. Szewczuk, *J. Mass Spectrom.*, 2018, **53**, 115.

Praca wpłynęła do Redakcji 16 lipca 2018



## INFORMACJE

### INFORMACJE REDAKCJI „WIADOMOŚCI CHEMICZNYCH”

#### CENY PRENUMERATY NA ROK 2018

Redakcja miesięcznika PTChem „Wiadomości Chemiczne” zawiadamia, że wysokość prenumeraty rocznej „Wiadomości Chemicznych” za 2018 r. będzie wynosiła **231 zł** dla instytucji i niezrzeszonych prenumeratorów indywidualnych. Dla członków PTChem **20 zł**. Należność za prenumeratę prosimy przekazywać na konto:

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

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

- prenumerata „Wiadomości Chemicznych” na rok 2018 wraz ze składką członkowską, w ramach której dostarczany jest „Orbital”, wynosi **70 zł** (składka – 50 zł, prenumerata – 20 zł);
- emeryci, doktoranci oraz studenci płacą **35 zł** (składka – 15 zł, prenumerata – 20 zł); a nauczyciele szkół średnich i podstawowych płacą **40 zł** (składka – 20 zł, prenumerata – 20 zł).

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

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

---

PATRONAT MEDIALNY PUBLIKACJI KSIĄŻKOWYCH  
WYDAWNICTWA NAUKOWEGO PWN SA

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

Arthur Israel-Vogel

*Preparatyka organiczna*

(z ang. przełożyli: Maria Bukowska, Daniela Buza, Ewa Kołaczkowska, Mariola Koszytkowska-Stawińska, Hanna Krawczyk, Tadeusz Mizerski, Magdalena Popławska, Przemysław Szczeciński)

Renata Jastrząb, Romualda Bregier-Jarzębowskiej, Małgorzata T. Kaczmarek,  
Martyny Nowak

*Zbiór zadań z podstaw chemii*

Grzegorz Wielgosiński, Roman Zarzycki

*Technologie i procesy ochrony powietrza*

Maria Cieślak-Golonka, Jan Starosta, Anna Trzeciak

*Chemia koordynacyjna w zastosowaniach*

Wiktor Kubiński

*Wybrane metody badania materiałów. Badanie metali i stopów*

Praca zbiorowa pod redakcją Kamilli Małek

*Spektroskopia oscylacyjna. Od teorii do praktyki*

Zdzisław Migaszewski, Agnieszka Gałuszka

*Geochemia środowiska*

Robert J. Whitehurst, Marten Van Oort

*Enzymy w technologii spożywczej*

Jan F. Rabek

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

Jan F. Rabek

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

Praca zbiorowa pod redakcją Anny Swiderskiej-Środy, Witolda Wojkowskiego,  
Małgorzaty Lewandowskiej i Krzysztofa J. Kurzydłowskiego

*Świat nanocząstek*



Praca zbiorowa pod redakcją Kamili Żelechowskiej  
*Nanotechnologia w praktyce*

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

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

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

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

Takemura Masaharu  
*Mangowy przewodnik. Biochemia*

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

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

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

*Ochrona środowiska dla inżynierów, praca zbiorowa*

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

*Wirusologia*  
red. nauk. Anna Goździcka-Józefiak

Lubert Stryer  
*Biochemia Wyd. 5*



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 indywiduali chemicznych. Zalecenia 1993*, red. T. Sokołowska i A. Wiśniewski, cena 15 zł

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

### 1. Informacje ogólne

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

Dodatkową ofertę Wydawnictwa stanowi seria, „Biblioteka Wiadomości Chemicznych”, gdzie publikowane są dłuższe artykuły przeglądowe lub monografie poświęcone ważnym i aktualnym problemom współczesnej chemii. Autorzy, którzy chcieliby takie prace napisać, powinni wcześniej skontaktować się z Redakcją, a następnie przesłać wstępnie przygotowaną publikację (redagowaną na wzór artykułów w czasopiśmie „Wiadomości Chemicznych”) lub informację na temat przygotowywanej pracy – tytuł przygotowywanej publikacji, przybliżoną liczbę stron, tabel, rysunków. W chwili obecnej Redakcja nie posiada środków na finansowanie prac w serii „Biblioteka Wiadomości Chemicznych”. W zależności od sytuacji finansowej Wydawnictwa, Redakcja zastrzega sobie prawo negocjacji kosztów druku z autorami lub Instytucjami zlecającymi druk.

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

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

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

- Prace nie były wcześniej publikowane, ani nie są złożone w redakcji innego czasopisma.
- Autorzy prac stosują się do wymagań praw autorskich tzn. w przypadku zamieszczania rysunków, tabel itp., pochodzących z opracowań opublikowanych w innych czasopismach lub publikacjach zwartych, posiadają pisemną zgodę na ich przedruk.
- Opublikowana raz praca bez zgody Redakcji, nie może być wydawana gdzie indziej.
- Autorzy przysyłający prace po raz pierwszy powinni podać swój numer telefonu oraz adresy poczty tradycyjnej i elektronicznej. Jest to niezbędny warunek sprawnego przebiegu opracowania redakcyjnego tekstu.
- Autorzy zobowiązani są do wykonania korekty tekstu. W pracach przyjętych do druku Redakcja ma prawo dokonywania niezbędnej korekty.
- Jeżeli autorzy nie zastrzegą inaczej w momencie zgłoszenia pracy, wydawca nabywa ogólnych praw autorskich do wydrukowanych prac (w tym prawo wydawania na nośnikach elektronicznych oraz w Internecie). Tytułem powyższego wykorzystania utworów autorom nie są wypłacane honoraria.
- Wszystkie nadsyłane prace są poddawane wstępnej ocenie, która określa czy odpowiadają randze i profilowi „Wiadomości Chemicznych” oraz czy zostały przygotowane zgodnie z formalnymi wymogami MNiSW oraz Redakcji.
- Po uzyskaniu pozytywnej wstępnej oceny wszystkie prace są recenzowane przez co najmniej dwóch niezależnych recenzentów, zgodnie ze wskazówkami zawartymi w broszurze informacyjnej Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego, [http://www.nauka.gov.pl/fileadmin/user\\_upload/ministerstwo/Publikacje/20110216\\_MNISW\\_broszura\\_210x210.pdf](http://www.nauka.gov.pl/fileadmin/user_upload/ministerstwo/Publikacje/20110216_MNISW_broszura_210x210.pdf).
- O przyjęciu pracy do druku decyduje Komitet Redakcyjny.
- Prace, które Komitet Redakcyjny na podstawie uzyskanych recenzji stwierdził, że nie należy przyjąć do druku w czasopiśmie, po uwzględnieniu sugestii recenzentów mogą być powtórnie przesłane do czasopisma. W takim przypadku praca traktowana jest jako nowy tekst i ponownie przechodzi pełną procedurę recenzowania.
- Ponadto Komitet Redakcyjny informuje, że tzw. „ghostwiting” (ktoś wniósł znaczący wkład w powstanie publikacji, a nie został przedstawiony jako współautor lub też nie został wymieniony w podziękowaniu zamieszczonym w publikacji) lub „guest authorship” (udział autora jest znikomy lub też w ogóle nie miał miejsca, a mimo to jest współautorem publikacji) są przejawem nierzetelności naukowej. Wszelkie przejawy nierzetelności naukowej, łamania i naruszania zasad etyki obowiązującej w nauce będą ujawniane, włącznie z powiadomieniem jednostek zatrudniających autorów.
- Autorzy mają prawo do zaproponowania co najmniej trzech niezależnych recenzentów, jednak ostatecznego wyboru anonimowych recenzentów dokonuje Redakcja.

### 3. Koszty

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

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

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

### 4. Informacje szczegółowe dotyczące przygotowania maszynopisu do druku

#### 4.1. Wymagania merytoryczne

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

#### 4.2. Wymagania techniczne składu tekstu

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

Abstract

Wykaz stosowanych symboli i oznaczeń

Wprowadzenie

1. Tytuł rozdziału

1.1. Tytuł podrozdziału itp.

Uwagi końcowe

Podziękowanie

Piśmiennictwo cytowane

- **Kolejne strony pracy powinny zawierać:**

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

- **obszerne streszczenie pracy w języku angielskim** (od 1800 do 2700 znaków ze spacjami) z uwzględnieniem cytowanego piśmiennictwa oraz odsyłaczami do tabel, rysunków zamieszczonych w tekście (Rys. 1, Tab. 1-2, Schemat 1) oraz **słowa kluczowe** – nie więcej niż 6, uzyskane najlepiej z bazy haseł przedmiotowych podawane w języku angielskim i polskim,
- **wykaz stosowanych skrótów** – w przypadku niewielkiej liczby skrótów lub akronimów nie jest konieczne zamieszczanie tej pozycji, wówczas, skróty wyjaśniamy w tekście przy pierwszym użyciu. Angielskie skróty należy podać i wyjaśnić wg poniżej podanego wzoru lub w oparciu o inne prace zamieszczone w „Wiadomościach Chemicznych”. Przykład: dla skrótu SSRI – selektywne inhibitory zwrotnego wychwytu serotoniny (ang. *Selective Serotonin Reuptake Inhibitor*),
- **dalszy tekst pracy zgodny z podawanym wcześniej spisem treści.**
- **Tabele, rysunki, fotografie**  
Tabele i rysunki **powinny być zamieszczone w przesyłanym tekście** oraz dodatkowo (po zatwierdzeniu pracy do druku, na etapie przygotowywania szczytki) dołączone w postaci osobnych plików zapisanych w formacie pdf, doc, jpg, tiff.  
Tabele i rysunki powinny być przejrzyste, zawierać informacje niezbędne do zrozumienia treści, bez konieczności poszukiwania objaśnień w tekście pracy, należy je numerować cyframi arabskimi oraz podać tytuł (polski/angielski, nad tabelą, pod rysunkiem, Times New Roman, 10 p).  
Wszystkie fotografie – należy przesłać w postaci plików zapisanych w formacie tif, jpg lub podobnym, **każdą zapisać w oddzielnym pliku o rozdzielczości co najmniej 300 dpi.**
- **Piśmiennictwo cytowane**  
Piśmiennictwo należy zestawić numerycznie według kolejności cytowania w tekście, należy cytować wyłącznie pozycje istotne dla treści pracy w sposób precyzyjny.  
W przypadku **artykułów z czasopism tradycyjnych**, opis powinien zawierać kolejno następujące elementy: inicjały imion i nazwisko autora (autorów), skrót tytułu czasopisma zgodny z przyjętymi normami, rok wydania, **numer wolumenu zaznaczony pogrubioną czcionką**, numer pierwszej strony cytowanej pracy, np.  
[1] J. Kowalski, Wiad.Chem., 2007, **61**, 473.  
[2] W. Kowalski, A. Nowak, Przem. Spoż. 2010, **51**, 3.  
W przypadku **książek** najprostszy opis powinien zawierać: inicjały imion i nazwisko autora (autorów), tytuł książki, nazwę wydawcy, miejsce wydania, rok wydania, np.  
[1] J. Malinowski, Tytuł książki, PWN, Warszawa, 2004.  
[2] W. Kowalski, Tytuł książki, Volumed, Wrocław, 1999  
W przypadku zasobów Internetowych najprostszy opis powinien zawierać: inicjały imion i nazwisko autora (autorów), tytuł (artykułu) dokumentu online, [dostęp], wydawca, [data dostępu]. Warunki dostępu, np.  
[7] J. Kowalski, Tytuł artykułu. [online], wydawca, [dostęp: 2010-05-20]. Dostępny w Internecie: <http://www.....>

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

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

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

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

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

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

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

*Redakcja „Wiadomości Chemicznych”*





SPIS TREŚCI

Kazimiera LUKJAN: In memoriam Profesor Małgorzacie Jeżowskiej-Bojczuk 1953–2018 .....	367
Wojciech SZCZEPANIK: Wspomnienie .....	375
Piotr MŁYNDARZ, Gabriela BUGLA-PŁOSKOŃSKA, Kamila STOKOWA-SOŁTYS, Magdalena ROWIŃSKA-ŻYREK, Grażyna STOCHEL: Od współpracowników .....	379
Karolina KRZYWOSZYŃSKA, Henryk KOZŁOWSKI: Metalotioneiny i motywy policysteinylowe – oddzia- ływanie z jonami metali .....	383
Jan WRZESIŃSKI, Jerzy CIESIOŁKA: Regulacja aktywności katalitycznej rybozymów HDV oraz deoksy- rybozymów za pomocą antybiotyków i jonów metali .....	397
Anna KĘDZIORA, Agata BERNAT, Rafał Jakub WIGLUSZ: Badania nanokompozytów hydroksypaty- towych wobec bakterii beztlenowych .....	417
Małgorzata OSTROWSKA, Yuliya TOPORIVSKA, Monika PYRKOSZ-BULSKA, Elżbieta GUMIENNA-KON- TECKA: Tiosemikarbazony – właściwości koordynacyjne w aspekcie aktywności biologicznej. . .	449
Magdalena ROWIŃSKA-ŻYREK: Wyjaśnienie elementów homeostazy niklu(II) i cynku(II) u bakterii i grzybów .....	469
Kamila STOKOWA-SOŁTYS: Antybiotyki peptydowe i ich kompleksy z jonami metali .....	497
Marta LÖFFLER, Amanda GAŁKOWSKA, Maria KORABIK, Józef UTKO, Tadeusz LIS: Molekularne mate- riały magnetyczne .....	523
Urszula K. KOMARNICKA, Paulina K. WALENCIK, Monika K. LESIÓW, Katarzyna KRUPA: Antybiotyki fluorochinolonowe i ich modyfikacje strukturalne. ....	543
Daria SZELIGA, Maria KORABIK, Justyn OCHOCKI: Farmakologiczna aktywność flawonoidów i amino- flawonów. ....	563
Monika K. LESIÓW, Katarzyna KRUPA, Urszula K. KOMARNICKA, Paulina K. WALENCIK: Białka błony zewnętrznej <i>Fusobacterium nucleatum</i> jako potencjalny czynnik promocji nowotworu jelita grubego .....	585
Katarzyna KRUPA, Monika K. LESIÓW, Teresa KOWALIK-JANKOWSKA: Peptydy jako potencjalne ligandy wiążące jony metali przejściowych .....	597
Remigiusz BĄCHOR, Monika BIERNAT, Marek CEBRAT, Monika KIJEWSKA, Alicja KLUCZYK, Mariola KUCZER, Aneta PALUCH, Mateusz WALICZEK, Magdalena WIERZBICKA, Piotr Stefanowicz, Zbigniew SZEWCZUK: Spektrometria mas w analizie białek i peptydów: znaczniki jonizacyjne . .	609
<b>Informacje</b> .....	635