

Badania i Rozwój Młodych Naukowców w Polsce

Nauki przyrodnicze

Część II



www.mlodzinaukowcy.com

Poznań 2020

Redakcja naukowa

dr Jędrzej Nyćkowiak

dr hab. Jacek Leśny, prof. UPWR

Wydawca

Młodzi Naukowcy

www.mlodzinaukowcy.com

wydawnictwo@mlodzinaukowcy.com

ISBN (całość 978-83-66392-59-5)

ISBN (wydanie online 978-83-66743-01-4)

ISBN (wydanie drukowane 978-83-66743-00-7)

Ilość znaków w książce: 537 tys.

Ilość arkuszy wydawniczych: 13,4

Data wydania: wrzesień 2020

Niniejsza pozycja jest monografią naukową. Jej rozdziały zostały wydrukowane zgodnie z przesłanymi tekstami po ich zaakceptowaniu przez recenzentów. Odpowiedzialność za zgodne z prawem wykorzystanie użytych materiałów ponoszą autorzy poszczególnych rozdziałów.

Spis treści

1. Przegląd oraz charakterystyka nowoczesnych materiałów inteligentnych i ich praktyczne zastosowania	7
<i>Fenyk Anna, Zieliński Marek, Miękoś Ewa, Chreścijańska Ewa, Masek Anna</i>	
2. Phos-tag a new approach to determine phosphorylated proteins	14
<i>Filipek Kamil</i>	
3. Bacterial replication and transcription as a target for antibiotics	20
<i>Filipek Kamil</i>	
4. Naczynioaktywny polipeptyd jelitowy (VIP) we włóknach nerwowych zlokalizowanych w warstwie mięśniowej ściany tchawicy świni domowej	28
<i>Gonkowski Ignacy</i>	
5. Propozycje definicji życia w kontekście obiektów o statusie problematycznym – przegląd literatury	34
<i>Krzysztof Gosik, Sebastian Mertowski, Marta Gosik</i>	
6. Występowanie germanu (Ge) w środowisku naturalnym	39
<i>Grygoyć Katarzyna, Jabłońska-Czapla Magdalena</i>	
7. Tellur jako pierwiastek krytyczny należący do LSTCE (less-studied technology-critical elements)	44
<i>Grygoyć Katarzyna, Jabłońska-Czapla Magdalena</i>	
8. Wszechstronny potencjał β-laktoglobuliny w świecie nauki	49
<i>Gryma-Kowalik Jolanta, Pożycka Jadwiga, Szkudlarek Agnieszka, Rogóż Wojciech, Maciążek-Jurczyk Małgorzata</i>	
9. Wybrane metody ekstrakcji w układzie ciało stałe–ciecz i ciecz–ciało stałe – podstawy teoretyczne oraz przykładowe zastosowanie w świetle współczesnych badań naukowych	55
<i>Maciej Poznań, Kamila Kasprzak-Drozd, Anna Oniszczyk</i>	
10. Właściwości fotokatalityczne ZrO_2 w obszarze światła widzialnego	62
<i>Kucio Karolina</i>	
11. Synteza fotokatalizatorów na bazie TiO_2	68
<i>Kucio Karolina</i>	
12. Antybakteryjne działanie kwasu hialuronowego	74
<i>Ładniak Agata</i>	
13. Rola parametrów powierzchniowych w adhezji i tworzeniu biofilmu przez bakterie	81
<i>Ładniak Agata</i>	
14. Pęcherzyki błonowe – jeden z mechanizmów antagonistycznych oddziaływań międzykomórkowych Część I: charakterystyka pęcherzyków błonowych i ich udział w patogenie bakterijnej	88
<i>Adrian Macion</i>	
15. Pęcherzyki błonowe – jeden z mechanizmów antagonistycznych oddziaływań międzykomórkowych Część II: charakterystyka pęcherzyków błonowych produkowanych przez patogenne bakterie gramujemne	95
<i>Adrian Macion</i>	
16. Techniki spektroskopowe wykorzystywane w analizie strukturalnej białek – przegląd literaturowy	103
<i>Anna Ploch-Jankowska, Danuta Pentak</i>	

17. Wybrane biosurfaktanty drożdżowe	112
<i>Rekiel Edyta</i>	
18. Biosurfaktanty w zastosowaniach kosmetycznych	117
<i>Rekiel Edyta</i>	
19. Systemy CRISPR-Cas w obronie przed wirusami	122
<i>Paulina Smaruj</i>	
20. Przegląd zintegrowanych z genomem ruchomych elementów genetycznych	129
<i>Paulina Smaruj</i>	
21. Surfaktanty – właściwości i zastosowanie układów micelarnych	136
<i>Szaniawska Magdalena</i>	
22. Alkaloidy – budowa, właściwości i zastosowania	144
<i>Szaniawska Magdalena</i>	

Przedmowa

Szanowni Państwo, wydawnictwo „Młodzi Naukowcy” oddaje do rąk czytelnika kolekcję trzynastu monografii naukowych dotyczących szerokiego spektrum nauk. Znajdują się tutaj pozycje dotyczące nauk przyrodniczych, nauk medycznych i nauk o zdrowiu, szeroko pojętych nauk humanistycznych i społecznych oraz nauk technicznych i inżynierskich.

W prezentowanych monografiach poruszany jest bardzo szeroki przekrój zagadnień, jednak każda z osobna składa się z kilkunastu rozdziałów, spójnych tematycznie, dających jednocześnie bardzo dobry przegląd tematyki naukowej jaką zajmują się studenci studiów doktoranckich lub ich najmłodsi absolwenci, którzy uzyskali już stopień doktora.

Czytelnikom życzymy wielu przemyśleń związanych z tematyką zaprezentowanych prac. Uważamy, że doktoranci i młodzi badacze z pasją i bardzo profesjonalnie podchodzą do swojej pracy, a doświadczenie jakie nabierają publikując prace w monografiach wydawnictwa „Młodzi Naukowcy”, pozwoli im udoskonalać swój warsztat pracy. Dzięki temu, z pewnością wielu autorów niniejszych prac, z czasem zacznie publikować prace naukowe w prestiżowych czasopismach. Przyczyni się to zarówno do rozwoju nauki, jak i każdego autora, budując jego potencjał naukowy i osobisty.

Redakcja

1. Przegląd oraz charakterystyka nowoczesnych materiałów inteligentnych i ich praktyczne zastosowania

The review and characteristics of modern intelligent materials and their practical applications

Fenyk Anna⁽¹⁾, Zieliński Marek⁽¹⁾, Miękoś Ewa⁽¹⁾, Chreścijańska Ewa⁽²⁾, Masek Anna⁽³⁾

⁽¹⁾ Katedra Chemii Nieorganicznej i Analitycznej, Uniwersytet Łódzki

⁽²⁾ Instytut Chemii Ogólnej i Ekologicznej, Politechnika Łódzka

⁽³⁾ Instytut Technologii Polimerów i Barwników, Politechnika Łódzka

Anna Fenyk: anna.fenyk@chemia.uni.lodz.pl

Słowa kluczowe: struktury smart, sterowanie, produkty funkcjonalne

Streszczenie

W ostatnich kilkudziesięciu latach prowadzone są na świecie liczne badania nad rozwojem grup substancji, których właściwości mogą być zmieniane za pomocą różnych sygnałów zewnętrznych np. pola magnetycznego, elektrycznego, temperatury, ciśnienia, światła itp. Powszechnie klasyfikowane są one do tzw. grupy materiałów „inteligentnych”. Artykuł przedstawia zagadnienia związane z materiałami inteligentnymi, podział tych materiałów, ich podstawowe cechy oraz właściwości a także opisuje, jaki wpływ mają czynniki zewnętrzne na zmianę tych właściwości. Materiały tego typu, posiadają swoje specyficzne cechy, dzięki którym coraz chętniej wykorzystywane są one w różnych dziedzinach nauki, techniki a także w rozmaitych gałęziach przemysłu. W artykule opisano także korzyści stosowania materiałów inteligentnych jak również zawarto informacje na temat wszelkiego rodzaju zastosowania tego typu materiałów ze szczególnym uwzględnieniem rozwoju w nowoczesnej inżynierii materiałowej oraz medycynie.

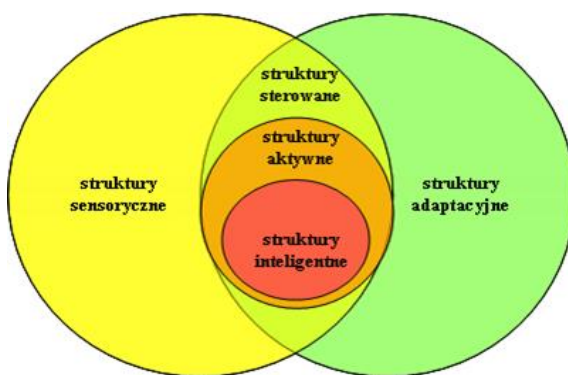
1. Wstęp

Dynamiczny rozwój nauki, przemysłu i technologii w dzisiejszych czasach w dużej mierze opiera się na postępie w tworzeniu nowych materiałów a także poznawaniu i udoskonalaniu własności surowców już znanych. W latach 80 XX wieku pojawiło się zainteresowanie materiałami, które zaczęto określać jako inteligentne (Agneni i in. 2001). Charakteryzują się one zdolnością odpowiedzi na zadany sygnał wejściowy w pewien charakterystyczny sposób. Grupa tych materiałów nazywana jest również aktywnymi bądź adaptacyjnymi (ang. active, adaptive materials). Należy zauważyć, że niektóre grupy tych materiałów były znane i stosowane wcześniej, ale dopiero odkrycie ich specyficznych cech spowodowało wzrost zainteresowania nimi. Lata dziewięćdziesiąte XX wieku oraz początek XXI wieku to niezwykle duże zainteresowanie i burzliwy rozwój badań naukowych w obszarze materiałów inteligentnych (Ćwikła 2008). Dzięki swoim unikalnym właściwościom, materiały funkcjonalne znajdują szerokie zastosowania praktyczne a na przełomie ostatnich lat technologia ich produkcji osiągnęła na tyle wysoki poziom, że większość z nich charakteryzuje się dużą trwałością właściwości, a to z kolei przekłada się na ich praktyczne zastosowanie. Dlatego też są one wciąż niesłabnącym przedmiotem zaawansowanych badań w wielu ośrodkach naukowych na świecie (Ławniczak i Milecki 1999). W tym miejscu warto zwrócić uwagę, że budowa wszelkiego rodzaju urządzeń, stosowanych w przemyśle samochodowym, samolotowym, medycynie wymaga stosowania zaawansowanych technologii, zarówno w odniesieniu do samego tworzywa, jak i składu poszczególnych elementów, wspomagających pracę nowo tworzonego materiału. Analiza literatury na temat materiałów „smart” potwierdza, iż stały się one na przestrzeni kilkudziesięciu lat, obiektem zainteresowania wielu naukowców w skali międzynarodowej.

2. Opis zagadnienia

Powstawanie coraz bardziej skomplikowanych urządzeń, szybki rozwój technologii i zapotrzebowania na nowe materiały spowodowały pojawienie się nowych kompozytów i tzw.

materiałów inteligentnych. Materiały inteligentne to takie materiały, które pod wpływem działania czynników zewnętrznych takich jak: temperatura, pole elektryczne i magnetyczne, wilgotność, ciśnienie, oświetlenie, mogą zmieniać swoje niektóre właściwości, dając możliwość praktycznego zastosowania. Odpowiedzią na taką zmianę będzie zmiana jednej z cech materiału inteligentnego: kształtu, przewodnictwa, rozmiaru, struktury, koloru, polaryzacji, czy własności magnetycznych. Aby móc zakwalifikować materiał jako "inteligentny", powinien on charakteryzować się pewnymi właściwościami m.in. "czucia", a więc wykrywania bodźców i odpowiedzi na nie z góry określony sposób i w jak najkrótszym czasie, a także mieć możliwość powrotu do stanu wyjściowego po ustąpieniu działającego bodźca oraz być zdolny do samokontroli (Bajkowski 2014). Bodźce te mogą obejmować zmiany chemiczne, elektryczne, mechaniczne, termiczne i magnetyczne w środowisku. Reakcja na te zmiany zależy od materiału. Inteligentne materiały można zdefiniować jako materiały, które reagują na zmiany środowiskowe w najbardziej optymalnym stanie i wykazują własne funkcje zgodnie z tymi zmianami. Właśnie dzięki wielkiemu potencjałowi i możliwościom stosowania w wielu aplikacjach inżynierskich materiałów inteligentnych, naukowcy poświęcają tej dziedzinie coraz więcej uwagi (Ścisło 2011). Materiał inteligentny może zmieniać swoje właściwości pod wpływem bodźców zewnętrznych w sposób przewidywalny ale ważne jest przy tym to, aby uzyskanie oczekiwanych efektów odbyło się w czasie rzeczywistym lub zbliżonym do rzeczywistego. Istotną zaletą materiałów funkcjonalnych jest to, że zmianami ich własności można sterować według z góry założonych strategii (Krawczuk i in. 2009). Inteligentne struktury można klasyfikować na podstawie stopnia zaawansowania, a związek między tymi typami struktur przedstawiono na rysunku 1. Poniższy schemat przedstawia wzajemne zależności pomiędzy poszczególnymi strukturami smart. Materiały lub struktury „inteligentne” oraz „aktywne”, a więc te które charakteryzują się specyficznymi właściwościami, to tylko niewielkie ilości grup materiałów sensorycznych i adaptacyjnych. Interesujący jest jednak wzajemny układ przenikających się właściwości pozostałych grup materiałów i struktur sterowalnych (Rys.1). (Bajkowski 2014).



Rys. 1. Klasyfikacja struktur „smart” (Bajkowski 2014).

Połączenie inteligentnych materiałów ze strukturami konwencjonalnymi ,powoduje, że nowopowstały materiał uzyskuje cechy inteligentnych struktur (Ghareeb i in. 2018).

Takagi rozróżnił pojęcia smart i intelligent materials:

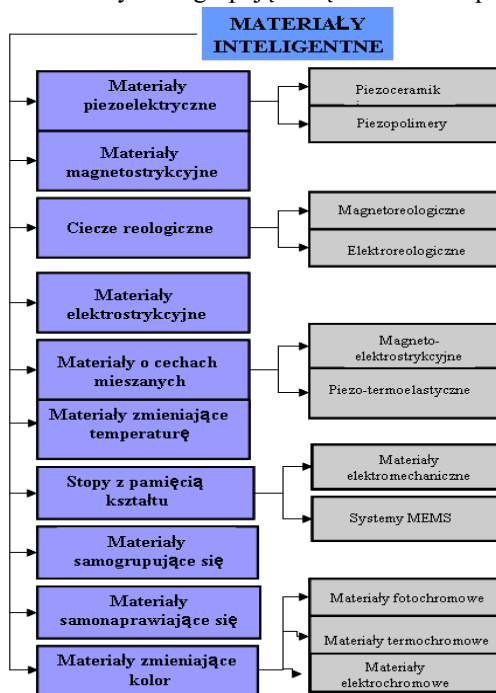
- a) materiał inteligentny to taki, który pod wpływem działania bodźców zewnętrznych, zmienia swoje niektóre właściwości, pozwalając na uzyskanie i wykorzystanie pożądanego efektu
- b) smart ogranicza się do uzyskania efektu zmiany właściwości pod wpływem działania bodźców zewnętrznych w sposób kontrolowany i przewidywalny (Takagi 1999).

Jak widać istotne jest to, aby materiał zachowywał się w określony sposób pod wpływem danego czynnika i robił to przewidywalnie. Dopiero po wykazaniu obu tych cech można go określić mianem materiału inteligentnego. Przewidywalność materiału umożliwia zaprojektowanie jego właściwości pod konkretne zastosowanie oraz jego powtarzalność (Czerwińska 2012). Aktualnie obserwowane kierunki badań materiałów funkcjonalnych koncentrują się na projektowaniu

i wytwarzaniu nowych struktur inteligentnych, opisie mechanizmów opisujących efekt oraz poszukiwaniu zastosowań urządzeń pracujących na ich bazie.

3. Przegląd literatury

Tematyka związana z materiałami smart, inteligentnymi staje się coraz bardziej aktualna w związku z szerokim zastosowaniem owych materiałów co potwierdza stale rosnąca liczba prac poświęcona tej problematyce. Przyjmując podstawowe kryterium klasyfikacji materiałów "smart", a więc zmianę właściwości zachodzącą pod wpływem oddziaływania zewnętrznego czynnika fizycznego, ale dodatkowo uwzględniając też cechy ważne z inżynierskiego punktu widzenia, w literaturze dokonano wielu ich podziałów klasyfikacyjnych (Bajkowski 2014). Materiały inteligentne mogą emitować światło (np. materiały elektroluminescencyjne), zmieniać swoją temperaturę (m. termoelektryczne), gęstość (np. ciecze elektoreologiczne), kolor (np. m. termochromowe) jak również kształt lub (np. materiały piezoelektryczne, polimery przewodzące). Do tej grupy należy zaliczyć także materiały samogrupujące się oraz samonaprawiające się.



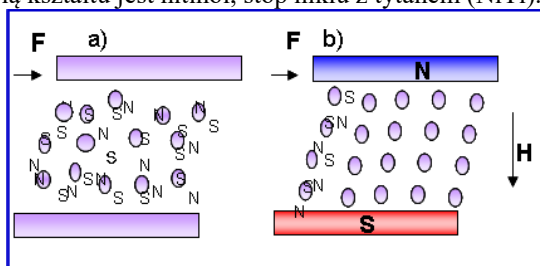
Rys. 2. Podział materiałów inteligentnych (Ćwikła 2008).

Najważniejszymi materiałami z tej grupy są materiały piezoelektryczne, magnetostrykcyjne, stopy z pamięcią kształtu (Shape Memory Alloys (SMA)), ciecze elektro i magnetoreologiczne (Electrorheological Fluids (ERF), Magnetorheological Fluids (MRF)) oraz płyny optyczne (Rys. 2). W motoryzacji, mechanice, elektronice, budownictwie jak również w zastosowaniach medycznych szczególnie popularne są materiały magnetoreologiczne, elektoreologiczne oraz z pamięcią kształtu (Ćwikła 2008). Inteligentne materiały, których właściwości reologiczne są kontrolowane przez zewnętrzne pole magnetyczne, są znane jako materiały magnetoreologiczne. Materiały elektro- oraz magnetoreologiczne aktywnie wykorzystywane w zastosowaniach inżynierskich obejmują ciecze, pianki, smary, elastomery i plastomery:

- a) ciecze elektoreologiczne - są to gęste zawiesiny polaryzowalnych cząsteczek o średnicy ok. 10 nm w cieczy nośnej o małej przewodności elektrycznej np. oleju silikonowym, węglowodorowym, parafinie; pod wpływem przyłożonego pola elektrycznego, cząstki tworzą uporządkowaną przestrzenną sieć, która znacznie utrudnia przemieszczanie się rozpuszczalnika - a więc płynięcie cieczy. Kierunek układania drobin może być prostopadły lub równoległy do

działającego pola elektrycznego. Drobin y ułożone równolegle zapewniają większą wytrzymałość materiału, w porównaniu z drobinami ułożonymi prostopadle.

- b) ciecze magnetoreologiczne - zawierają ferromagnetyczne cząsteczki o średnicach od ok. 0,1 do 10 μm w oleju mineralnym bądź syntetycznym, w składzie zawarte są też środki powierzchniowo czynne, które otaczają cząsteczki, aby je chronić i pomóc utrzymać je w zawieszynie. Ciecze te mogą zmieniać swoją konsystencję z gęstego płynu (o konsystencji np. oleju samochodowego) do prawie ciała stałego. Efekt magnetoreologiczny może znacznie się różnić, w zależności od składu płynu, wielkości i kształtu cząstek magnetycznych a osiągnięty końcowy stan materiału zależy od tego jak silne pole magnetyczne zostanie zastosowane. Proces ten trwa zaledwie kilka (1-10 ms) milisekund i jest odwracalny.
- c) materiały z pamięcią kształtu - są unikatową klasą stopów metali, które mają zdolności do zapamiętywania pierwotnie nadanego kształtu oraz jego odtworzenie pod wpływem odpowiednich warunków zewnętrznych np. zmiany pola magnetycznego lub temperatury (Rys. 4). Zmiana kształtu polega na powrocie materiału do kształtu wyjściowego, tego który został "zapamiętany" lub na tzw. efekcie pseudoelastyczności. Materiały te posiadają dwie stabilne fazy: fazę wysokotemperaturową (austenit) i niskotemperaturową (martenzyt). Element o ustalonym kształcie wyjściowym po zahartowaniu otrzymuje strukturę martenzytyczną, kolejne odkształcenie zmienia tę strukturę. Zmiana struktury martenzytu zachodzi dopiero po ogrzaniu. Odwrotna przemiana martenzytyczna, a w jej wyniku wytworzenie fazy macierzystej i powrót do pierwotnego kształtu następuje podczas dalszego ogrzewania elementu. Przykładem materiału z pamięcią kształtu jest nitinol, stop niklu z tytanem (NiTi).



Rys. 3. Ciecz magnetoreologiczna bez udziału pola magnetycznego (a) oraz łańcuchy cząstek cieczy w polu magnetycznym (b) (Bik 2015).



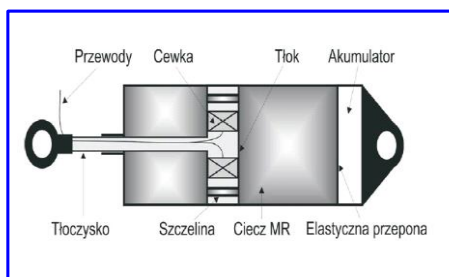
Rys. 4. Przemiany struktury krystalicznej – nitinol (Ćwikła 2008).

Zmiana takich parametrów jak materiał osnowy, rodzaj ziaren wypełniacza i ich kształt, wymiary, stopień wypełnienia, różnego typu dodatki, powodują zmiany właściwości mechanicznych struktury (Zalewski i Bajkowski 2008). Istotne znaczenie mają również warunki zewnętrzne w jakich tworzony jest dany materiał np. temperatura, ciśnienie. Charakterystyka tych parametrów pozwala na wytwarzanie ciekawych aplikacji inżynierskich dla danego typu materiałów, które następnie mają istotny wpływ na późniejsze ich zastosowanie w różnego typu urządzeniach. W praktycznym zastosowaniu materiały inteligentne mogą występować samodzielnie albo stanowić komponent

"struktury" konstrukcyjnej lub funkcjonalnej. Ze względu na swoje specyficzne własności, materiały elektro oraz magnetoreologiczne są stosowane w aktywnych urządzeniach tłumiących drgania, amortyzatorach, elektrycznie kontrolowanych sprzęgłach i zaworach, aplikacjach lotniczych, wykorzystywane są również do kontroli vibracji, tłumienia hałasu, poprawy bezpieczeństwa oraz komfortu użytkowania. Urządzenia korzystające z unikalnych właściwości tych materiałów są ciągłym przedmiotem badań i prac rozwojowych.



Rys. 5. Przykłady tłumików elektoreologicznych (www.matint.pl/materiały-elektrologiczne.php).



Rys. 6. Uproszczony schemat budowy tłumika magnetoreologicznego (Kołek i in.2007).

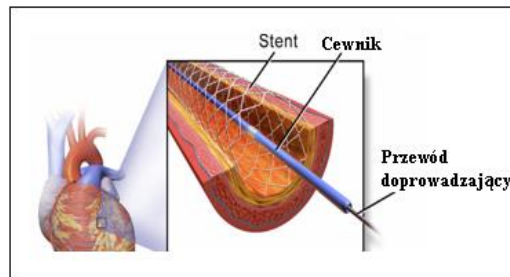
Obecnie efekt pamięci kształtu, występujący w stopach powodują ich coraz szersze zastosowanie w wielu gałęziach techniki takich jak: lotnictwo (np. złączki rurowe w różnego typu instalacjach), elektronika, automatyka i robotyka (np. siłowniki, czujniki temperatury, przełączniki czy sztuczne mięśnie), motoryzacja (np. regulatory przepływu paliwa, czujniki i przełączniki), aparatura medyczna (np. mikro pompy, mikro silniki ciała stałego, dożylny filtry skrzepów, klamry chirurgiczne), medycyna (druty ortodontyczne, implanty długo- i krótkookresowe, instrumenty medyczne). Szczególnie interesujące jest potencjalne zastosowanie w materiałach chirurgicznych, w których żywotność urządzenia, prostota (łatwość użycia) i biokompatybilność jest bardzo ważna.



Rys. 7. Przykładowe zastosowania materiałów z pamięcią kształtu-produkty (www.matint.pl/materiały-z-pamiecicia-ksztaltu.php).

Stenty tętnicze wykorzystujące unikalne właściwości nitinolu, pracują dzięki różnicy temperatur między ludzkim ciałem a otaczającym środowiskiem. Uruchomienie urządzenia następuje

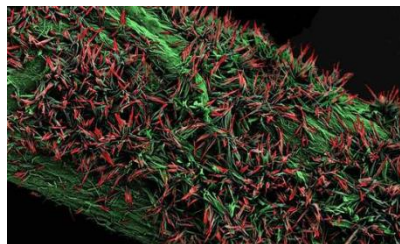
po włożeniu go do ciała, ciepło pacjenta rozszerza urządzenie, aby utrzymać tętnicę otwartą. Ciągłe ciepło ciała pacjenta zapewnia, że urządzenie pozostanie rozszerzone, powodując stały przepływ krwi (Rys.8).



Rys. 8. Stent tętniczy wykorzystujący właściwości nitinolu (www.bareconductive.com/news/types-and-applications-of-smart-materials).

Stopy pamięci kształtu są obecnie używane w różnych zastosowaniach wojskowych. Na przykład tłumiące drgania, rozmieszczone w naddźwiękowych samolotach myśliwskich, zmniejszają irracjonalne naprężenia materiałów, zwiększając w ten sposób żywotność samolotu.

Do klasy materiałów z pamięcią kształtów możemy zaliczyć również różnego typu polimery (z ang. shape memory polymers, SMP). Naukowcy z Donghua University w Chinach stworzyli cienkie, polimerowe włókna, których użyli do konstrukcji szkieletów umożliwiających rozmnażanie i wzrost komórek tkanki kostnej (Rys.9).



Rys. 9. Polimerowe nanowłókna stosowane w regeneracji kości (<https://materialyinzynierskie.pl/polimerowe-nanowlokna-regeneracji-kosci/>).

Wielofunkcyjne rusztowania z pamięcią kształtu mają ogromne możliwości zastosowania w przypadku produkcji implantów medycznych dostarczanych w mało inwazyjnych zabiegach. Nowy materiał może pomóc w szybszej odbudowie otworów i nacięć pozostałych po śrubach i płytkach stosowanych do stabilizacji po złamaniu kości. Obiekty tego typu mogą zostać tymczasowo sprasowane do rozmiarów ułatwiających ich aplikację w organizmie. Po instalacji i zastosowaniu odpowiedniego bodźca implant powraca do pierwotnych wymiarów. Tylko w ciągu ostatniej dekady na bazie SMP powstało kilka urządzeń (lub prototypów), które były badane pod kątem ich wykorzystania w biomedycynie. Wyprodukowano steny dla układu sercowo-naczyniowego, samoczynnie zacieśniające się szwy, igły do dializy, elastyczne pianki do leczenia tętniaków oraz urządzenia do usuwania zakrzepów. Z właściwości polimerów z pamięcią kształtu skorzystali także badacze związani z inżynierią tkankową, którzy zajmują się regeneracją tkanek i narządów in vivo, czyli wewnątrz organizmu. Dzięki biodegradowalnym SMP zabiegi chirurgiczne są mniej inwazyjne, a rusztowania z nich utworzone są projektowane w taki sposób, by wywierać odpowiedni nacisk regulujący zachowanie komórek. Przez zmianę topografii podłoża (szkieletu) otaczające tkanki są stymulowane do szybszego wzrostu (<https://materialyinzynierskie.pl/polimerowe-nanowlokna-regeneracji-kosci/>).

4. Podsumowanie i wnioski

Na całym świecie badania inteligentnych materiałów poszerzyły się i zintensyfikowały, ponieważ wydają się one znaleźć zastosowanie w wielu sektorach, takich jak przemysł lotniczy, samochodowy, służba zdrowia, budownictwo, elektronika, mechatronika itd. Opierając się na koncepcji, która różni się znacznie od tak zwanych materiałów strukturalnych i funkcjonalnych, inteligentne materiały będą odgrywać ważną rolę w naukach o materiałach. Pojawienie się ich niewątpliwie oznaczać będzie epokowy rozwój w wielu dziedzinach nauki i technologii. Stworzenie nowego materiału o danych cechach jest na pewno częścią sukcesu, aby jednak w pełni móc docenić możliwości nowego materiału należy dokładnie zbadać jego właściwości a następnie stworzyć koncepcję jego późniejszego, praktycznego zastosowania. Poznanie tych charakterystycznych, unikatowych, praktycznych właściwości, sprawia, że materiały te są bardzo interesujące zarówno pod względem poznawczym, jak i aplikacyjnym. Ponieważ inteligentne materiały powiązane są z szerokimi, interdyscyplinarnymi obszarami badań, nowe technologie ich produkcji mogą się wzajemnie wspomagać w fazie rozwoju (Susmita 2013). Każda z wymienionych grup materiałów funkcjonalnych ma szeroki zakres zastosowań. Dzięki nim nastąpił postęp w rozwoju technologii. Stykamy się z nimi na każdym kroku, należy zaznaczyć, że wciąż pogłębianą jest wiedza i prowadzone są nad nimi badania. Inteligentne materiały są teraz wykorzystywane do różnych celów, a badacze nadal pracują nad ich dalszym ulepszaniem. Na całym świecie podejmowane są znaczne wysiłki w celu opracowania nowych, inteligentnych materiałów i struktur (Sharma i in. 2019). Wraz z szybkim rozwojem technologii i inżynierii materiałowej, odkryte zostaną najprawdopodobniej jeszcze liczne możliwości zastosowania tych charakterystycznych materiałów. Należy mieć tylko nadzieję, że naukowcy oraz producenci będą podchodzić do tych badań z pełnym entuzjazmem i zaangażowaniem, podkreślając przy tym ich ważne znaczenie w naszym życiu codziennym.

5. Literatura

- Agneni A, Paolozzi A, Sgubini S (2001) Piezoceramic Devices Modeled as Mechanical Systems in Finite Element Codes, COST 4: 591-599.
- Bik T (2015) Ciecze sterowalne ich aspekt nanotechnologiczny. *Mechanik* 11: 845-849.
- Czerwińska R (2012) Wpływ wielkości proszku krzemionki na właściwości reologiczne cieczy koloidalnej. Praca Dyplomowa Inżynierska, Wydział Inżynierii Materiałowej, Politechnika Warszawska.
- Ćwikła A (2008) Medyczne zastosowania materiałów inteligentnych. *Scientific Bulletin of Chełm Section of Technical Sciences* No.1: 15-28.
- Ghareeb N, Farhat M (2018) Smart Materials and Structures: State of the Art and Applications. *Nanotechnology and Applications* (1), 2:1-5.
- Kołek K, Rosół M (2007) Zastosowanie tłumika magnetoreologicznego w tłumieniu drgań. *Pomiary. Automatyka. Robotyka* (5): 5-8.
- Krawczuk M, Palacz M, Żak A (2009) Materiały o sterowanych własnościach fizycznych i ich zastosowania. Wydawnictwo Politechniki Gdańskiej: s 107.
- Ławniczak A, Milecki A (1999) Ciecze elektro- i magnetoreologiczne oraz ich zastosowania w technice”. Wydawnictwo Politechniki Poznańskiej.
- Ścisło Ł (2011) Sterowalne materiały inteligentne w budownictwie. *Budownictwo. Czasopismo Techniczne*, Wydawnictwo Politechniki Wrocławskiej, Zeszyt 3: 163-171.
- Sharma P K, Tejendra Singh T (2019) Smart materials: a review of capabilities and applications. *International Journal of Scientific and Engineering Research* (10), 5: 169-176.
- Susmita K (2013) Introduction, Classification and Applications of Smart Materials: An Overview *American Journal of Applied Sciences* 10 (8): 876-880.
- Takagi T (1999) A Concept of Intelligent Materials. *Journal of Intelligent Materials Systems and Structures* (1): 149-156.
- Zalewski R, Bajkowski J (2008) Analogie i różnice właściwości cieczy magnetoreologicznych oraz granulatów umieszczonych w przestrzeni z podciśnieniem. *Modelowanie Inżynierskie* 36: 313-320.

2. Phos-tag a new approach to determine phosphorylated proteins

Filipek Kamil

Molecular Biology Department, Faculty of Biology and Biotechnology, Maria Curie-Skłodowska University, Lublin

Scientific supervisor: dr Barbara Michalec-Wawiórka

Filipek Kamil: kamilfilipek@wp.pl

Keywords: SDS-PAGE, phosphorylation, pI, zinc, manganese

Abstract

The phosphorylation of protein is a reversible mechanism that occurs in every cell of organisms. This process is a key signaling mechanism for modifying the function or properties of proteins involved in plenty of cellular pathways. Detection of phosphorylated proteins was a pain in the neck of researches. The available techniques were costly like mass spectrometry or dangerous like radioisotope labeling. However, the announcement about Phos-tag has changed the approach of detecting protein phosphorylation. The Phos-tag method uses the alkoxide-bridged dinuclear metal Zn^{2+} or Mn^{2+} complexes as a phosphate-binding tag. These Phos-tag metals bind phosphate group that is bound to serine, tyrosine or threonine residue. The phosphorylated proteins in the gel are shown as slower migration bands contrary to non-phosphorylated counterparts. This novel technique bases on conventional SDS-PAGE electrophoresis and then allows using Western Blotting for further analysis.

1. Introduction

Protein phosphorylation is the most common and important post-translational modification (PTM) that occurs within every cell. This modification plays a big role in cell signaling as well it is essential for the regulation of protein properties (Olsen et al. 2006). The phosphorylation process can modify protein conformation, which leads to activation, deactivation, changing its localization or reaction with other proteins. Phosphorylation is reversible covalent binding of the negatively charged phosphate group to serine, threonine or tyrosine residues on proteins (Newman et al. 2014). In living cells, plenty of proteins dynamically undergo phosphorylation and dephosphorylation in the response of numerous stimuli. This reversible process is regulated by 518 kinases (Manning et al. 2002) and 298 phosphatases (Kerk et al. 2008) and in the last approach of identification of human phosphoproteome estimated about 13 000 phosphoproteins and 230 000 phosphosites in human cells (Vlastaridis et al. 2017) Therefore, the different strategies for monitoring of the phosphorylated proteins and/or phosphosites are essential tools for examining the human proteome.

2. Ways to identify phosphoprotein

In recent years, mass spectrometry (MS) was the best method to determine phosphorylated protein and its phosphosites. It was possible to do due to great improvement in mass spectrometry instrumentations and the development of new approaches for the enrichment of phosphopeptides through enzymatic digestion (Kosako and Nagano 2011). Techniques based on MS allow to quantify the general level of phosphorylation but also can indicate the individual phosphoresidues in digested peptides of protein (Fig. 1). Unfortunately, MS strategies do not permit to analyze intact protein, thus it is not perfect for the identification of phosphorylated isoforms of the same protein (Schmelzle and White 2006).

Other approaches to detect the phosphorylated protein include the radioisotope phosphate labeling with radioactive ATP, specific antibodies against phosphosite of protein, staining of phosphoprotein by Pro-Q Diamond dye or two-dimensional gel electrophoresis (2-DE). The radioisotope labeling method uses radiolabeled $[\gamma^{32}P]$ -ATP which is binding to the protein and then this protein is visualized on the phosphocellulose paper (Hastie et al. 2006). In the second method, the phosphospecific antibodies are commercially available and there are plenty of these antibodies. Nevertheless, the success of phosphoprotein recognition depends on antibody quality and specificity

(Horinouchi et al. 2015). The next method to detect the phosphoprotein is two-dimensional electrophoresis, which involving isoelectric focusing (IEF) and gel electrophoresis (SDS-PAGE). In the 2-DE technique, the protein is separated by its electrical charge (pI) and molecular mass (Fig.1) (Kosako and Nagano 2011). Here in contrary to MS technique, it is possible to examine intact protein with various post-translational modifications. The modified protein appears as spots along the horizontal or vertical axes on the 2-DE gel. This approach can be combined with Pro-Q Diamond staining in which the Pro-Q dye has a strong affinity to phosphoproteins. Therefore the protein spots have a different intensity as a result of the number of phosphorylated amino acids. Despite using the 2-DE technique with or without Pro-Q staining, it is very difficult to differentiate proteins with the same pI values, which have the same number of phosphate groups, but they have a different pattern of phosphorylation (Agrawal and Thelen 2006). Thus, current methods have limitations, so to overcome these disadvantages, the Phos-tag method has been employed (Fig.2) This review presents the Phos-tag technique, which is a new technology to visualize and differentiate non- and phosphorylated proteins.

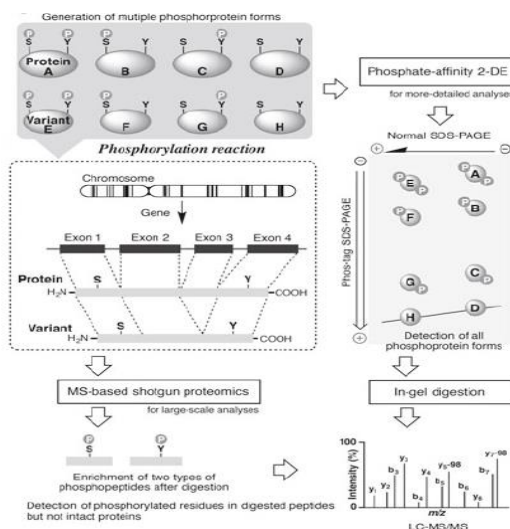


Fig. 1 Schematic representation of phosphorylated protein and peptide analysis by mass spectrometry (MS) technique and two-dimensional electrophoresis (2-DE) (Kinoshita-Kikuta et al. 2015).

3. Phos-tag technology

The Phos-tag is a dinuclear metal complex (1,3-bis[bis(pyridine-2-ylmethyl)amino]propan-2-olatodizinc(II)/manganese(II) complex) which was created by Wako Pure Chemical Industries, Ltd. in Osaka, Japan. This complex has a vacancy for two metal ions that is suitable for binding the phosphomonoester dianion ($R-OPO_3^{2-}$) as a bridging ligand (Kinoshita et al. 2006). Various metal ions i.e Mn^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Ni^{2+} and Fe^{2+} have been examined to receive a good result protein separation in the alkaline (Laemmli's procedure) and neutral conditions during SDS-PAGE electrophoresis (Kinoshita-Kikuta et al. 2015). It was found that in the neutral conditions (pH~7) of SDS-PAGE electrophoresis, a dinuclear zinc (II) complex (Zn^{2+} -Phos-tag) can catch phosphate monoester dianion. On the other hand, upon alkaline conditions (pH~9) of SDS-PAGE electrophoresis, a dinuclear manganese (II) complex (Mn^{2+} -Phos-tag) is able to bind the phosphomonoester dianion (Fig.2). Therefore, the Phos-tag method has made it possible to detect and visualize phosphomonoester dianions bound to threonine, tyrosine and serine (Kinoshita et al. 2009).

Phos-tag SDS-PAGE technique is an electrophoretic method which allows to separate nonphosphorylated and phosphorylated proteins. This method is based on the normal SDS-PAGE electrophoresis that is widely used for separation of proteins due to its molecular mass. While in conventional SDS-PAGE electrophoresis the mobility of phosphorylated and nonphosphorylated proteins is almost the same, during Phos-tag SDS-PAGE electrophoresis the phosphorylated proteins

migrate more slowly than nonphosphorylated counterparts (Kinoshita et al. 2015). Therefore, the phosphorylated proteins are visible as gel-shifted bands (Fig.3). Moreover, if a protein has many phosphorylation sites and if can exist in different phosphorylation states, these differences will be visible on the gel as a several bands that can be individually detected.

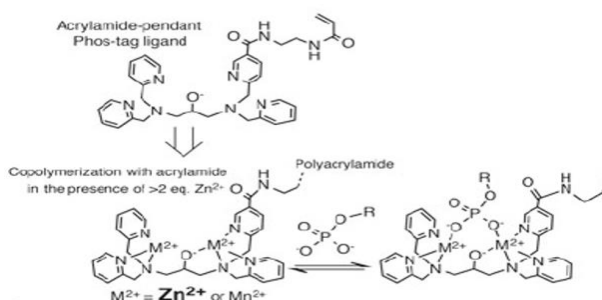


Fig. 2 Structure of the polyacrylamide-bound $\text{Zn}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ -Phos-tag and scheme of reversible binding of the phosphomonoester dianion (R-OPO_3^{2-}) (Kinoshita-Kikuta et al.2015).

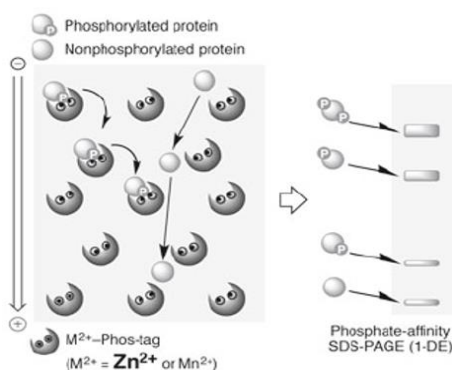


Fig. 3 Schematic representation of $\text{Zn}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ -Phos-tag SDS-PAGE method for detection of phosphorylated proteins (Kinoshita-Kikuta et al. 2015). After resolving the polyacrylamide gel the phosphoproteins are visible as the shifts as a result of their slower mobility unlike their non phosphorylated counterparts.

The Phos-tag SDS-PAGE technique has a lot of advantages, when it compares to methods described before. Using the Phos-tag protocol it is not needed to use radioactive labels, the ratio between phosphorylated and non-phosphorylated protein can be measured, it is possible to separate the phosphoprotein isoform with the same number of phosphate groups, the specificity of phosphate-binding is independent of the type of amino acid, a further method as Western Blotting or MS can be used (Horinouchi et al. 2015), the his- and asp-phosphorylated proteins found in two-component signaling pathway can be detected (Kinoshita-Kikuta et al. 2015), the whole electrophoresis procedure is almost the same as conventional one (Kinoshita et al. 2009).

Nowadays, two versions of Phos-tag (manganese and zinc) are available to use. There are a lot of examples that Phos-tag procedure has been widely used to determine phosphorylation status of proteins. However, there are differences between them and it is better to know. The Mn^{2+} -Phos-tag procedure uses the Laemmli's buffer (25mM Tris, 192 mM glycine and 0,1% SDS) in alkaline pH conditions. Unfortunately, it has been reported that some proteins like Tau or pepsin (standard phosphoprotein) did not show the shift of their phospho-version (Fig. 4) Moreover, the Mn^{2+} -Phos-tag SDS-PAGE gels show short-term stability for protein separation. It is suggested to prepare them just before use and sometimes might be cumbersome (Kinoshita and Kinoshita-Kikuta 2011). Therefore, to overmaster these limitations, the Zn^{2+} -Phos-tag version has been created. This approach

uses a neutral-pH gel conditions, which can be achieved by using Bis-Tris-HCl buffer or Tris-AcOH buffer. The advantages of zinc version have been shown by obtaining the shifted bands of certain phosphoproteins that could not be visualized by manganese version (Fig. 4). Additionally, Zn^{2+} -Phos-tag SDS-PAGE gel in neutral conditions can be stored for long time (up to 6 months) and their storage does not require any special equipment (Kinoshita-Kikuta et al. 2012).

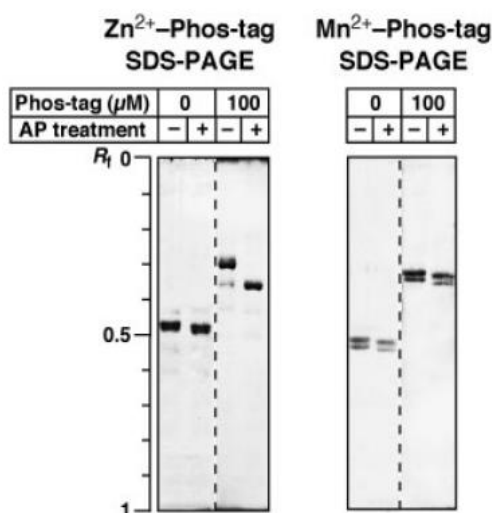


Fig. 4 Comparison of pepsin mobility in two different Phos-tag SDS-PAGE system (Kinoshita and Kinoshita-Kikuta 2011). 1 μg non-treated pepsin (left lane: -) and alkaline phosphatase treated 1 μg pepsin for 12h (right lane: +) were examined on 10% polyacrylamide gel containing 0 or 100 μM Phos-tag. The R_f (retardation factor) value of 1.0 is defined as a position of the bromophenol blue (BPB) dye. Gels were stained by Coomassie Brilliant Blue.

4. Phos-tag SDS-PAGE and WB

The prepared polyacrylamide gel with Phos-tag should contain between 20 and 100 μM of Phos-tag. Moreover, the ammonium persulfate (AMPS) should be added at last and just before adding it, the gel must be degassed to avoid air bubbles. The Phos-tag gel polymerizes up to 1h because of Phos-tag content. Then the electrophoresis must be carried out at constant current of 15-35 mA. The current should not exceed 35mA due to overheating the gel, thus the electrophoresis should be performed in 4°C. Additionally, to improve the separation of a large mass phosphoprotein (more than 150kDa), it should be used a lower concentration (5 μM) of Phos-tag, lower current (5mA) and the resolving gel has only 5% of polyacrylamide (Kinoshita et al. 2009). Although, this procedure does not allow to separate phosphoproteins with mass above 200kDa. In this case, 3% SDS-PAGE gel is needed with addition of 0.5% agarose to tender it and 20 μM Phos-tag (Kinoshita et al. 2009). However, when Zn^{2+} -Phos-tag SDS-PAGE protocol is used with Bis-Tris-HCl buffer to separate protein with mass over 200kDa, it was described that protein bands appeared as a smeared band. That problem was connected to Bis-Tris weakly basic amine properties, which caused a formation of free radicals in the presence of ammonium persulfate. To solve this inconvenience, the Tris-Acetic Acid (Tris-AcOH) buffer should be used because it is almost protonated at neutral pH values (Kinoshita et al. 2012). Owing to two different buffer systems Bis-Tris and Tris-AcOH with Zn^{2+} -Phos-tag SDS-PAGE protocol, is very important to choose appropriate one buffer, what depends on the examined protein. These two diverse buffers can provide a wide coverage and can show more detailed information of numerous phosphoproteins with broad range of molecular mass (Kinoshita-Kikuta et al. 2015).

After $\text{Zn}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ -Phos-tag SDS-PAGE electrophoresis the gel can be stained by Coomassie Brilliant Blue (CBB) or SYPRO Ruby to visualize the separated protein bands. This approach is possible to perform, when only one protein is examined. In the case of examining proteins for cell or

tissue lysates, the Western Blotting method must be provided. However, combination of Phos-tag SDS-PAGE with Western Blotting can provide a powerful tool to examine broad spectrum of protein, the low detection of the separated proteins may appear. The cause of the detection low intensity is that in Phos-tag SDS-PAGE the protein appears as multiple bands due to its phosphorylation level. Moreover, another problem with detection is a weak electrotransfer, because the phosphorylated proteins are strongly bound to Zn^{2+}/Mn^{2+} -Phos-tag on the gel and they can not move to blotting membrane (Fig. 5) (Kinoshita-Kikuta et al. 2014). Therefore, to overcome this problem, the Zn^{2+}/Mn^{2+} -Phos-tag gel after electrophoresis should be immersed three times for 10 min in the transfer buffer with 1 mM EDTA to remove (chelate) the metal ions coordinated to Phos-tag. The studies conducted by Eiji Kinoshita's lab showed that without EDTA treatment the electrotransfer efficiency of dephosphorylated proteins was 100%, while for phosphorylated forms was 5-40%. Nonetheless, EDTA treatment of Phos-tag gel improved the electrotransfer efficiency of phosphorylated proteins and it reached almost 100%, but also decreased the band numbers that remained in the Phos-tag gel (Fig.5) (Kinoshita-Kikuta et al. 2014).

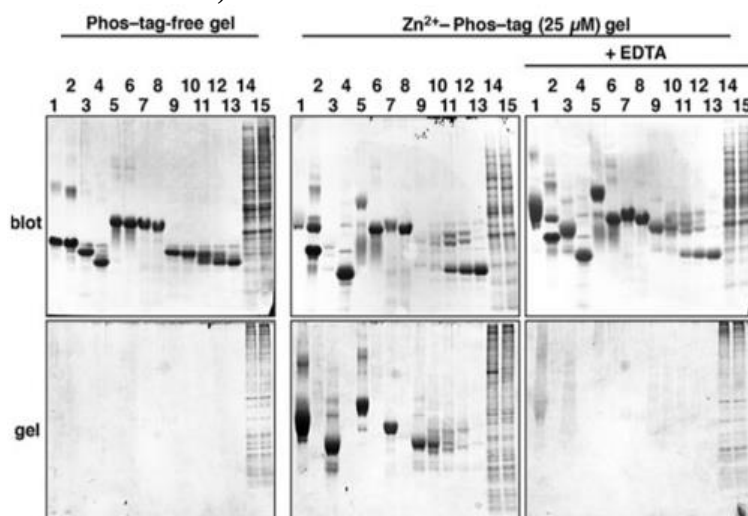


Fig. 5 The protein electrotransfer efficiency with and without EDTA treatment in semidry blotting from Phos-tag gels. Phosphorylated and dephosphorylated proteins were separated by neutral SDS-PAGE buffered with Bis-Tris and containing 0 and 25 μ M Zn^{2+} -Phos-tag (Kinoshita-Kikuta et al. 2014). Lanes 1-15 correspond to 1- phospho- α -casein ; 2- dephospho- α -casein ; 3- phospho- β -casein ; 4- dephospho- β -casein ; 5- phospho-ovalbumin ; 6- dephospho-ovalbumin ; 7- phospho-pepsin ; 8- dephospho-pepsin ; 9-13 – dephospho- β -casein (treated by AP for 0, 5, 10, 30, 60 min) ; 14- protein extract from HeLa cells ; 15- dephosphorylated protein extract from HeLa cells

5. Discussion

The protein phosphorylation it is one of the important post-translational modification. This process is an answer for numerous stimuli and is involved in many biological pathways. It has been found in human that about 13 000 phosphorylated proteins have about 230 000 phosphosites. It has been so difficult to identify the role of variety phosphorylated proteins because of expensive and/or dangerous techniques such as mass spectrometry or radioactive labeling. To overcome these problems, in 2006 the Phos-tag approach was employed. This new tool for visualizing the phosphorylated proteins bases on conventional SDS-PAGE electrophoresis and offers two diverse system. The Phos-tag method allows to examine various proteins of low and high molecular mass and also to examine the diverse phosphoforms of the same protein. Furthermore, the downstream procedures such as Western Blotting or mass spectrometry can be used. Studying the phosphorylated protein is worthy to take it into consideration, because is laborsaving, timesaving and moneysaving.

6. References

- Agrawal GK, Thelen JJ (2006) Large scale identification and quantitative profiling of phosphoproteins expressed during seed filling in oilseed rape. *Molecular Cell Proteomics* 5: 2044-2059
- Hastie CJ, McLauchlan JH, Cohen P (2006) Assay of protein kinases using radiolabeled ATP: a protocol. *Nature Protocols* 1(2): 968-971
- Horinouchi T, Terada K, Higashi T et al. (2015) Using Phos-Tag in western blotting analysis to evaluate protein phosphorylation. *Kidney Research: Experimental Protocols, Methods in Molecular Biology* vol. 1397: 267-278
- Kerk D, Templeton G, Moorhead GB (2008) Evolutionary radiation pattern of novel protein phosphatases revealed by analysis of protein data from the completely sequenced genomes of human, green algae, and higher plants. *Plant Physiology* 146: 351-367
- Kinoshita E, Kinoshita-Kikuta E (2011) Improved phos-tag SDS-PAGE under neutral pH conditions for advanced protein phosphorylation profiling. *Proteomics* 11: 319-323
- Kinoshita E, Kinoshita-Kikuta E, Koike T (2009) Separation and detection of large phosphoproteins using Phos-tag SDS-PAGE. *Nature Protocols* 4(10): 1513-1522
- Kinoshita E, Kinoshita-Kikuta E, Koike T (2012) A laborsaving, timesaving, and more reliable strategy for separation of low-molecular-mass phosphoproteins in phos-tag affinity electrophoresis. *International Journal of Chemistry* 4(5): 1-8
- Kinoshita E, Kinoshita-Kikuta E, Koike T (2012) Phos-tag SDS-PAGE systems for phosphorylation profiling of proteins with a wide range of molecular mass under neutral pH conditions. *Proteomics* 12:192-2020
- Kinoshita E, Kinoshita-Kikuta E, Koike T (2015) Advances in Phos-tag-based methodologies for separation and detection of the phosphoproteome. *Biochimica et Biophysica Acta* 1854: 601-608
- Kinoshita E, Kinoshita-Kikuta E, Ujihara H et al. (2009) Mobility shift detection of phosphorylation on large proteins using a Phos-tag SDS-PAGE gel strengthened with agarose. *Proteomics* 9(16): 4098-4101
- Kinoshita E, Kinoshita-Kikuta E, Takiyama K et al. (2006) Phosphate-binding tag, a new tool to visualize phosphorylated proteins. *Molecular & Cell Proteomics* 5.4: 749-758
- Kinoshita-Kikuta E, Kinoshita E, Koike T (2015) Neutral phosphate-affinity SDS-PAGE system for profiling of protein phosphorylation. *Proteomic Profiling: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, vol. 1295: 323-354
- Kinoshita-Kikuta E, Kinoshita E, Matsuda A et al. (2014) Tips on improving the efficiency of electrotransfer of target proteins from Phos-tag SDS-PAGE gel. *Proteomics* 14: 2437-2442
- Kosako H, Nagano K (2011) Quantitative phosphoproteomics strategies for understanding protein kinase-mediated signal transduction pathways. *Expert Review of Proteomics* 8: 81-94
- Manning G, Whyte DB, Martinez R et al. (2002) The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298: 1912-1934
- Newman RH, Zhang J, Zhu H (2014) Toward a systems-level view of dynamic phosphorylation networks. *Frontiers in Genetic* 5: 263
- Olsen JV, Blagoev B, Gnäd F et al. (2006) Global in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell* 127: 635-648
- Schmelzle K, White FM (2006) Phosphoproteomic approaches to elucidate cellular signaling networks. *Current Opinion in Biotechnology* 17: 406-414
- Vlastaridis P, Kyriakidou P, Chaliotis A et al. (2017) Estimating the total number of phosphoproteins and phosphorylation sites in eukaryotic proteome. *GigaScience* 6: 1-11

3. Bacterial replication and transcription as a target for antibiotics

Filipek Kamil

Molecular Biology Department, Faculty of Biology and Biotechnology, Maria Curie-Skłodowska University, Lublin

Scientific supervisor: dr Barbara Michalec-Wawiórka

Filipek Kamil: kamilfilipek@wp.pl

Keywords: deoxyribonucleic acid, ribonucleic acid, quinolone, rifampicin, expression

Abstract

The antibiotics called also antimicrobial substances have been known since ancient times. In their 'golden era,' they were effective against the broad-spectrum of bacteria. Nowadays, an increase in antibiotic resistance has been observed. But still, there are different essential cellular processes that can be as targets for novel antibiotics. These processes are DNA replication and transcription which are very important for cell viability and their inhibition leads to cell death. This is achieved by using quinolones and rifamycin, respectively. The same potential for transcription inhibition has myxopyronin but it has a new target. The crystal studies showed that myxopyronin blocks DNA binding to RNA polymerase. In this review, it has been described as the mechanism of DNA replication and transcription.

1. Introduction

Antibiotics are the antimicrobial substances that their effect is focused on either kill or inhibit the bacterial growth. These agents are the most widely and also often injudiciously used therapeutic drugs worldwide (Leekha et al. 2011). Antimicrobial substances have been used since ancient times. That time the civilizations have been used different types of herbs or honey to fight with infections. Moreover, the tetracyclines have been found in human skeletons in Nubia, but their origin still remains unknown (Basset et al. 1980). Nonetheless, the big step in treating people was the discovery of salvarsan, the arsenic-based chemical against syphilis, conducted by Ehrlich and his team in 1909 (Schwartz 2004). Despite this, the golden era of antibiotics has begun at the beginning of the 1930s and lasted until the 1960s (Nathan and Cars 2014). During that time many antibiotics like penicillin in 1928, streptomycin in 1944 as well as vancomycin in 1958 have arisen (Aminov 2010; Gould 2016). These antibiotics had saved many lives, but unfortunately, researches noticed the bacterial resistance was developing. It was a serious global threat to human health (Nathan and Cars 2014). The known antibiotics were mainly focused on inhibiting cell wall synthesis. So, to overcome this problem, the antibiotics that inhibit DNA and mRNA were applied.

2. DNA and mRNA synthesis

The central dogma of molecular biology states that deoxyribonucleic acid (DNA) is a store of biological information. It is composed of two coil chains that form a double helix, which contains nucleotides. They are composed of nucleobases (adenine, thymine, cytosine, and guanine), deoxyribose sugar, and a phosphate group. In DNA the nucleotides are connected to sugar by 5'-3'-phosphodiester bond, but nucleobases are connected to each other by a hydrogen bond (Stryer et al. 2011). DNA is localized in the nucleus within eukaryotic cells, while in prokaryotic cells is found in the cytoplasm. Normally, DNA is organized into chromosomes, but before cell division, it must be unwound, because undergoes multiplication (replication) (Alberts et al. 2014). DNA replication is an essential process for cell viability, and it is conducted by replisome. The replisome complex consists of helicase, primase, DNA polymerase, single-stranded DNA-binding proteins (SSB) and other helping proteins are topoisomerase II and DNA ligase (Fig. 1) (Sanyal and Doig 2012). After recognition of replication place, gyrase cuts both DNA strands and the supercoils are removed. After that, helicase cuts the hydrogen bonds between the nucleobases and then DNA opens up, the Y-shaped replication forks are created. The small proteins (SSB) stabilize the leading and lagging strands of

DNA. Whereas polymerase III synthesizes the leading strand continuously, the lagging strand is synthesized discontinuously by using the Okazaki fragments which are created by primase. Then the primers are removed and the gaps are filled by DNA polymerase I, but DNA ligase attaches the Okazaki fragments to each other (Fig. 1) (Brown 2007).

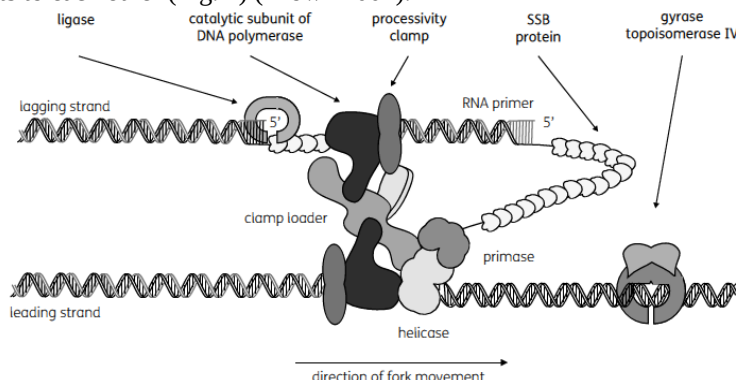


Fig. 1. Schematic representation of DNA replication with the indication of the enzymes involved in (van Eijk et al. 2017).

Messenger RNA (mRNA) is a single strand that carries genetic information from DNA to the translational machinery- ribosome. The genetic information in mRNA is encoded in the sequence of nucleotides that are arranged into codons (triple base pairs). Each codon encodes specific amino acid residue. The process of mRNA synthesis is called transcription which is the first step of gene expression. The mRNA synthesis is conducted by a five subunit RNA polymerase that recognizes the promoter sequence TATAAT in DNA placed in the position -10 and -35. Therefore, RNA polymerase (RNAP) releases the sigma factor, unwinds DNA what allows it to runs the transcription process. The transcription termination ends after finding a noncoding sequence. The inverted repeat sequences are transcribed and they form hairpin loops and this stopping RNA polymerase (Fig. 2) (Clancy 2008; Mosaei and Harbottle 2019).

3. DNA synthesis inhibition

Quinolones were identified as a potent inhibitor against bacterial gyrase and topoisomerase IV. In the 1960s, nalidixic acid (Fig. 3) the first quinolone was introduced into the clinic to treat the urinary tract infections caused by enteric bacteria. In the next years, the second generation of quinolones like ciprofloxacin, ofloxacin, norfloxacin was introduced. These new drugs displayed greater penetration into Gram-positive bacteria as well as enhanced pharmacokinetics and pharmacodynamics. These new features were obtained by the introduction of fluorine at the C6 position and piperazine at the C7 position (Fig. 3) (Aldred et al. 2014).

The interaction between quinolones and gyrase/topoisomerase IV is a complex formation that contains damaged DNA. As mentioned before, gyrase generates some breaks in the region of DNA close to the enzyme. Nevertheless, gyrase is able to bind ATP and causes strand passage via conformational changes. Then gyrase gate closes and ATP hydrolysis occurs and resets gyrase to the next round. The quinolone-gyrase DNA trap appears both after DNA cleavage and in the absence of DNA cleavage (Aldred et al. 2014). It has been proposed that quinolones bind in a noncovalent manner in the cleavage-ligation active site. Probably it occurs by π - π interactions which are strengthened by hydrophobic tail-to-tail interaction between N-1 substituents of quinolones with gyrase (Drlica and Zhao 1997). For these interactions, two molecules of quinolones are required to increase the double-stranded DNA damages (Fig. 4). As a consequence of their binding, the DNA ligation is inhibited so the cleaved complexes have been detected. These cleaved DNA complexes trigger the SOS response and other pathways to repair DNA. If these damages overwhelm repair processes, they may lead to cell death (Aldred et al. 2014).

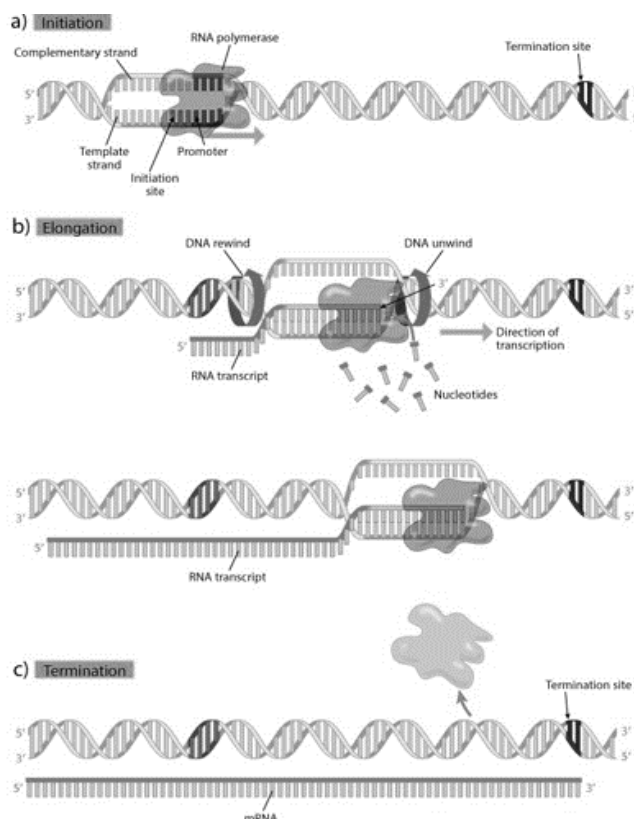


Fig. 2. Three steps of DNA transcription. In the initiation step, RNA polymerase binds to DNA in the promoter sequence. During the elongation step, the RNA transcript is created. In the termination step, RNA polymerase is released from DNA after reaching the termination site (Clancy 2008).

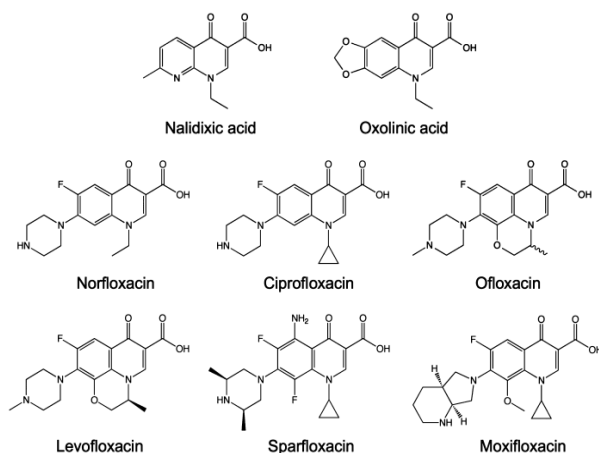


Fig. 3. The quinolone antibiotics. Nalidixic acid and oxolinic acid were first used quinolones to fight against bacterial infection. Norfloxacin, ciprofloxacin, ofloxacin are second-generation of quinolones. Levofloxacin, sparfloxacin, and moxifloxacin are the quinolones newest-generation (Aldred et al. 2014).

4. mRNA synthesis inhibition

The first antibiotic identified as an inhibitor of mRNA synthesis was rifampicin (Fig. 5). This drug belongs to the group of rifamycins (ansamycin class), which were discovered from metabolites

of *Amycolatopsis mediterranei*. Rifampicin is an orally effective antibiotic against Gram-positive, Gram-negative bacteria as well as mycobacterial infection including tuberculosis (TB). Currently, medicine uses three more rifamycins like rifabutin, rifaximin, rifapentine (Ma et al. 2016).

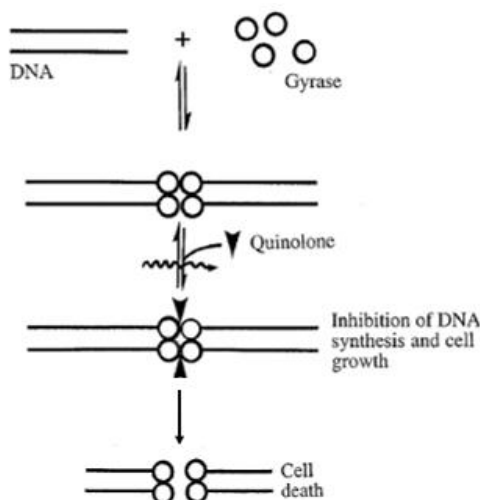


Fig. 4. Mechanism of action quinolones. DNA gyrase interacts with double-stranded DNA and forms a cleaved complex. The quinolone-gyrase trap is prepared and inhibits DNA ligation by gyrase. The DNA breaks are present (Drlica and Zhao 1997).

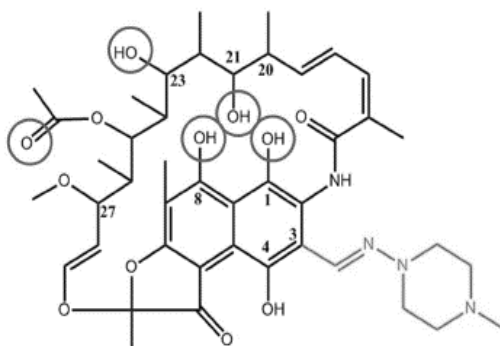


Fig. 5. Schematic representation of rifampicin. The oxygen atoms creating the bonds with RNA polymerase are marker by circles (Mosaei and Harbottle 2019).

Rifampicin mechanism of action is due to inhibition of mRNA synthesis as a consequence of strong binding to RNA polymerase. This drug binds to the pocket of the β subunit of RNA polymerase in the neighborhood of the DNA/RNA channel (Ma et al. 2016). Binding of rifampicin in that place does not block the synthesis of the first phosphodiester bond and it is stabilized by van der Waals bonds between the alkyl chain Q390 of polymerase and the antibiotic C28, C29 carbon atoms. The hydrogen bonds between the polymerase amino acids and rifampicin oxygen atoms R409: O1, Q393/S411: O2 and D396/H406: O10 lead to conformational changes in the catalytic center of RNA polymerase (Fig 6). Moreover, the hydrophobic amino acid residues (L391, L413, G414, I452) from the D loop of polymerase create van der Waals bond with the naphtol ring and with the methyl group of C7 carbon atom from rifampicin.

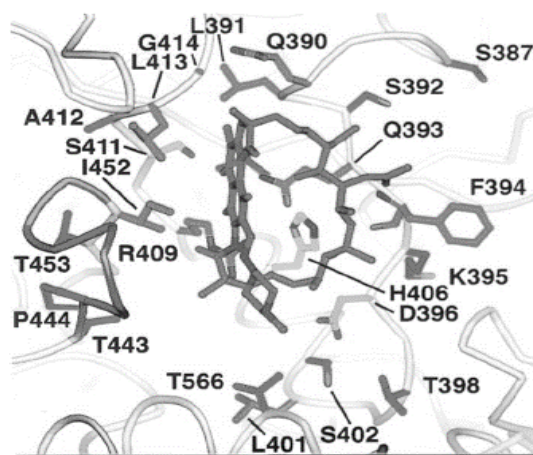


Fig. 6. Rifampicin binding in the RNAP β subunit pocket. Each amino acid residues that contact with rifampicin is showed (Campbell et al. 2001).

These amino acids create the D loop which is a very important part of the RNA catalytic subunit because of form new bonds during transcription. Rifampicin binding in this place and its interactions block the catalytic center of RNA polymerase β subunit (Campbell et al. 2001). As a result, RNA polymerase catalyzes only the formation of two or three phosphodiester bonds and then the short RNAs are released (Ma et al. 2016).

The RNA polymerase (RNAP) crab claw during transcription undergoes a series of conformational changes that allow dsDNA to enter to catalytic center. For this DNA entering is responsible the β' subunit also called the clamp region, which shows the most structural flexibility (Fig. 7). The clamp region goes back to close the active channel owing to keep DNA in the transcription bubble during mRNA synthesis. This clamp movement is regulated by the switch region, located at the base of the clamp domain. The switch region is built by five segments that undergo conformational changes. Switch 1 and 2 have the biggest conformational changes among all switches. The residues of switch 1,2 and 3 contact with loaded, unwound DNA inside the catalytic center of RNA polymerase in order to raise the possibility that these contacts might coordinate and couple the DNA loading, unwinding and clamp closure. The residues from switches 2 and 3 are responsible for both making up one wall of exit tunnel in RNA polymerase and making contacts with the growing RNA transcript. The antibiotics that bind to the switch region of the polymerase block its conformational changes, thus inhibit the transcription process (Srivastava et al. 2011).

The first described antibiotic that inhibits conformational changes of RNAP is myxopyronin (Fig. 8). This drug belongs to an α -pyrone group and it is produced by *Myxococcus fulvus* Mf50. Myxopyronin is an effective antibiotic against Gram-positive and Gram-negative bacteria, but human RNAP is insensitive (Ma et al. 2016). The studies have shown that myxopyronin binds to the switch region created by switch 1 and switch 2 in a partially closed conformation. This binding of myxopyronin makes it impossible to open the RNAP clamp and binding DNA template during the transition from closed to open state (Mosaei and Harbottle 2019).

The binding site of myxopyronin has been detected and visualized as a hydrophobic pocket formed by switch 1, switch 2 and some segments of β and β' subunits (Ma et al. 2016). This important pocket is located close to the dienone sidechain of myxopyronin which makes a contact with amino acid residue in position 1326 of β subunit and with amino acid residues in positions 334-338, 1323-1328, 1352 of β' subunit. The myxopyronin α -pyrone ring contacts with amino acid residues in position 1322 of β subunit and in position 343-345, 1352 of β' subunit. The enecarbamate sidechain of myxopyronin makes direct or water-mediated bonds with β residues 1271-1279, 1291 and with β' residues 343-344, 801-805, 1348-1351 (Fig 9).

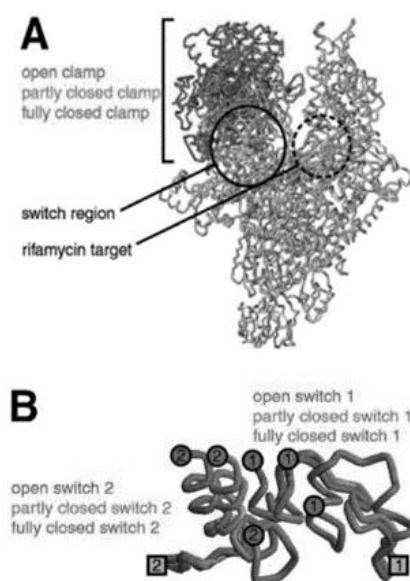


Fig. 7. Structure of RNA polymerase clamps and switch region. A. RNAP clamp can exist in three conformational states: open, partially closed and closed. The circle shows the switch region in the clamp, while dashed circle the binding site for rifamycins. B. The switch region of RNAP exists in three conformational states: open, partially closed and closed (Srivastava et al. 2011).

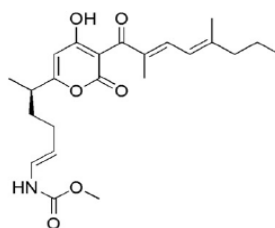


Fig. 8. Chemical structure of myxopyronin (Ma et al. 2016).

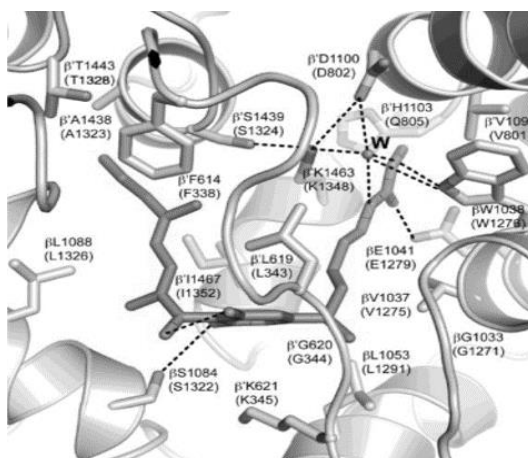


Fig. 9. Interaction between myxopyronin and RNA polymerase (Srivastava et al. 2011)

All these contacts between myxopyronin and β subunit alter the nine-residue segments conformational changes of switch 2. It has been previously shown that the switch 2 contacts with DNA template during transcription elongation. According to this interaction, two models of myxopyronin has been proposed. The first model says that myxopyronin alters the conformational changes needed to open the RNAP clamp to bind DNA into the catalytic center. The second model indicates that myxopyronin disturbs the switch region to unwind the DNA template at the beginning of transcription (Srivastava et al. 2011).

5. Discussion

The substances which were effective against bacteria have been known since ancient times. It was believed that antibiotics can last forever. Unfortunately, bacterial resistance has arisen. The need for new antibiotics and/or new targets must be identified, validated and developed to combat organisms that are resistant for currently drugs. Therefore, quinolones and rifamycins are successfully used in medicine to combat bacteria. These antibiotics inhibit DNA replication and transcription, respectively. Both processes are essential for cell viability and their inhibition can lead to cell death. The same ability has α -pyrone antibiotics such as myxopyronin. However, myxopyronin shows a new way to inhibit mRNA transcription. This drug blocks the clamp region of RNAP and does not allow it to bind DNA. The crystal studies showed that myxopyronin is an excellent inhibitor, especially against tuberculosis. Unfortunately, myxopyronin is still in pre-clinical development and has not yet started in clinical trials. Nevertheless, the new antibiotics must be searched to overcome the growing resistance problem.

6. References

- Alberts B, Johnson A, Lewis J et al. (2014) *Molecular Biology of the Cell* (6th ed.) Garland.
Chapter 4: DNA, Chromosomes, and Genomes.
- Aldred KJ, Kerns RJ, Osheroff N (2014) Mechanism of quinolone action and resistance.
Biochemistry 53: 1565-1574
- Aminov RI (2010) A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future.
Frontiers in Microbiology 1: 134-145
- Basset EJ, Keith MS, Armelagos GJ et al. (1980) Tetracycline-labeled human bone from ancient Sudanese Nubia (AD350). *Science* 209: 1532-1534
- Brown AT (2007) *Genomes 3*. Garland Science Publishing 2: 334-336
- Campbell EA, Korzheva N, Mustaev A et al. (2001) Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial RNA polymerase. *Cell* 104(6): 901-912
- Clancy S (2008) DNA transcription. *Nature Education* 1(1): 41
- Drlica K, Zhao X (1997) DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 61(3): 377-392
- Gould K (2016) Antibiotics: from prehistory to the present day. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 71: 572-575
- Leekha S, Christine L, Edson SR (2011) General principles of antimicrobial therapy. *Mayo Clinic Proceeding* 86(2): 156-167
- Ma C, Yang X, Lewis PJ (2016) Bacterial transcription as a target for antibacterial drug development. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 80(1): 139-160
- Mosaei H, Harbottle J (2019) Mechanisms of antibiotics inhibiting bacterial RNA polymerase. *Biochemical Society Transactions* 47(1):339-350
- Nathan C, Cars O (2014) Antibiotic resistance-problems, progress, and prospects. *New England Journal of Medicine* 371(19): 1761-1763
- Sanyal G, Doig P (2012) Bacterial DNA replication enzymes as targets for antibacterial drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery* 7: 327-339
- Schwartz RS (2004) Paul Ehrlich's magic bullets. *The New England Journal of Medicine* 350: 1079-1080

- Srivastava A, Talaue M, Liu S et al. (2011) New target for inhibition of bacterial RNA polymerase: "Switch Region". *Current Opinion in Microbiology* 14(5): 532-543
- Stryer L, Berg JM, Tymoczko JL (2011) *Biochemistry*. PWN Warsaw
- van Eijk E, Wittekoek B, Kuijper JE et al. (2017) Replication proteins as potential targets for antimicrobials in drug-resistant bacterial pathogens. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 72:1275-1284

4. Naczynioaktywny polipeptyd jelitowy (VIP) we włóknach nerwowych zlokalizowanych w warstwie mięśniowej ściany tchawicy świni domowej

Vasoactive intestinal polipeptide (VIP) in nerve fibers localized in the muscular layer of trachea in the domestic pig

Gonkowski Ignacy

Katedra Fizjologii i Patofizjologii Collegium Medicum, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Opiekun naukowy: dr hab. Joanna Wojtkiewicz, prof. UWM

Gonkowski Ignacy: gonign@wp.pl

Słowa kluczowe: immunofluorescencja, układ oddechowy, neuroprzełącznik

Streszczenie

Naczynioaktywny polipeptyd jelitowy (VIP) – polipeptyd złożony z 38 aminokwasów i wyizolowany po raz pierwszy z przewodu pokarmowego świni domowej jest substancją szeroko rozpowszechnioną w organizmie. Do tej pory obecność VIP stwierdzono przede wszystkim w różnych częściach centralnego i obwodowego układu nerwowego, gdzie pełni funkcje neuromodulatora i/lub neuroprzełącznika. Wiadomo, że VIP uczestniczy w regulacji licznych procesów, takich jak między innymi wydzielanie hormonów i enzymów, reakcje immunologiczne czy aktywność mięśni. Pełni również istotne funkcje w procesach protekcyjnych i adaptacyjnych. Jest ważnym czynnikiem przeciwzapalnym. Niniejsze badania przeprowadzono przy użyciu metody immunofluorescencji pojedynczej w celu określenia gęstości włókien immunoreaktywnych wobec VIP w warstwie mięśniowej tchawicy świni domowej. Uzyskane wyniki wykazały obecność włókien zawierających VIP w badanym obszarze. Włókna takie były grube, dobrze widoczne, ale stosunkowo krótkie. Układały się one wzdłuż włókien mięśniowych. Przy pomocy arbitralnej skali półilościowej oceniono gęstość takich włókien na „++”, czyli VIP-pozytywne włókna tworzyły w rzadką sieć w warstwie mięśniowej tchawicy. Uzyskane wyniki wyraźnie wskazują na udział struktur nerwowych immunoreaktywnych wobec VIP w unerwieniu tchawicy świni domowej. Najprawdopodobniej struktury te regulują aktywność mięśni wchodzących w skład ściany tchawicy. Biorąc po uwagę wcześniejsze badania dotyczące funkcji VIP w organizmie żywym należy przypuszczać, iż peptyd ten działa na mięśnie tchawicy hamująco i rozkurczająco.

1. Wstęp

Naczynioaktywny polipeptyd jelitowy (ang. vasoactive intestinal polipeptide – VIP) został po raz pierwszy wyizolowany z przewodu pokarmowego świni domowej w 1970 roku jako substancja silnie rozkurczająca naczynia i hamująca perystaltykę jelit (Makowska 2018, Iwasaki i in. 2019). VIP jest polipeptydem zbudowanym z 38 reszt aminokwasowych należącym do rodziny peptydów sekretyny i glukagonu (Couvineau i Laburthe 2012). Oprócz VIP do tej rodziny należą między innymi peptyd aktywujący cyklazę adenylogową przysadki, histydyna, helodermina, glukagon i hamujący peptyd żołądkowy (Couvineau i Laburthe 2012). Od 1970 roku substancja ta została opisana w różnych częściach zarówno centralnego, jak i obwodowego układu nerwowego (Cunha-Reis i in. 2017; Lepiarczyk i in. 2017; Tilley i in. 2017; Bourlev i in. 2018; Makowska 2018; Iwasaki i in. 2019). Największe poziomy VIP obserwowane są w jelitowym układzie nerwowym (Wu i in. 2015; Makowska 2018; Wasowicz i in. 2018; Iwasaki i in. 2019), ale obecność tego polipeptydu stwierdzono również między innymi w zwojach współczulnych i przywspółczulnych, neuronach czuciowych zlokalizowanych w zwojach rdzeniowych ang. dorsal root ganglia – DRG) i centralnym układzie nerwowym (Tilley i in. 2017; Grässel i Muschter 2017; Iwasaki i in. 2019; Turi i in. 2019). Obecność VIP wykazano również we włóknach nerwowych zaopatrujących wiele narządów wewnętrznych, takich jak (między innymi) wątroba, macica, jajniki, pęcherz moczowy, serce czy płuca (Couvineau i Laburthe 2012; Erin i in. 2016; Lepiarczyk i in. 2017; Iwasaki i in. 2019). Oprócz

układu nerwowego stwierdzono, że VIP może być obecny w komórkach układu immunologicznego (Couvineau i Laburthe 2012; Wasowicz i in. 2018; Villanueva-Romero i in. 2019).

VIP oddziałuje na dwa typy specyficznych receptorów błonowych sprzężonych z białkami G (Couvineau i Laburthe 2012). Receptory te, zwane VPAC1 i VPAC2 regulują czynności komórek poprzez dwa główne szlaki sygnałowe: szlak cyklicznego monofosforanu adenozy (cAMP) oraz szlak sygnałowy fosfatydyloinozytolu (Couvineau i Laburthe 2012). Wiadomo jednakże, że receptory VPAC1 i VPAC2 mogą również aktywować inne szlaki sygnałowe, w których uczestniczy również tlenek azotu, fosfolipaza C czy kinazy MAP (Couvineau i Laburthe 2012).

Obecność opisywanych receptorów stwierdzono w wielu układach i narządach wewnętrznych (Couvineau i Laburthe 2012; Iwasaki i in. 2019). Z kolei tak duża liczba i zróżnicowanie szlaków sygnałowych pobudzanych przez receptory VPAC1 i VPAC2 powodują, że VIP w organizmie żywym ma działanie wielokierunkowe. Dotychczasowe badania wykazały, iż VIP jest zaangażowany w regulowanie wielu procesów, których charakter niejednokrotnie zależy od lokalizacji tego polipeptydu. Wiadomo, iż VIP wpływa hamująco na aktywność mięśni gładkich, reguluje napięcie ścian naczyń krwionośnych oraz jest zaangażowany w regulację wydzielania neuromodulatorów, neuroprzekaźników, hormonów i enzymów (Couvineau i Laburthe 2012; Makowska 2018; Iwasaki i in. 2019). Ważną funkcją VIP jest uczestnictwo w procesach odpornościowych, protekcyjnych, adaptacyjnych (Wasowicz i in. 2018), a także w reakcjach związanych ze stanami zapalnymi (Makowska 2018). VIP uważany jest za jeden z ważniejszych czynników neuroprotekcyjnych na terenie centralnego i obwodowego układu nerwowego, który chroni komórki nerwowe przed uszkodzeniem i zwiększa ich przeżywalność w niesprzyjających warunkach (Couvineau i Laburthe 2012; Iwasaki i in. 2019).

Wykazano, iż VIP nie tylko uczestniczy w regulacji funkcji narządów w warunkach fizjologicznych, ale także bierze udział w odpowiedzi na bodźce fizjologiczne i patologiczne oddziałujące na organizm żywy. Do czynników fizjologicznych wpływających na ekspresję VIP-u można zaliczyć wzrost i dojrzewanie oraz rozwój organów wewnętrznych (Couvineau i Laburthe 2012; Iwasaki i in. 2019). Natomiast bodźce patologiczne, w odpowiedzi na które VIP może uczestniczyć zaliczamy przede wszystkim stany zapalne (Makowska 2018). Ponadto takim czynnikiem może być działanie niektórych substancji toksycznych, zmiany degeneracyjne układu nerwowego, uszkodzenie mechaniczne włókien nerwowych oraz zmiany nowotworowe (Couvineau i Laburthe 2012; Erin i in. 2016; Bourlev i in. 2018; Makowska 2018; Iwasaki i in. 2019). Neuroprotekcyjne i przeciwzapalne właściwości VIP spowodowały, iż substancja ta jest uważana za potencjalny lek, który w niedalekiej przyszłości będzie można stosować podczas procesów zapalnych i chorób neurodegeneracyjnych (Couvineau i Laburthe 2012).

Celem niniejszego opracowania jest określenie gęstości włókien nerwowych immunoreaktywnych wobec VIP zlokalizowanych w ścianie tchawicy świni domowej. Należy podkreślić, iż wiedza dotycząca dystrybucji VIP w ścianie dróg oddechowych jest stosunkowo niewielka. Szczególnie dotyczy to świni domowej, która ze względu na neurochemiczną organizację układu nerwowego do organizacji układu nerwowego człowieka jest coraz częściej wykorzystywana jako zwierzę laboratoryjne (Makowska 2018). Należy podkreślić, iż świnia domowa jest jednym z lepszych modeli zwierzęcych do badań nad reakcjami mogącymi zachodzić w układzie nerwowym człowieka (Makowska 2018).

2. Materiały i metody

Niniejszym doświadczeniem objęto pięć niedojrzałych płciowo loszek rasy Wielka Biała polska (w wieku ośmiu tygodni i masie ciała około 18-20 kg.), wykorzystywanych również jako grupa kontrolna w innym eksperymencie. Na wszystkie czynności wykonywane w przebiegu niniejszych badań uzyskano zgodę Lokalnej Komisji Etycznej do spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Olsztynie (zgoda nr 28/2013 z dnia 22 maja 2013 roku).

Zwierzęta po transporcie podlegały odpoczynkowi i pięciodniowemu okresowi adaptacyjnemu. Następnie były przetrzymywane przez trzy tygodnie (czas związany ze wspomnianym powyżej eksperymencie, w którym zwierzęta stanowiły grupę kontrolną i nie były poddawane żadnym zabiegom). W tym czasie przebywały w typowych warunkach laboratoryjnych,

w kojcach odpowiednich dla wieku i gatunku zwierząt. Karmione były dwa razy dziennie komercyjną mieszką paszową odpowiednią dla wieku i gatunku oraz miały zapewniony nieograniczony dostęp do wody pitnej. Po upływie trzech tygodni zwierzęta poddane zostały eutanazji. W tym celu zwierzęta najpierw poddano premedykacji przy użyciu preparatu stresnil ((Janssen, Beerse, Belgium, w dawce 75 µL/kg masy ciała, który podany został domięśniowo w mięsień pośladkowy), a po około dwudziestu minutach zastosowano letalną dawkę tiopentalu sodu (Thiopental, Sandoz, Kundl, Austria), który dożylnie w żyłę brzożną ucha.

Bezpośrednio po eutanazji pobrano około dwucentymetrowy fragment tchawicy (z miejsca tuż ponad rozwidleniem tchawicy na oskrzela). Tkanki utrwalano według metody opisanej uprzednio przez Makowską (2018). Mianowicie, fragmenty tchawicy utrwalono immersyjnie umieszczając go w 4% zbuforowanym roztworze paraformaldehydu na 40 minut. Następnie fragmenty tchawicy poddano płukaniu w buforze fosforanowym przez okres 3 dni, przy czym każdego dnia zmieniano bufor. Po trzech dniach fragmenty tchawicy umieszczono w 18% zbuforowanym roztworze sacharozy i przechowywano w temperaturze 4°C przez okres co najmniej trzech tygodni. Następnie fragmenty tchawicy mrożono w temperaturze -20°C i cięto prostopadłe do światła tchawicy przy pomocy mikrotomu HM 525 (Microm International, Dreieich, Germany) na skrawki o grubości 12 mikrometrów. Podczas cięcia skrawki tchawicy umieszczano na szkiełkach mikroskopowych.

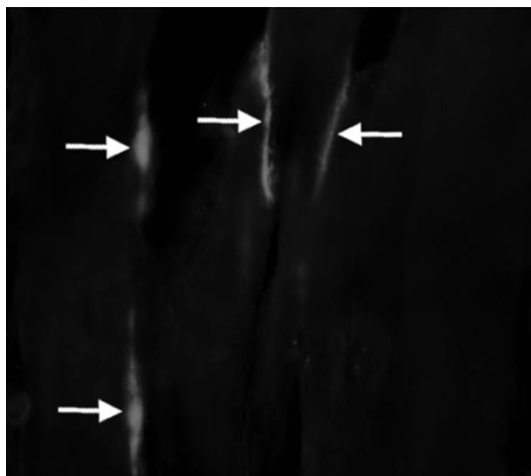
Skrawki tchawicy poddawano metodzie immunofluorescencji pojedynczej używając komercyjnych przeciwciał pierwotnych i wtórnych według metody opisanej uprzednio przez Makowską (2018). W skrócie metoda ta składała się z następujących etapów: 1) Suszenie szkiełek ze skrawkami tchawicy w temperaturze pokojowej przez 1 godz.; 2) Inkubacja z roztworem blokującym mającym za zadanie eliminację barwień niespecyficznych. Roztwór blokujący składał się z 10% koziej surowicy, 0.1% albuminy bydlęcej (BSA), 0.01% NaN₃, Tritonu X-100, i thimerosalu w PBS, a inkubacja trwała przez 1 godz.; 3) Inkubacja z przeciwciałem skierowanym przeciwko VIP (przeciwciało uzyskane od królika, producent: Biomol, Hamburg, Germany, nr katalogowy VA1285, rozcieńczenie robocze 1:2000). Inkubacja odbywała się w wilgotnej komorze i trwała „przez noc” 4) Inkubacja z przeciwciałem wtórnym sprzężonym z odpowiednim fluorochromem Alexa fluor 546 (przeciwciało uzyskane u osła, skierowane przeciwko królikowi, producent: Invitrogen, Carlsbad, Kalifornia, USA rozcieńczenie robocze: 1:1000). Inkubacja ta miała na celu „wybarwienie” kompleksu „przeciwciało pierwotne - antygen” i trwała 1 godzinę; 5) Pokrycie skrawków tchawicy zbuforowanym glicerolem i nałożenie na preparat szkiełka nakrywkowego. Pomiędzy każdym z wymienionych powyżej etapów barwienia wykonywano płukanie szkiełek ze skrawkami tchawicy w roztworze PBS (3 razy po 15 minut). Aby uniknąć barwień niespecyficznych przeprowadzono również rutynowe testy specyficzności użytego w doświadczeniu przeciwciała pierwotnego przeciwko VIP. Testy te wykonano według wcześniejszych publikacji (Makowska 2018) i obejmowały one: test preabsorpcji z odpowiednim antygenem, zastąpienia i ominięcia. Testy te eliminowały barwienia, co oznacza, że barwienia uzyskane w trakcie niniejszego doświadczenia były specyficzne.

Tak wybarwione skrawki tchawicy oglądano pod mikroskopem Olympus BX51 wyposażonym w odpowiedni filtr do mikroskopii immunofluorescencyjnej. Gęstość włókien immunoreaktywnych wobec VIP zlokalizowanych w warstwie mięśniowej ściany tchawicy określano na podstawie arbitralnej metody półilościowej, stosując następującą skalę oceny: symbol „-” oznaczał brak włókien, „+” oznaczał pojedyncze włókna, „++” oznaczał rzadką sieć włókien, „+++” oznaczał gęstą sieć włókien, a „++++” oznaczał bardzo gęstą sieć włókien.

3. Wyniki

W trakcie niniejszych badań stwierdzono obecność włókien nerwowych wykazujących immunoreaktywność wobec VIP w warstwie mięśniowej ściany tchawicy świni domowej (Rys. 1). Większość takich włókien układała się wzdłuż komórek mięśniowych. Średnia gęstość włókien immunoreaktywnych wobec VIP, oceniona na podstawie arbitralnej skali oceny półilościowej wynosiła „++”, czyli była to rzadka sieć włókien (Rys. 1). Należy zaznaczyć, iż nie stwierdzono widocznych różnic w gęstości włókien immunoreaktywnych wobec VIP pomiędzy poszczególnymi zwierzętami doświadczalnymi. Włókna wykazujące obecność VIP w większości były to włókna

grube, dobrze widoczne, charakteryzujące się silnym sygnałem immunofluorescencyjnym (Rys. 1). Były to jednak włókna stosunkowo krótkie



Rys. 1. Włókna nerwowe immunoreaktywne wobec naczynioaktywnego polipeptydu jelitowego (VIP) w warstwie mięśniowej ściany tchawicy świni domowej (oznaczone strzałkami). Powiększenie x400.

4. Dyskusja

W trakcie niniejszych badań wykazano obecność włókien immunoreaktywnych wobec VIP w warstwie mięśniowej ściany tchawicy świni domowej. Wyniki te są zgodne z wcześniejszymi obserwacjami przeprowadzonymi u różnych gatunków ssaków. Obserwacje te udowodniły, że VIP jest obecny w strukturach nerwowych położonych między innymi w tchawicy człowieka, szczura, myszy, świnki morskiej, psa czy fretki (Uddman i Sundler 1979; Lundberg i in. 1984; Kalubi i in. 1990; Dey i in. 1993; Yamamoto i in. 2000; Athari i in. 2016). Mimo wyraźnych różnic międzygatunkowych u większości gatunków włókna nerwowe immunoreaktywne wobec VIP były stosunków gęste, co może świadczyć o ważnej roli tego polipeptydu w regulacji czynności mięśni w ścianie tchawicy (Lundberg i in. 1984; Kalubi i in. 1990; Yamamoto i in. 2000). Pewne różnice pomiędzy wynikami uzyskanymi podczas niniejszych badań a wcześniejszymi doświadczeniami sugerują, iż dystrybucja i liczebność VIP-pozytywnych włókien nerwowych w ścianie tchawicy wykazuje duże zróżnicowanie międzygatunkowe. Prawdopodobnie liczebność ta zależy również od wielu czynników fizjologicznych i patologicznych. Zjawisko takie (nazywane plastycznością układu nerwowego) stwierdzono w przypadku struktur nerwowych zawierających VIP zlokalizowanych w ścianie przewodu pokarmowego (Makowska 2018). Należy zaznaczyć, że włókna w ścianie tchawicy w świetle wcześniejszych badań charakteryzują się dużym zróżnicowaniem pod względem neurochemicznym. Oprócz VIP na terenie takich włókien stwierdzono obecność szerokiej gamy innych aktywnych substancji neuronalnych. Największe znaczenie, obok typowych neuroprzekazników autonomicznego układu nerwowego takich jak acetylocholina i noradrenalina) wydają się mieć następujące substancje: tlenek azotu (będący neurotransmiterem gazowym), substancja P i peptyd kodowany ganem kalcytoniny, które uczestniczą w przewodzeniu bodźców czuciowych oraz właśnie, stwierdzony podczas niniejszych badań w tchawicy świni domowej, VIP (Martling 1987; Dey i in. 1993; Yamamoto i in. 2000). Wcześniejsze badania wykazały obecność VIP w strukturach nerwowych ściany tchawicy, nie tylko we włóknach znajdujących się pomiędzy komórkami mięśniowymi, ale także w zakończeniach nerwów zaopatrujących naczynia krwionośne (Lundberg i in. 1984; Dey i in. 1993; Yamamoto i in. 2000). Włókna zawierające VIP i zlokalizowane na terenie ściany tchawicy są w przeważającej części wypustkami neuronów zazwojowych przywspółczulnego układu nerwowego (Kalubi i in. 1990). Jak wykazały badania *in vitro* VIP wpływa relaksacyjnie na mięśnie tchawicy, a także rozszerza naczynia krwionośne tam zlokalizowane

(Lundberg i in. 1984; Kalubi i in. 1990). Jednakże istnieją badania potwierdzające również obecność VIP we włóknach nerwowych położonych na terenie ściany tchawicy odpowiadających za przekazywanie bodźców czuciowych (Kalubi i in. 1990). Uczestnictwo VIP w przewodzeniu bodźców czuciowych i bólowych potwierdzają badania, w których opisano obecność tego peptydu w neuronach czuciowych zwojów rdzeniowych (Tilley i in. 2017).

5. Wnioski

Niniejsze badania wykazały obecność włókien nerwowych immunoreaktywnych wobec VIP w warstwie mięśniowej ściany tchawicy świni domowej. Obecność takich włókien sugeruje, iż VIP uczestniczy w regulacji aktywności mięśni znajdujących się w ścianie tchawicy. Biorąc pod uwagę wcześniejsze badania dotyczące relaksacyjnego wpływu VIP na mięśnie, można przypuszczać, iż VIP wpływa na mięśnie położone w ścianie tchawicy rozkurczająco i hamuje ich aktywność. Ponadto VIP może także wpływać rozszerzająco na naczynia krwionośne w ścianie tchawicy oraz uczestniczyć w przewodzeniu bodźców czuciowych.

6. Literatura

- Athari SS, Pourpak Z, Folkerts G et al. (2016) Conjugated Alpha-Alumina nanoparticle with vasoactive intestinal peptide as a Nano-drug in treatment of allergic asthma in mice. *European Journal of Pharmacology* 791: 811-820.
- Bourlev V, Moberg C, Ilyasova N et al. (2018) Vasoactive intestinal peptide is upregulated in women with endometriosis and chronic pelvic pain. *American Journal of Reproductive Immunology* 80: e12857.
- Couvineau A, Laburthe M (2012) VPAC receptors: structure, molecular pharmacology and interaction with accessory proteins. *British Journal of Pharmacology* 166: 42-50.
- Cunha-Reis D, Ribeiro JA, de Almeida RFM et al. VPAC1 and VPAC2 receptor activation on GABA release from hippocampal nerve terminals involve several different signalling pathways. *British Journal of Pharmacology* 174: 4725-4737.
- Dey RD, Mayer B, Said SI (1993) Colocalization of vasoactive intestinal peptide and nitric oxide synthase in neurons of the ferret trachea. *Neuroscience* 54: 839-843.
- Erin N, İpekçi T, Akkaya B et al. (2016) Neuropeptide levels as well as neprilysin activity decrease in renal cell carcinoma. *Cancer Microenvironment* 9: 141-147.
- Grässel S, Muschter D (2017) Peripheral nerve fibers and their neurotransmitters in osteoarthritis pathology. *International Journal of Molecular Science* 18: 931.
- Iwasaki M, Akiba Y, Kaunitz JD (2019) Recent advances in vasoactive intestinal peptide physiology and pathophysiology: focus on the gastrointestinal system. *F1000 Research* 8: F1000.
- Kalubi B, Yamano M, Ohhata K et al. (1990) Presence of VIP fibers of sensory origin in the rat trachea. *Brain Research* 522: 107-111.
- Lepiarczyk E, Bossowska A, Kaleczyc J et al. (2017) The influence of resiniferatoxin (RTX) and tetrodotoxin (TTX) on the distribution, relative frequency, and chemical coding of noradrenergic and cholinergic nerve fibers supplying the porcine urinary bladder wall. *Toxins (Basel)* 9: 310.
- Lundberg JM, Fahrenkrug J, Hökfelt T et al. (1984) Co-existence of peptide HI (PHI) and VIP in nerves regulating blood flow and bronchial smooth muscle tone in various mammals including man. *Peptides* 5: 593-606.
- Makowska K (2018) Chemically induced inflammation and nerve damage affect the distribution of vasoactive intestinal polypeptide-like immunoreactive (VIP-LI) nervous structures in the descending colon of the domestic pig. *Neurogastroenterology and Motility* 30: e13439.
- Martling CR (1987) Sensory nerves containing tachykinins and CGRP in the lower airways. Functional implications for bronchoconstriction, vasodilatation and protein extravasation. *Acta Physiologica Scandinavica Supplement* 563: 1-57.
- Tilley DM, Cedeño DL, Kelley CA et al. (2017) Changes in dorsal root ganglion gene expression in response to spinal cord stimulation. *Regional Anesthesia and Pain Medicine* 42: 246-251.

- Turi GF, Li WK, Chavlis S et al. (2019) Vasoactive intestinal polypeptide-expressing interneurons in the hippocampus support goal-oriented spatial learning. *Neuron* 101: 1150-1165.
- Uddman R, Sundler F (1979) Vasoactive intestinal polypeptide nerves in human upper respiratory tract. *ORL Journal for Oto-rhino-laryngology and its Related Specialties* 41: 221-226.
- Villanueva-Romero R, Gutiérrez-Cañas I, Carrión M et al. (2019) Activation of Th lymphocytes alters pattern expression and cellular location of VIP receptors in healthy donors and early arthritis patients. *Scientific Reports* 9: 7383.
- Wasowicz K, Winnicka A, Kaleczyc J et al. (2018) Neuropeptides and lymphocyte populations in the porcine ileum and ileocecal lymph nodes during postnatal life. *PLoS One* 13: e0196458.
- Wu X, Conlin VS, Morampudi V et al. (2015) Vasoactive intestinal polypeptide promotes intestinal barrier homeostasis and protection against colitis in mice. *PLoS One* 10: e0125225.
- Yamamoto Y, Ootsuka T, Atoji Y et al. (2000) Tyrosine hydroxylase- and neuropeptides immunoreactive nerves in canine trachea. *American Journal of Veterinary Research* 61: 1380-1383.

5. Propozycje definicji życia w kontekście obiektów o statusie problematycznym – przegląd literatury

Proposed definition of life in the context of objects with problematic status
- a literature review

Krzysztof Gosik, Sebastian Mertowski, Marta Gosik

Katedra i Zakład Immunologii Klinicznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

Opiekun naukowy: Dr hab. n. med. Ewelina Grywalska

Krzysztof Gosik: krzysiekgoja@gmail.com

Słowa kluczowe: Cybernetyka, życie, ewolucja

Streszczenie

Próba definiowania istoty fenomenu życia została podjęta wielokrotnie w ciągu ostatnich setek lat. Zarówno organizmy transparentnie żywe, o złożonej budowie komórkowej, jak również obiekty o statusie problematycznym, takie jak wirusy, priony, pasożytnicze DNA i nowotwory, mogą być objęte odpowiednio minimalną i wystarczającą definicją. Zrekonstruowano i przeanalizowano liczne definicje życia prezentowane przez różne nurty filozoficzne powstałe w obrębie kultury zachodniej. Podjęta została próba udowodnienia, iż możliwe jest skuteczne definiowanie życia z uwzględnieniem jego różnorodności, jak również nieostrych obszarów granicznych pomiędzy materią nieożywioną i ożywioną, na przykładzie porównania dwóch spośród wielu wybranych definicji: organizmalno – systemowej i cybernetycznej.

1. Wstęp

W ciągu ostatnich kilku stuleci zaproponowano wiele definicji życia. Miały one przybliżyć nas do zrozumienia istoty życia (Korzeniewski 2001) i być użytecznym narzędziem metodologicznym we współczesnych naukach biologicznych. O ile wcześniejsze definicje takie jak mechanicystyczna czy witalistyczna ujmowały fenomen życia w ramy redukcjonizmu, lub przydawały mu cechy ponadnaturalne, to dziś filozofowie przyrody starają się rozwiązać problem w sposób możliwie obiektywny (Heller i in. 1997). Mimo tych zabiegów wciąż trwają spory odnośnie istoty życia i obiektów o statusie problematycznym. Wirusy, priony, nowotwory i pasożytnicze DNA posiadają pewne cechy organizmów żywych, jednak zazwyczaj intuicyjnie są klasyfikowane jako twory nieożywione lub nieautonomiczne (Korzeniewski 2008). W niniejszej pracy przeanalizowano rekonstrukcje wielu definicji życia figurujących w literaturze filozoficznej i naukowej. Autor stara się przybliżyć problem istoty życia i klasyfikacji obiektów o statusie problematycznym. Przedstawiono również próby jego rozwiązania na przykładzie dwóch różnych, choć zbliżonych podejść. Pierwsze organizmalno – systemowe, które skupia się na hierarchicznej strukturze organizmów, drugie zaś, cybernetyczne, kładące nacisk na funkcjonalny aspekt życia. Oba podejścia charakteryzuje całościowe i teleologiczne podejście do fenomenu życia.

2. Opis zagadnienia

Opisywanie fenomenu życia sprawia wiele trudności. Zanim nadeszła rewolucja w badaniach molekularnych doszukiwano się niematerialnej siły witalnej, która miała być istotą życia. Było to podejście witalistyczne, w którego przedstawicielem był między innymi Hans Driesch. Zakładał on istnienie entelechii, opierając swoje postulaty na obserwacji zdolności regeneracyjnej zarodków jeźowców. Uznał że ponieważ organizm jest celowościową, uorganizowaną strukturą, musi być kierowany ogólnie przez entelechie (Heller i in. 1997).

Równocześnie wraz z rozwojem fizyki pojawił się nurt mechanicystyczny, który później przerodził się w redukcjonizm w jego skrajnej formie. W obrębie tych nurtów zaczęto traktować żywe organizmy najpierw jak maszyny (w przypadku mechanicyzmu), a następnie opisywać za pomocą

terminologii fizykochemicznej (w przypadku redukcjonizmu), traktując je jako zbiór elementów, zaniedbując całościowy i celowościowy charakter fenomenu życia (Heller i in. 1997).

Oba te podejścia okazały się jednak dobrym wstępem do rozwoju systemowych koncepcji życia. Całościowe podejście, będące podstawą witalizmu, okazało się trafnym spostrzeżeniem. Podobnie redukcjonizm metodologiczny, będący spuścizną po mechanicyzmie, okazał się niezwykle przydatnym narzędziem w tworzeniu teorii biologicznych we współczesnej nauce. Swoiście monistyczny obraz przyrody, jaki jawi nam się w naukach przyrodniczych, wymagał stworzenia nowych koncepcji życia, jak również nowych definicji które mogłyby opisywać zarówno organizmy żywe, jak również obiekty o charakterze problematycznym. Takie koncepcje pojawiły się w drugiej połowie XX w. i zostały zaproponowane przez Ludwiga von Bertalanffy'ego i Andrieja Kołmogorowa (Von Bertalanffy 1960).

Ludwig van Bertalanffy był twórcą ujęcia organizmalno-systemowego, którego naczelną teorią jest teoria systemów. Obejmuje ona pojęcia i metody wiążące się z systemami w ogólności, nie zaś wyłącznie z organizmami żywymi. Głosi ona że możemy badać wszystkie uorganizowane struktury i traktować je jako systemy, to znaczy zespoły wzajemnie powiązanych elementów realizujących jako całość założone cele. Widzimy więc że koncepcja ta zakłada pewien redukcjonizm, a co za tym idzie jest na tyle szeroka że możemy założyć że obejmie swym zasięgiem obiekty o problematycznym statusie. Sam Bertalanffy mówił: „Organizm to zorganizowany w hierarchicznym porządku system wielkiej liczby różnorodnych części, którym wielka ilość procesów jest uporządkowana tak, że przez ich stałe relacje w obrębie szerokich granic, przy stałej przemianie materii i energii tworzących system, jak też przy uszkodzeniach w skutek wpływów zewnętrznych, system pozostaje w stanie sobie właściwym albo doń powraca lub procesy te prowadzą do powstania podobnych systemów”. Skupiając się na głównych postulatach zaproponowanych przez Bertalanffiego możemy sformułować definicję życia w ujęciu organizmalno-systemowym, nie zapominając że życie jest specyficznie skwantowane w postaci pojedynczego osobnika. „*Żywy organizm (osobnik) jest hierarchiczną organizacją układów otwartych, utrzymującą się w stanie wymiany składników, dzięki panującym w nim warunkom układowym*” (Heller i in. 1997, Von Bertalanffy 1960).

Andriej Kołogorow zaproponował ujmowanie życia za pomocą modelu cybernetycznego. Uznał on że ludzkość może stanąć przed możliwością spotkania struktur pozaziemskich wykazujących cechy organizmów żywych (posiadających nawet samoświadomość) ale złożonej w z zupełnie innych składników niż ziemskie życie. Dostrzegł on również pewne podobieństwa pomiędzy maszynami a organizmami żywymi. Podstawowe pojęcia którymi posługuje się cybernetyka to sprzężenie zwrotne ujemne i sprzężenie zwrotne dodatnie. Sama cybernetyka jest nauką o regulacji. W przypadku sprzężenia zwrotnego ujemnego mamy do czynienia z podstawowym mechanizmem samoregulacji, który w przypadku odchylenia od wartości zadanej powoduje powracanie wartości do stanu stacjonarnego (ale nie statycznego). Sprzężenie zwrotne dodatnie jest zmianą wartości parametru zadanego zgodnie z kierunkiem w którym nastąpiło odchylenie. Jest to więc reakcja łańcuchowa w której odchylenie zwiększa się lawinowo (Korzeniewski 2008).

Współcześnie, cybernetyczny model życia został zaproponowany przez Bernarda Korzeniewskiego. Jego definicja głosi że: „*Osobnik żywy to sieć sprzężeń zwrotnych ujemnych podrzędnych w stosunku do (będących na usługach) nadrzędnego sprzężenia zwrotnego dodatniego (potencjału ekspansji)*”. Gdzie sieć podrzędnych sprzężeń zwrotnych ujemnych to sieć reakcji chemicznych utrzymujących homeostazę organizmu (metabolizm) zaś nadrzędne sprzężenie zwrotne dodatnie (potencjał ekspansji) to potencjał do reprodukcji (Korzeniewski 2001).

Organizmalno-systemowa definicja kładzie nacisk na strukturalny aspekt życia, cybernetyczna zaś kładzie nacisk na funkcje organizmów żywych. Używając obu tych definicji możemy spojrzeć na obiekty o problematycznym statusie z dwóch różnych perspektyw i określić czy są to struktury ożywione i czy można uznać je za autonomiczny organizm (Heller 1997).

W literaturze naukowej i wielu podręcznikach mikrobiologii można napotkać na z góry postawione założenie głoszące że wirusy nie są organizmami żywymi, mimo iż są zdolne do powielania swojej tożsamości (informacji biologicznej). Zwykle teza ta oparta jest na podejściu głoszącym że budowa komórkowa jest minimalnym kryterium do postawienia granicy między tym

co żywe, a tym co ożywione nie jest. W przypadku ujęcia organizmalno-systemowego tak właśnie będzie. Najmniejszym wykazującym hierarchiczną budowę homeostatem jest komórka. Od organizmów takich jak bakterie, po organizm ludzki widzimy że jedynie budowa komórkowa spełnia kryteria postawione przez Bertalanffiego. Takiej budowy nie posiadają wirusy, priony ani pasożytnicze DNA. W tym ujęciu są jedynie makrocząsteczkami nie wykazującymi ani hierarchicznej budowy, nie wymieniają składników z otoczeniem, a już na pewno nie można uznać ich za system będący układem otwartym. Owszem za system można byłoby uznać wirusa, jako układ dwuelementowy (kapsyd i materiał genetyczny), nie wymienia on jednak składników z otoczeniem, autonomicznie nie jest więc układem otwartym. Brak metabolizmu i odpowiedniej struktury powoduje że w tym przypadku nie możemy uznać tych struktur za osobniki ożywione, a jedynie za aktywne biologicznie cząsteczki organiczne (Korzeniewski 1996).

Zupełnie inne wyniki uzyskamy posługując się ujęciem cybernetycznym. Struktura nie jest tu czynnikiem wymaganym do uznania obiektu za żywy. Możemy więc uznać że jeśli obiekt wykazuje pewne formy regulacji i rozmnaża się (powiela swoją informację) to jest osobnikiem ożywionym. Priony są patogennymi białkami których struktura α -helisy została zmieniona na β -karkę. Gdy jedno białko ulegnie takiej przemianie następuje lawinowa zmiana u innych białek (sprzężenie zwrotne dodatnie). Problem w tym że priony nie niosą żadnej informacji genetycznej i nie wykazujące mechanizmów regulacji (sprzężenie zwrotne ujemne), nie mogą być więc uznane za ożywione. W przypadku pasożytniczego DNA występującego w wielu kopiach, co mogłoby wydawać się nieopłacalne dla organizmu. Bernard Korzeniewski twierdzi, że DNA takie nie tylko może wykazywać jakieś mechanizmy regulacji, gdyż nie zostaje wycięte z genomu, ale również ulega powieleniu w wielu organizmach. Mając na uwadze wielość repetytywnego DNA w komórkach organizmów wyższych można uznać że pasożytnicze geny mają bardzo sprawny mechanizm sprzężenia zwrotnego dodatniego. Takie DNA uznać możemy za obiekt posiadający cechy osobnika żywego, jednak nie w pełni autonomicznego i przez to „mniej” żywego (Korzeniewski 2009).

W pełni żywym organizmem możemy nazwać „cybernetycznego” wirusa. Jest to idealny pasożyt który możliwie najbardziej ograniczył sieć sprzężeń zwrotnych ujemnych (zaledwie do infekowania komórki żywiciela), przy maksymalizacji potencjału ekspansji. Wirus zredukował swój metabolizm ale przejmuje metabolizm żywiciela, co również możemy uznać za mechanizm regulacji, a przy tym za jeden z najbardziej wydajnych sposobów rozmnażania się w przyrodzie. Mając na uwadze że powielenie swojej tożsamości (informacji genetycznej) jest nadrzędne wobec metabolizmu, możemy uznać wirus za osobnika ożywionego (Korzeniewski 2009).

Ostatnim przykładem obiektów o problematycznym statusie są nowotwory. Są one o tyle specyficzne że obie definicje mogą uznać je za żywe organizmy, natomiast brak autonomii i pełna zależność od „żywiciela” sprawia że ciężko uznać je za osobnika. W przypadku podejścia organizmalno-systemowego nowotwór jest żywy. Posiada on hierarchiczną strukturę (budowę komórkową), jest układem otwartym, wymieniającym materię i energię z otoczeniem, jak również dąży do jak najwydajniejszego rozmnażania się (co według Bertalanffiego ma wynikać z metabolizmu). Wynika z tego że ujęcie to uznaje nowotwór jako pół autonomicznego osobnika, grupę komórek która nagle z integralnej części organizmu stała się pasożytem i odrębnym osobnikiem (Korzeniewski 2009).

Cybernetyczne podejście, omijające aspekt strukturalny nie może uznać nowotwór za osobnika w pełni tego słowa znaczeniu. Chociaż nowotwory wykazują bardzo rozbudowaną sieć sprzężeń zwrotnych ujemnych, to jednak ich potencjał ekspansji jest silnie ograniczony. Nowotwór może się rozmnażać tylko do momentu gdy zabije żywiciela. Przy szybkim tempie wzrostu guz również często sam obumiera. Jest to więc jak widać naiwna ekspansja, nie prowadząca do przetrwania informacji genetycznej. W tym przypadku, wbrew intuicji, wirus wydaje się bardziej „ożywiony” niż nowotwór.

3. Przegląd literatury

Aby uzyskać odpowiedni punkt widzenia w poniższej pracy dokonany został przegląd klasycznej literatury filozoficznej z dziedziny filozofii przyrody i metodologii nauk, jak również nowych artykułów dotyczących nowoczesnego ujęcia problemu definiowania życia.

Ujmowanie i rozwiązywanie problemu istoty życia przybierało różne formy na przełomie ostatnich dwóch wieków. Wielość tych prób spowodowana jest dwoma względami: różnorodnością form życia i wieloznacznością terminu „życie”, używanego zarówno jako termin naukowy, jak i potoczny. Pierwszy narzuca się gdy spojrzymy na rozwój współczesnych nauk biologicznych. Mnogość form i ich przystosowań do środowiska sprawia, że albo tworzymy definicje za szerokie albo zbyt wąskie. Wzgląd drugi decyduje o być może niemożliwej do ominięcia, niezdolności ludzkiego poznania do pełnej odpowiedzi na pytanie co jest istotą życia, a także czy istota taka w ogóle istnieje. Wielu myślicieli skłaniało się ku tezie że życie jest terminem pierwotnym, niedefiniowalnym, co jednak nie umniejsza wartości naszych dociekań, gdyż próby definiowania życia zbliżają nas do pełnego poznania struktury życia, a także nakierowały na nowe tory badawcze. Dociekania takie są zwykle z natury interdyscyplinarne (Heller i in. 1997).

Tomistyczna definicja życia, którą zrekonstruował Szczepan Ślaga, głosi że życie to: „*rodzaj istnienia, przysługujący takiej substancji, która dzięki złożeniu z materii pierwszej i odpowiednio doskonałej i dostosowanej do niej formy substancjalnej jest uzdolniona do wykonywania wsobnych czynności życiowych*”. Koncepcja ta, choć czysto metafizyczna, stara się opisać życie kompleksowo podobnie jak ujęcie systemowo organizmalne (o którym piszę w dalszej części rozdziału). Mimo różnic pomiędzy interpretacją Tomasza a współczesnymi naukami biologicznymi, możemy zauważyć że już na tak wczesnym etapie rozwoju nauki, intuicja prowadziła filozofów przyrody w dobrym kierunku (Heller i in. 1997).

Klasyczna definicja mechanicystyczna, którą możemy zrekonstruować za Kartezjuszem. Przyjmuje on, że: „*ciało jest posągiem bądź maszyną [zbudowaną z elementu ziemistego], którą Bóg umyślnie w taki sposób ukształtował, by uczynić ją w najwyższym stopniu do nas podobną, tak dalece, iż nie tylko nadawał jej barwę i zewnętrzny kształt wszystkich naszych członków, lecz także pomieścił w jej wnętrzu wszystkie niezbędne części, by maszyna ta mogła chodzić, jeść, oddychać i by wreszcie mogła naśladować te wszystkie nasze czynności, o których sądzą, iż wywodzą się z materii i zależą jedynie od [przestrzennego] układu narządów*” (Heller i in. 1997).

W obrębie redukcjonizmu zaproponowano wiele definicji życia, tutaj przytoczę jedną zaproponowaną przez fizykochemika C. H. Hinshelwooda, który to stosował kinetykę reakcji chemicznych do wyjaśnienia procesów dynamicznych zachodzących w organizmach żywych. Jego definicja głosi że: „*życie jest układem makromolekularnych i wielofunkcyjnych wolnych rodników, mający niską entropię (dzięki dużemu uporządkowaniu), niską energię aktywacji i dla rozmaitych reakcji (dzięki aktywnym centrom) i pewien stopień trwałości (dzięki relatywnie sztywnej strukturze)*” (Heller i in. 1997).

Za Hansem Drieschem możemy natomiast podejść do życia bardziej całościowo. Jednakże podejście prezentowane przez tego filozofa było witalistyczne. Mimo iż zakładało ono całościowe podejście do organizmu, to jednak zakładało również istnienie niematerialnej siły życiowej. Jego definicja głosi iż: „*życie jest nieredukowaną strukturą odróżniającą się od materii nieożywionej celowością uwarunkowaną istnieniem w nich niematerialnego pierwiastka życiowego*” (Heller i in. 1997).

Bertalanffiego i zrekonstruować definicję organizmalną: „*Żywy organizm jest hierarchiczną organizacją układów otwartych, utrzymującą się w stanie wymiany składników, dzięki panującym w niej warunkom układowym*”. W tym ujęciu wyraźnie zarysowuje się nacisk na organizację układu jako całości i fakt, że organizmy są układami otwartymi, przez które przepływa energia i materia utrzymując zorganizowaną całość w stanie zadanym (Von Bertalanffi 1960).

Aby jednak maksymalnie objąć definicją obiekty o statucie problematycznym należy użyć języka spoza biologii. Znakomita okazała się tu definicja zaproponowana przez Bernarda Korzeniewskiego. Definicja ta czerpała z dokonań radzieckiego uczonego A. Kołmogorowa, który zastosował język cybernetyki do opisu procesów życiowych. Okazuje się ona minimalną, wystarczającą definicją opisującą zjawiska jawiące się jako istota życia. Cybernetyczna definicja życia brzmi więc następująco – „*Osobnik żywy to sieć sprzężeń zwrotnych ujemnych podrzędnych w stosunku do (będących na usługach) nadrzędnego sprzężenia zwrotnego dodatniego (reprodukcji)*” (Korzeniewski 2001, Korzeniewski 2004).

Wszystkie wymienione definicje w pewnym stopniu dotyczą podstawowych aspektów życia. W kontekście opisu i klasyfikacji obiektów o problematycznym statusie najlepsza okazuje się cybernetyczna definicja kładąca nacisk na funkcjonalny aspekt organizmów (metabolizm, rozmnażanie lub replikacja). W obliczu rozwijającej się nauki i pojawiających się nowych doniesień dotyczących podstawowych mechanizmów rządzących światem ożywionym z pewnością będą proponowane nowe definicje pasujące z większym stopniem do rzeczywistości. Próba klasyfikacji niezwykle różnorodnego i złożonego zjawiska jakim jest życie biologiczne zawsze obarczona jest możliwością polaryzacji w stronę pewnego wyłuszczonego przez definicję pewnego jego aspektu lub zbyt dużego uproszczenia fenomenu życia jako całości. Można przypuszczać jednak, iż definicje podobne do cybernetycznej, nie odmawiające całościowego i celowościowego podejścia do organizmów, jak również uwypuklenia pewnego nadrzędnego celu „napędzającego” fenomen życia, utrzymają specyficzny charakter tego typu definicji.

4. Podsumowanie

W przypadku różnych koncepcji filozoficznych i sformułowanych w ich obrębie definicji życia, jesteśmy w stanie określić które z obiektów o problematycznym statusie możemy uznać za żywe osobniki a które jedynie za obiekty posiadające pewne cechy życia. Chociaż wiele definicji zostało zaproponowanych, to definicje organizmalno – systemowa i cybernetyczna okazują się najbardziej nowoczesne i użyteczne. Dodatkowo cybernetyczna definicja życia, skupiająca się na funkcjonalnych aspektach życia i używająca terminologii spoza nauk biologicznych (będącej metajęzykiem dla tych ostatnich) znakomicie wskazuje na możliwą istotę życia. Nasuwa się jednak pytanie, czy jesteśmy w stanie jednoznacznie powiedzieć czy obiekty takie jak wirusy są ożywione? Odpowiedź zawsze będzie zależała od przyjętego paradygmatu, jak również od tego czy dana definicja jest odpowiednio użyteczna w danej nauce. Na daną chwilę cybernetyczna definicja życia wydaje się minimalną i wystarczającą definicją życia aby spójnie i w sposób sprawny opisywać rzeczywistość biologiczną w jej najogólniejszym sensie. Jest ona więc najlepszą z dotychczasowych definicji życia.

5. Literatura

- Heller M, Lubański M, Ślaga S (1997) *Życie – Zagadnienia filozoficzne współczesnej nuki*, Wydawnictwo Akademii Teologii Katolickiej, Warszawa 320-352.
- Korzeniewski B (1996) Powstanie i ewolucja życia, *EREM FOSZE*, 10-11.
- Korzeniewski B (2001) Cybernetic Formulation of the Definition of Life, *Instytut Biologii Molekularnej, Uniwersytet Jagielloński: Jurnal of Theoretical Biology* 209, 275-286.
- Korzeniewski B (2004) Confrontation of the cybernetic definition of a living individual with the real world, *Instytut Biologii Molekularnej: Acta Bioteoretica* 53(1): 1-28.
- Korzeniewski B (2008) Trzy Ewolucje - Ewolucja Wszechświata, Ewolucja Życia, Ewolucja Świadomości, *Małopolska oficyna wydawnicza KORONA*, 44-262.
- Von Bertalanffy L (1960) *Problems of Life*, Nowy York.

6. Występowanie germanu (Ge) w środowisku naturalnym

Germanium in the natural environment

Grygoyć Katarzyna, Jabłońska-Czapla Magdalena

Instytut Podstaw Inżynierii Środowiska Polskiej Akademii Nauk w Zabrzu

Opiekun naukowy: dr hab. Magdalena Jabłońska-Czapla

Katarzyna Grygoyć: katarzyna.grygoyc@ipis.zabrze.pl

Słowa kluczowe: pierwiastek krytyczny, TCE, geochemia, hydrogeochemia, toksyczność

Streszczenie

Szybki rozwój gospodarczy, wykorzystanie wysoko zaawansowanych technologii w obszarach związanych z komunikacją, informatyką, elektroniką, medycyną oraz rozwój gałęzi przemysłu związanych z odnawialnymi źródłami energii, jest domeną naszych czasów. W nowoczesnej gospodarce german stał się pierwiastkiem o krytycznym znaczeniu w nowych technologiach, a jego właściwości są wykorzystywane na coraz szerszą skalę. Z powodzeniem stosowany jest w detektorach półprzewodnikowych, światłowodach, katalizatorach i medycynie. Rosnące zainteresowanie tym pierwiastkiem w przemyśle rodzi konieczność oceny potencjalnego wpływu germanu na środowisko. W tym celu niezbędna jest wiedza na temat jego stężenia w środowisku naturalnym oraz lepsze zrozumienie procesów chemicznych leżących u podstaw jego zachowania w przyrodzie. German należy do pierwiastków stosunkowo słabo poznanych, a badania nad jego zawartością w wodach i osadach dennych należą do szczególnie rzadkich. W roztworach wodnych german występuje głównie w formie kwasu germanowego i produktów jego dysocjacji. Może także ulegać biometylacji. Wiadomo, że nieorganiczne formy germanu wykazują właściwości toksyczne. Wraz ze wzrostem wykorzystania germanu w nowych technologiach wzrasta również ryzyko jego niekontrolowanego uwalniania się do środowiska wodno-glebowego. Istotne jest aby zgromadzić jak najszerszą wiedzę na temat tych pierwiastków, które mogą stać się w przyszłości substancjami zanieczyszczającymi środowisko i stanowiącymi zagrożenie dla zdrowia ludzi, tak jak może mieć to miejsce w przypadku germanu.

1. Wstęp

German (Ge) został odkryty w 1886 roku przez niemieckiego chemika Clemensa Alexandra Winklera. Podał on szczegółowej analizie nowy minerał wydobyty w niemieckiej kopalni Himmelsfurt położonej niedaleko Freibergu. Ku zaskoczeniu badacza okazało się, że minerał zawiera nieznaną dotąd pierwiastek. To odkrycie potwierdziło przypuszczenia Dimitria Ivanovicha Mendeleeva, który już kilka lat wcześniej przewidywał istnienie pierwiastka o właściwościach zbliżonych do cyny (Sn) i krzemu (Si) i nazwał go „eka-sililcon”.

German jest rzadkim pierwiastkiem, jednocześnie jest to pierwiastek o rosnącym znaczeniu dla przyszłych technologii, a zapotrzebowanie na niego stale rośnie. Szacuje się, że jego światowe rezerwy wynoszą ok 8600 ton (Kelly i Matos 2013) podczas gdy globalne zapotrzebowanie na Ge oszacowano na 28 ton w 2006 roku, i 160 ton w 2015 roku. Podejrzewa się, że w ciągu kolejnych dekad jego zużycie wzrośnie ośmiokrotnie (Gunn 2014).

W nowoczesnej gospodarce german stał się pierwiastkiem o kluczowym znaczeniu w nowych technologiach. Jego właściwości są wykorzystywane w gałęziach przemysłu związanych z produkcją światłowodów, branżą elektroniczną, a przede wszystkim z produkcją sprzętu służącemu poprawie bezpieczeństwa i nadzoru wykorzystującego podczerwień, oraz przy produkcji samochodów.

Ze względu na niskie stężenie w rudach mineralnych, znaczenie gospodarcze, dostępność w przyszłości i brak substytutów german określany jest jako pierwiastek technologicznie krytyczny (TCE - Technology Critical Element). Do tej grupy należą pierwiastki mające ogromne znaczenie w rozwoju nowych, kluczowych technologii, lecz popyt i podaż na nie są nie zrównoważone. Mianem

TCE określa się pierwiastki takie jak: Ga, Ge, In, Nb, Ta, Te, Tl, Pt i większość pierwiastków ziem rzadkich (REE) (Wojcieszek i in. 2018).

W związku z rosnącym zapotrzebowaniem na nowe technologie, a co za tym idzie wzrostem globalnego zapotrzebowania na TCE Unia Europejska (COST Action TD1407: Network on Technology-Critical Elements) zwraca uwagę naukowców na potrzebę zbadania zawartości tych pierwiastków w różnych komponentach środowiska oraz wpływ procesów środowiskowych na formy ich występowania, a także zagrożenie zdrowia i życia ludzi jakie mogą one stwarzać. Informacje w światowej literaturze na temat TCE są niezwykle rzadkie, szczególnie w przypadku pierwiastków takich jak german.

Pomimo stosunkowo niskiej zawartości tego pierwiastka w skorupie ziemskiej, rozwój technologii związanych z jego wydobyciem oraz wzrost ilości wydobywanego germanu doprowadził do licznych przypadków jego niekontrolowanego lokalnego uwalniania się do środowiska. Co za tym idzie przyczyniając się do wzrostu rozproszonego zanieczyszczenia, szczególnie na obszarach rozwiniętych przemysłowo.

Rosnące zainteresowanie tym pierwiastkiem w przemyśle rodzi konieczność oceny potencjalnego wpływu germanu na środowisko. W tym celu niezbędna jest wiedza na temat jego stężenia w środowisku naturalnym oraz lepsze zrozumienie procesów chemicznych leżących u podstaw jego zachowania w przyrodzie. German należy do pierwiastków stosunkowo słabo poznanych, a badania nad jego zawartością w wodach i osadach dennych należą do szczególnie rzadkich.

2. Podstawowe właściwości germanu

German to pierwiastek chemiczny, który wraz węglem (C), krzemem (Si), cyną (Sn) i ołowiem (Pb) należy do grupy IVa układu okresowego pierwiastków. Jest on twardym, błyszczącym, srebrzystoszarym metaloidem o właściwościach chemicznych podobnych do innych węglowców, przede wszystkim krzemu. Pierwiastek ten wykazuje niezwykle podobieństwo geochemiczne do krzemu, głównie ze względu na ich identyczne zewnętrzne powłoki elektronowe. Wiązanie w sieci krystalicznej atomów krzemu lub germanu wymaga czterech elektronów walencyjnych (Hölli i in. 2007). W rezultacie cykl biogeochemiczny tych dwóch pierwiastków w przyrodzie jest podobny.

Oprócz formy elementarnej german najczęściej występuje na +II i +IV stopniu utlenienia przy czym ten ostatni wykazuje większą stabilność i dlatego jest tym, w którym związki Ge zwykle występują w środowisku (Rosenberg 2009). Dwuwartościowe związki germanu są wytwarzane głównie syntetycznie i mają znaczenie tylko w przemyśle chemicznym.

German występuje w środowisku zarówno w formie związków nieorganicznych takich jak np. GeO_2 , GeCl_2 oraz jako związki organiczne np. Ge-132 (2-carboxyethylgermanium-sesquioxide). Może on także ulegać biometylacji do mono- i di-metylogermanu (Thayer 1995).

2.1 Występowanie germanu w skorupie ziemskiej i glebach

German jest rzadkim pierwiastkiem, a jego zawartość w skorupie ziemskiej wynosi 1,4–1,6 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (Kabata-Pendias i Pendias 1999). W minerałach Ge często występuje w postaci tlenków (GeO_2) lub siarczków (GeS_2) (Gunn 2014). W przyrodzie german rzadko tworzy własne minerały tj. germanit ($\text{Cu}_{13}\text{Fe}_2\text{Ge}_7\text{S}_{16}$), renieryt ($(\text{Cu,Zn})_{11}(\text{Ge,As})_2\text{Fe}_4\text{S}_{16}$), argyrodyt (Ag_8GeS_6) czy briarytyt ($\text{Cu}_2(\text{Fe,Zn})\text{GeS}_4$). Zdecydowanie częściej jest w postaci rozproszonej manifestując swoje powinowactwo do Si, Zn, Cu, Fe, Pb, Sn. Sfaleryt zwykle zawiera między 0,1 a 1000 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ germanu (Pasiczna i in. 2010). Porównywalne stężenia odnotowano również dla wielu innych powszechnych minerałów siarczkowych takich jak: galena, enargit, luzonit i bornit (Soares Monteiro 2006). Złoże siarczku polimetalicznego Cu-Pb-Zn-Ag Tsumeb w Namibii, Kipushi w Demokratycznej Republice Kongo oraz polimetaliczne złoże we Freibergu są przykładami złóż o znacznej zawartości tego pierwiastka. German jest również często spotykany w złożach karbońskich, w tym twardych i miękkich węglach - ze względu na wysokie powinowactwo do materiału organicznego (Templeton i in. 2000). Ze względu na swe rozproszenie w skorupie ziemskiej german pozyskiwany jest głównie jako produkt uboczny wydobycia innych złóż jak rudy srebra, miedzi, cynku i ołowiu. Pozostałości

spalania (popioły lotne) z niektórych węgli, które mogą zawierać znaczne stężenia germanu mogą również być źródłem germanu dla potrzeb gospodarki (Moskalyk 2004).

Wraz z wydobywaniem złóż german może dostawać się do środowiska w postaci odpadów poprodukcyjnych z górnictwa i hutnictwa. Obecnie składowiska tego rodzaju odpadów cieszą się coraz większym zainteresowaniem jako potencjalnych źródeł odzyskiwania metali zwłaszcza TCE w Europie. Według danych pochodzących z gromadzonych przez instytuty badań rynku i opinii oraz dane pochodzące z sektora gospodarki i statystyki 65% światowej produkcji germanu w roku 2019 pochodziło z Chin; 5% z Rosji, natomiast pozostała część produkcji odbywa się w Belgii, Kanadzie, Niemczech, Japonii i na Ukrainie (www.statista.com).

Zawartość germanu w glebach zwykle waha się od 0,5 do 2,3 mg·kg⁻¹, a stężenia aż 173 mg·kg⁻¹ zaobserwowano w glebie w Szwecji (Eriksson 2001).

2.2 Występowanie germanu w wodach i osadach dennych

W wodach o niskiej temperaturze german tworzy kompleksy z fluorem, wodorotlenkami, fosforanami i siarczanami. Główną formą występowania germanu w hydrotermalnych roztworach wodnych jest kwas germanowy (Ge(OH)₄) i produkty jego dysocjacji m.in. kompleksy GeO(OH)₃ i GeO₂(OH)₂ oraz kompleksy Ge-fluorek przy wysokich stężeniach fluoru (Wood i Samson 2006). W wodach german również wykazuje podobne właściwości do krzemu. Obydwa pierwiastki występują w formie rozpuszczonej w postaci czterowartościowych kompleksów wodorotlenkowych o zbliżonych wartościach stałych dysocjacji. Rozpuszczalność germanu, podobnie jak krzemu jest silnie uzależniona od pH roztworu, wykazując najwyższe stężenia w wodach o bardzo niskich lub bardzo wysokich wartościach pH (Pokrovsky i Shott 1988).

W konsekwencji tego podobieństwa znaczna część badań dotyczących germanu skupiona jest na jego właściwościach w kontekście przydatnego znacznika geochemicznego. Stosunek Ge/Si stosowany jest do badań zarówno lądowych jak i oceanicznych cykli Si jako znacznik procesów wietrzenia, aktywności hydrotermalnej i geotermicznej, procesów biologicznych i ścieżek przepływu. Głównym źródłem germanu w wodach są procesy wietrzenia oraz źródła hydrotermalne wpływające ze szczelin na dnie oceanów. Osady zawierają również german z frakcji biogennej w postaci pancerzyków obumarłych okrzemek i gąbek, które poprzez procesy sedymentacji trafiają do osadów dennych m.in. w postaci opalu biogenego (Tribouillard i in. 2011).

Stężenie germanu w wodach słodkich i morskich wynosi od 0,05-0,1 µg·L⁻¹ (Faure 1998). Przy czym wody powierzchniowe są mniej zasobne w german niż wody dennie, co jest zgodne z typowym profilem rozkładu składników odżywczych dla zbiorników wodnych (Froelich 1985). W słodkich wodach podziemnych german również należy do składników śladowych. Jego wyższe stężenia odnotowywano w wodach termalnych, w wodach o bardzo niskim lub bardzo wysokim pH oraz wodach solankowych (Rosenberg 2009). W źródłach termalnych stężenie germanu jest bardzo zmienne od wartości na poziomie granicy detekcji do około 300 µg·L⁻¹ (Dobrzyński i in. 2018). Najwyższe stężenia germanu 0,001 – 0,1 mg·L⁻¹ stwierdzono w wodach kopalnianych pochodzących ze złóż rud siarczkowych (Goleva i Vorobyeva 1967). Badania pod kątem zawartości germanu w osadach dennych, szczególnie pochodzących z rzek czy jezior należą do rzadkich natomiast szacuje się, że w średnia globalna ilość germanu zawartego w cząstkach zawieszonych w toni wodnej wynosi 1,23 ppm germanu (Viers i in. 2009).

2.3 Występowanie germanu w powietrzu

Niewiele jest prac dotyczących stężenia germanu w atmosferze. Dane literaturowe wskazują, że spalanie węgla (popioły lotne) jest jednym z głównych źródeł zanieczyszczenia germanem. Szacuje się, że wielkość emisji tego pierwiastka do środowiska poprzez spalanie węgla przekracza emisję z jego produkcji przemysłowej o dwa rzędy wielkości (Templeton i in. 2000; Moskalyk 2004). Badania Froelich'a i in (1985) wskazują na wyższe stężenie germanu w rzekach zlokalizowanych bliżej centrów spalania węgla w porównaniu z usytuowanymi w większej odległości.

2.4 Występowanie germanu w tkankach roślinnych i zwierzęcych.

Obecność germanu została stwierdzona w większości roślin. Proces pobierania i transportu germanu przez rośliny jest bardzo podobny do metabolizmu Si lecz jego funkcja nie została jeszcze

dokładnie poznana. Wiadomo, że Ge jest bardziej reaktywny od Si. Tworzy wysoce stabilne kompleksy z dużą liczbą grup funkcyjnych i w przeciwieństwie do Si może być toksyczny. Przy wysokich stężeniach germanu w podłożu działa on jak konkurencyjny inhibitor zaburzając wchłanianie krzemu (Blecker i in. 2007). W kulturach hydroponicznych podwyższone poziomy Ge większe niż $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ powodowały martwicę i zwiększały aktywność peroksydazy w roślinach jęczmienia (Halperin i in. 1995). Badania Cheong i in. (2009) wykazały, że german nieorganiczny ma znacznie bardziej toksyczny wpływ na kiełkowanie i rozwój sałaty siewnej (*Lactuca sativa*) niż german w formie organicznej.

Ge występuje we wszystkich organizmach zwierzęcych w stężeniach 0,07-1,5 ppm (Kabata-Pendias i Pendias 1999). Jego biologiczna funkcja w organizmach zwierzęcych w tym w ciele człowieka nie została poznana. Na przestrzeni ostatnich 40 lat w krajach azjatyckich suplementy organicznego germanu były powszechnie stosowane w leczeniu chorób takich jak: choroby wątroby, nadciśnienie tętnicze, rak, zakażenia wirusem HIV, zapalenie stawów, alergie pokarmowe i malaria (Furst 1987).

Podczas gdy związki organo-germanu są stosowane w medycynie, nieorganiczne związki germanu takie jak GeO_2 mają działanie toksyczne. Ge jest szybko i intensywnie wchłaniany z przewodu pokarmowego. Szybko rozprzestrzenia się w organizmie i prowadzi do uszkodzenia różnych narządów (Templeton i in. 2000). Ma tendencję do gromadzenia się w ciele, jego najwyższe stężenia zidentyfikowano w nerkach, wątrobie, śledzionie, przewodzie pokarmowym i kościach. Zgłoszono, że hamuje wiele enzymów, takich jak: glutaminowa transaminaza szczawiooctowa, dehydrogenaza mlekowa, dehydrogenaza alkoholowa i S-transferaza glutationowa (Furst 1987).

3. Podsumowanie

Pomimo znacznych wysiłków badawczych w zakresie poznania mechanizmów zachowywania się Ge w systemach naturalnych na powierzchni Ziemi pozostają one słabo scharakteryzowane. Wiadomym jest, że jego użycie w stale rozwijających się technologiach będzie coraz większe. Istotne jest więc jak najlepsze poznanie jego roli biologicznej, oraz identyfikacja i ocena potencjalnych źródeł zanieczyszczenia rozproszonego i punktowego, aby możliwa była rzetelna ocena ekotoksykologiczna tego pierwiastka. Potencjalne zanieczyszczenie antropogeniczne pochodzi nie tylko z wydobywania i produkcji, ale również z użytkowania, recyklingu i unieszkodliwiania produktów zawierających TCE.

Badania nad ilościową analizą germanu należą wciąż do rzadkich. Jednym z powodów jest bardzo niskie stężenie tego pierwiastka w większości środowisk naturalnych, a więc jego bezpośrednie oznaczanie ograniczone jest limitami detekcji dla większości metod analitycznych. Tylko zaawansowane techniki jak na przykład spektrometria mas z plazmą wzbudzoną indukcyjnie (ICP-MS) może zaoferować dostateczną czułość do tego typu analiz.

Badania przeprowadzono w ramach projektu, który otrzymał dofinansowanie z Narodowego Centrum Nauki w Polsce na podstawie decyzji nr UMO-2018/29 / B / ST10 / 01522.

4. Literatura

- Blecker SW, King SL, Derry LA i in. (2007) The ratio of germanium to silicon in plant phytoliths: quantification of biological discrimination under controlled experimental conditions. *Biogeochemistry* 86: 189-199.
- Cheong YH, Kim SU, Dong DC i in. (2009) Effect of Inorganic and Organic Germanium Treatments on the Growth of Lettuce (*Lactuca sativa*). *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry* 52(4): 389-396.
- Dobrzyński D, Boguszewska-Czubara A, Sugimori K (2018) Hydrogeochemical and biomedical insights into germanium potential of curative waters: a case study of health resorts in the Sudetes Mountains (Poland). *Environmental Geochemistry and Health* 40(4):1355-1375.

- Eriksson J (2001) Concentrations of 61 trace elements in sewage sludge, farmyard manure, mineral fertilizer, precipitation and in oil and crops: Swedish Environmental Protection Agency Report No 5159.
- Faure G (1998) Principles and applications of geochemistry 2nd. Prentice Hall, New Jersey pp.928.
- Froelich PN, Hambrick GA, Andreae MO i in. (1985) The geochemistry of inorganic germanium in natural waters. *Journal of Geophysical Research Oceans* 90 (C1): 1133–1141.
- Furst A (1987) Biological testing of germanium. *Toxicology and Industrial Health* 3: 167–204.
- Goleva GA, Vorobyeva IN (1967) The migration of germanium in the ground waters of ore deposits. *Geochemistry International* 4: 809–817.
- Gunn G (2014) European Commission, Critical raw materials for the EU. Report of the ad-hoc working group on defining critical raw materials.
- Halperin S, Barzilay A, Carson M i in. (1995) Germanium accumulation and toxicity in barley. *Journal of Plant Nutrition* 18:1417–1426.
- Höll R, Kling M, Schroll R (2007) Metallogenesis of germanium—a review. *Ore Geology Reviews* 30:145–180.
- Kabata-Pendias A, Pendias H (1999) Biogeochemistry of trace element [in Polish] Wydawnictwo Naukowe PWN: Warszawa, Poland.
- Kelly TD, Matos GR (2013) Historical Statistics for Mineral and Material Commodities in the United States (2013 Version); U.S. Geological Survey.
- Moskalyk RR (2004) Review of germanium processing worldwide. *Minerals Engineering* 17: 393–402.
- Pasieczna A, Dusza-Dobek A, Markowski W (2010) Wpływ górnictwa węgla kamiennego i hutnictwa metali na jakość wód Białej Przemszy i Bobrka. *Górnictwo i Geologia* 5: 4.
- Pokrovsky GS, Shott J (1988). Experimental study of the complexation of silicone and germanium with aqueous species: implications of germanium and silicone transport and Ge/Si ratio in natural waters. *Geochimica Cosmochimica Acta* 62(21–22): 3413–3428.
- Rosenberg E (2009) Germanium: environmental occurrence, importance and speciation. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 8: 29–57.
- Rudnick RL, Gao S (2013) Composition of the continental crust. In: Rudnick RL, Eds, *Treaties on geochemistry*, volume 3–The crust (pp.1–64). Amsterdam: Elsevier.
- Soares Monteiro LV, Betencourt JS, Juliani C i in. (2006) Geology, petrography, and mineral chemistry of the Vazante non-sulphide and Abrósia and Fegundes sulphide-rich carbonate-hosted Zn-(Pb) deposits, Minas Gerais, Brazil. *Ore Geology Reviews* 28: 201–234.
- Templeton DM, Ariese F, Cornelis R i in. (2000) Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approach. *Pure and Applied Chemistry* 72: 1453–1470.
- Thayer JS (1995) Chemistry of the heavy elements: Hydrido and Organo compounds. VCH: New York.
- Tribovillard N, Bout-Roumazeilles V, Riboulleau A (2011) Transfer of germanium to marine sediments: Insights from its accumulation in radiolarites and authigenic capture under reducing conditions. Some examples through geological ages *Chemical Geology* 282 (3–4): 120–130.
- Viers J, Dupré B, Gaillardet J (2009) Chemical composition of suspended sediments in world rivers—New insights from a new database: *Science of the Total Environment* 407(2): 853–868.
- Wojcieszek J, Szpunar J, Lobinski R (2018) Speciation of technologically critical elements in the environment using chromatography with element and molecule specific detection. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 104: 42–53.
- Wood SA, Samson IM (2006) The aqueous geochemistry of gallium, germanium, indium and scandium. *Ore Geology Reviews* 28: 57–102.

7. Tellur jako pierwiastek krytyczny należący do LSTCE (less-studied technology-critical elements)

Tellurium as a critical element belonging to LSTCE (less-studied technology-critical elements)

Grygoyć Katarzyna, Jabłońska-Czapla Magdalena

Instytut Podstaw Inżynierii Środowiska Polskiej Akademii Nauk, Zabrze
Opiekun naukowy: dr hab. Magdalena Jabłońska-Czapla

Grygoyć Katarzyna: katarzyna.grygoyc@ipis.zabrze.pl

Słowa kluczowe: tellur, TCE, LSTCE, pierwiastek krytyczny

Streszczenie

Tellur jest rzadkim pierwiastkiem, o nie do końca poznanej biologicznej roli w żywych organizmach. Należy on do pierwiastków krytycznych (LSTCE - less-studied technology-critical elements) mających zastosowanie technologiczne. Zasadniczo tellur jest uważany za toksyczny i teratogeny, a toksyczność związków telluru zależy od formy chemicznej. W środowisku Te istnieje w nietoksycznej formie elementarnej (Te^0) i w znacznie bardziej powszechnych formach oksyanionowych. Toksyczność Te zależy od formy jonowej: Te(IV) jest o rząd wielkości bardziej toksyczny niż Te(VI) . W środowiskach o wysokiej aktywności drobnoustrojów może ulegać biometylacji, a metylowany produkt wykazuje wyraźnie różne poziomy mobilności, biodostępności i toksyczności. Tellur jest stosowany w różnych gałęziach przemysłu: w przemyśle metalurgicznym w celu poprawy właściwości mechanicznych stali; przemyśle stopowym z miedzią; przemyśle gumowym w celu poprawy odporności na ciepło; w przemyśle fotograficznym i farmaceutycznym; w półprzewodnikach; niektórych typach paneli fotowoltaicznych; jako katalizator w wielu zastosowaniach przemysłowych. Chociaż tellur jest pierwiastkiem krytycznym, rzadko pojawia się w raportach dotyczących zasobów złóż mineralnych. Wpływ rosnącego wykorzystania wielu pierwiastków z grupy TCE (technology critical elements) w różnych obszarach środowiska jest słabo poznany, a pierwiastki te podlegają znaczącym zmianom w swoim cyklu na powierzchni Ziemi. Ich wpływ na cykle biogeochemiczne oraz potencjalne zagrożenia biologiczne i dla zdrowia ludzkiego wymagają dalszych badań.

1. Wstęp

Globalny wzrost populacji, bogatszy styl życia, zmiany technologiczne i polityka rządów zmieniły podaż i popyt na surowce mineralne od początku XX wieku. Zastosowanie wielu różnych materiałów w pojedynczych wyrobach, w celu zwiększenia funkcjonalności produktu oraz dążenie do technologii niskoemisyjnych i efektywnego gospodarowania zasobami, zwiększyły popyt na wiele tak zwanych pierwiastków krytycznych - TCE (*Technology Critical Elements*) (Nuss i Blengini 2018).

Pierwiastki te są obecnie intensywnie wykorzystywane i odgrywają ważną rolę szczególnie w nowoczesnych i kluczowych technologiach związanych z produkcją energii odnawialnej, efektywności energetycznej, elektroniki i przemysłu lotniczego, obronności, lecz często są to pierwiastki rzadkie, a ich wydobycie skoncentrowane jest jedynie w kilku krajach świata (np. Chinach). W związku z tą sytuacją podaż i popyt na nie jest niezrównoważony. Z tego względu zostały one określone mianem krytycznych (TCE) i obejmują Ga, Ge, In, Nb, Ta, Te, Tl, Pt (PGE) i większość pierwiastków ziem rzadkich (REE).

W związku z ich rosnącym wykorzystaniem w produktach elektronicznych i przemysłowych, coraz większe ilości TCE są uwalniane do środowiska. Obecnie niewiele wiadomo o losie wielu z tych pierwiastków. Wraz z rosnącym wykorzystaniem telluru w przemyśle rosną również obawy dotyczące wpływu jego niektórych form na środowisko naturalne i zdrowie ludzi, gdyż mogą być one bardzo toksyczne.

Brak niektórych minerałów w krajach Unii Europejskiej (UE) wymusił wysiłki rządów na rzecz zabezpieczenia dostaw surowców mineralnych w UE. Prognozy wskazują, że popyt na surowce krytyczne i metale „high-tech” będzie rosł wraz z rozwojem innowacyjnych technologii (Jarosiński i in. 2016).

Z chemicznego punktu widzenia TCE są raczej heterogeniczną, niespójną grupą pierwiastków. Nasz poziom wiedzy na temat wpływu produktów ich wykorzystania na środowisko jest dość zróżnicowany; chociaż wpływ pierwiastków takich jak Pt lub Pd jest znany od dawna, prawie nic nie wiadomo na temat zachowania Nb lub Ta w środowisku (Filella i Rodríguez-Murillo 2017). Ponadto istnieje rosnące zapotrzebowanie na techniką analityczną, które są w stanie mierzyć zawartość pierwiastków krytycznych takich jak: Pt, Nb, Ta, Te, In, Ga, Ge i Tl. W przypadku większości z nich ich wpływ na środowisko i toksykologia jest nieznany. Nagły wzrost popytu przemysłowego na wsparcie powstającej technologii lub nieoczekiwane odcięcie dostaw krytycznych minerałów może mieć drastyczny wpływ na bezpieczeństwo narodowe i zdrowie ekonomiczne.

W związku z tym naukowcy i praktycy są zainteresowani losami TCE, od poznania ich procesów środowiskowych po zrozumienie potencjalnych zagrożeń dla zdrowia ludzi (Cobelo-García i in. 2015). Przyczyną braku dostatecznej wiedzy na ich temat jest kilka (i) ich typowe ultra-śladowe stężenia, co sprawia, że oznaczanie ich stężeń jest niezwykle trudne i/lub czasochłonne oraz (ii) dotychczas stosunkowo nieznaczny udział w produkcji przemysłowej. Jednak ten scenariusz zmienia się szybko, a obecne zastosowanie TCE w nowych produktach technologicznych powoduje znaczące zmiany w procesach związanych z ich naturalnym cyklem środowiskowym na powierzchni Ziemi. Na wszystkich etapach cyklu przemian te pierwiastki i ich związki mogą być uwalniane do środowiska i wchodzić w kontakt z biosferą. Szerszy wpływ rosnącego wykorzystania wielu TCE w różnych obszarach środowiska jest słabo poznany; dla kilku TCE w zasadzie nie ma żadnych danych. TCE podlegają znaczącym zmianom w swoim cyklu na powierzchni Ziemi ze względu na ich zwiększone wykorzystanie w różnych zastosowaniach technologicznych. Ich wpływ na cykle biogeochemiczne oraz potencjalne zagrożenia biologiczne i dla zdrowia ludzkiego wymagają dalszych badań (Grandell i in. 2016).

2. Tellur jako LSTCE (less-studied technology-critical elements)

Nb, Ta, Ga, In, Ge i Te należą do dotychczas najmniej poznanych pierwiastków krytycznych i określane są mianem LSTCE (less-studied technology-critical elements). Wiele z tych pierwiastków pełni nieodzowną rolę w określonych produktach np. Ta w kondensatorach lub In w płaskich wyświetlaczach. Zarazem coraz większa powszechność ich zastosowania sprawia, iż pierwiastki te są obecne w wielu materiałach jednocześnie (Filella i Rodríguez-Murillo 2017).

Tellur jest pierwiastkiem rzadkim, występującym w skorupie ziemskiej w śladowych ilościach. Jako pierwiastek krytyczny jest przedmiotem licznych analiz rynkowych w zakresie pozyskiwania surowców. Przewiduje się, że w perspektywie kolejnych lat popyt na tellur będzie prawie trzykrotnie wyższy od jego podaży, głównie ze względu na znaczny wzrost wykorzystania dla potrzeb przemysłu (ok. 10% rocznie). Z uwagi na strategiczny charakter dane na temat telluru rzadko są ujawniane w raportach dotyczących zasobów złóż mineralnych oraz wielkości produkcji.

Produkcja LSTCE istotnie wzrosła dla większości pierwiastków (z wyjątkiem Nb) lecz nadal są one wytwarzane w małych ilościach w porównaniu z produkcją powszechnie używanych metali, które są mierzone w milionach ton rocznie, takich jak Cu lub Zn. Wraz z przeróbką i wydobywaniem LSTCE są uwalniane do środowiska (Nuss i Blengini 2018). Odzyskiwanie TCE z alternatywnych źródeł, takich jak stare odpady lub zanieczyszczone gleby, jest często trudne z inżynierskiego i ekonomicznego punktu widzenia (Mudd i in. 2017).

2.1 Zastosowanie telluru

Tellur jest wykorzystywany w różnych gałęziach przemysłu. Obecnie jest stosowany głównie do produkcji tellurku kadmu (CdTe) używanego w panelach słonecznych, a także w przemyśle metalurgicznym w celu poprawy właściwości mechanicznych stali; przemyśle stopowym z miedzią; przemyśle gumowym w celu poprawy odporności na ciepło. Tellur jest również stosowany do produkcji półprzewodników, i jako katalizator w wielu zastosowaniach przemysłowych

(El-Shahawi i in. 2013). Przemysł fotograficzny i farmaceutyczny również wykorzystuje pewne ilości tego pierwiastka (Kabata-Pendias 2011). Według raportów United States Geological Survey światowa produkcja telluru w 1999 oraz 2017 wynosiła odpowiednio 124 i 410 ton. Dane te nie uwzględniają produkcji w USA. Zatem można sądzić, iż rozwój nowych technologii spowodował ponad 3-krotny wzrost światowej produkcji tego pierwiastka na przestrzeni ostatnich dwudziestu lat.

Ponad 90% tego metalu jest wytwarzana ze szlamów anodowych jako produkt uboczny rafinacji elektrolitycznej Cu, a pozostała część wytwarzana jest w rafineriach ołowiu i z popiołów kominowych oraz gazów powstających podczas wytopiania bizmutu, miedzi oraz rudy ołowiu. Jedynie niewielki (< 1%) procent stanowi tellur pochodzący z recyklingu np. ze złomowanych fotoreceptorów w kopiarkach. Przypuszcza się, że ilość odzyskiwanego telluru będzie stopniowo wzrastać wraz z wykorzystywaniem ogniw słonecznych. Obecnie są to sprzęty stosunkowo nowe i nie uległy one jeszcze zużyciu.

2.2 Naturalne i antropogeniczne źródła telluru

Tellur należy do grupy 16 układu okresowego pierwiastków. Geochemicznie zachowuje się podobnie jak selen, jest związany z minerałami siarczkowymi. Występuje na stopniach utlenienia od +2 do +6 i tworzy mobilne kompleksy jonowe. Tellur podlega silnej sorpcji przez wodorotlenki żelaza i substancję organiczną, dzięki czemu gromadzi się w złożach węgla. Biologiczne procesy metylacji dotyczące arsenu i selenu obejmują również tellur. Bierze on udział w cyklu biogeochemicznym, który obejmuje wyższe rośliny i mikroorganizmy. Tellur jest naturalnie występującym pierwiastkiem znajdującym się w skorupie ziemskiej w ilości 0,001-0,01 ppm. Zwykle jednak występuje jako związek, szczególnie w przypadku rud złota, a następnie srebra, miedzi, ołowiu, rtęci lub bizmutu (Cava-Montesinos i in. 2004). Najbardziej znanymi rudami zawierającymi tellur są rudy złota i srebra, np. kalaweryt (AuTe_2), sylwanit (AgAuTe_4) (Emsley 2002).

Cykle biogeochemiczne telluru w dużej mierze pozostają nieznane. Tak jak w przypadku innych pierwiastków technologicznie krytycznych, dwa powody mogą wyjaśnić dlaczego ten pierwiastek został w dużej mierze zaniedbany: przede wszystkim jego niskie stężenie w przyrodzie i do niedawna ograniczona liczba zastosowań. Obecne zwiększone zainteresowanie badaniem telluru spowodowane jest jego rosnącą popularnością w nowych technologiach.

Największy transfer telluru do środowiska naturalnego zachodzi podczas wydobywania złóż oraz wytopiania i obróbki szlamu anodowego powstającego podczas produkcji miedzi. Zwiększone ryzyko niekontrolowanego przedostawiania się telluru do środowiska następuje także w trakcie produkcji materiałów stosowanych w elektronice oraz podczas produkcji stali, chemikaliów, katalizatorów, gum itp. Z roku na rok wzrasta ilość telluru rozproszona w urządzeniach elektronicznych i termoelektrycznych. Obecnie większość z nich pozostaje w użyciu, jednak w przyszłości spora ilość telluru może zostać uwolniona z tego typu odpadów. Pewna ilość tego pierwiastka dostaje się do środowiska także w materiałach bakterio- i grzybobójczych. Skuteczne zarządzanie odpadami może istotnie ograniczyć utratę telluru i innych metali do środowiska jednak wietrzenie geochemiczne składowisk odpadów np. kopalnianych, może spowodować uwolnienie do środowiska dostępnego telluru. Ponadto ostatnie prace wykazały, że w pobliżu hut miedzi w Kanadzie stężenie telluru w jeziorach wzrosło na przestrzeni lat po otwarciu huty w 1930 r. (Wiklund i in. 2018). Ważne jest, aby przeprowadzono więcej badań empirycznych dotyczących uwalniania telluru i ewentualnego jego dalszego cyklu w środowisku, gdyż w zależności od postaci chemicznej i jej biodostępności, pobieranie i dalszy naturalny cykl telluru jest różny.

2.3 Wpływ telluru na organizmy żywe

Tellur jest rzadkim, stosunkowo mało znanym pierwiastkiem, o nie do końca poznanej biologicznej roli w żywych organizmach. Zasadniczo jest uważany za toksyczny i teratogeny, a toksyczność związków telluru zależy od formy chemicznej i ilości zużytego pierwiastka (Sredni 2012). Wiadomo, że tellur już w niskich stężeniach wywołuje ostrą i przewlekłą toksyczność u różnych organizmów. Niemniej jednak w kilku pracach wykazano, że śladowe ilości telluru są obecne w płynach ustrojowych, takich jak krew i mocz (Goulle i in. 2005). Cohen (1984) wskazał, że w ludzkim ciele jest > 0,5 g Te, przekraczając poziomy wszystkich innych pierwiastków śladowych u ludzi, z wyjątkiem żelaza, cynku i rubidu. Ponadto zaproponowano, że tellur, od dawna uważany

za toksyczny, ostatecznie być może, podobnie jak selen, okaże się pierwiastkiem niezbędnym w żywych organizmach (Chasteen 1993, Markert 1994). Ramadan i in. (1989) odkryli, że tellur jest składnikiem niektórych aminokwasów jak na przykład: tellurocysteina, tellurocystyna i tellurometionina.

W środowisku Te istnieje w nietoksycznej formie elementarnej (Te^0) i w znacznie bardziej powszechnych formach oksyanionowych. Toksyczność Te zależy od formy jonowej: Te(IV) jest o rząd wielkości bardziej toksyczny niż Te(VI) . Tellur(VI) jest mniej stabilny termodynamicznie, ale ma większą abundancję niż Te(IV) (Wojcieszek i in. 2018). Badania na bakteriach wskazują, że związki Te(IV) są bardziej toksyczne niż związki Te(VI) (Basnayake i in. 2001).

Tellur występuje zarówno w związkach nieorganicznych, jak i organicznych. W środowiskach o wysokiej aktywności drobnoustrojów może ulegać biometylacji, a metylowany produkt wykazuje wyraźnie różne poziomy mobilności, biodostępności i toksyczności (Diaz-Bone i in. 2011). Tellur nieorganiczny jest silnym czynnikiem neurotoksycznym, który może powodować wiele różnych dolegliwości, takich jak zaburzenie rozwoju i funkcji mózgu, powodując wodogłowie, hipomyelinację lub demielinizację. Tellur może również wpływać na inne narządy, takie jak nerki i skóra (D'Gregorio i Miller 1988, Taylor 1996).

W środowisku pracy dominuje narażenie inhalacyjne tellurem. Gdy ludzie są narażeni na działanie par telluru i tellurku wodoru, może on powodować podrażnienie dróg oddechowych, prowadząc do zapalenia oskrzeli i zapalenia płuc (Lewis 1996). Narażenie na heksafluorek telluru może prowadzić do zapalenia skóry i niebiesko-czarnych przebarwień skóry. Klasycznym objawem zatrucia tellurem jest niezwykley zapach czosnku, spowodowany wydychaniem organicznych związków telluru, tellurku dimetylu. Wykazano, że organiczne związki telluru mają działanie przeciwnowotworowe i przeciwwirusowe (Sredni 2012), w związku z czym stosowanie organicznych pochodnych telluru, jako środków farmakologicznych, prawdopodobnie wzrośnie w najbliższej przyszłości. Małe ilości organicznych związków telluru mogą być również wchłaniane przez skórę.

Żywność (np. mięso, nabiał i zboża) jest głównym źródłem narażenia na tellur w populacji ogólnej. Niektóre warzywa gromadzą Te (Groth i in. 1976), a ze względu na związek chemiczny między Te i Se lub Te i S, tellur wypiera te dwa pierwiastki i hamuje ich aktywność biologiczną (Cava-Montesinos i in. 2004).

3. Podsumowanie

Tellur ma coraz większe znaczenie technologiczne i obecnie coraz częściej obserwuje się jego podwyższony poziom w środowisku. Oczekuje się, że globalne zapotrzebowanie na Te i inne pierwiastki z grupy LSTCE wzrośnie o setki procent w ciągu najbliższych 20 lat. W przyszłości coraz większe ilości tego pierwiastka będą pochodzić ze zużytych modułów fotowoltaicznych. Oczywiście jest, że pierwiastek ten zostanie uwolniony do środowiska nie jako czysty materiał, ale raczej jako mieszanina z wieloma innymi substancjami (Stepka i in. 2018). Dlatego konieczne jest pełne scharakteryzowanie źródeł tej emisji takich jak na przykład zakłady utylizacji odpadów elektronicznych, zwłaszcza WEEE (odpady sprzętu elektrycznego i elektronicznego). Tego rodzaju informacje o zanieczyszczeniach emitowanych do środowiska przez zakłady unieszkodliwiania odpadów elektronicznych nadal nie są dobrze znane.

Pracę przygotowano w ramach projektu, który otrzymał dofinansowanie z Narodowego Centrum Nauki w Polsce na podstawie decyzji nr UMO-2018/29 / B / ST10 / 01522.

4. Literatura

- Basnayake RST., Bius JH, Akpolat OM i in. (2001). Production of dimethyl telluride and elemental tellurium by bacteria amended with tellurite or tellurate. *Applied Organometallic Chemistry* 15: 499-510.
- Cava-Montesinos P, de la Guardia A, Teutsch C i in. (2004) Speciation of selenium and tellurium in milk by hydride generation atomic fluorescence spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 19: 696–699.

- Chasteen TG (1993) Confusion between dimethyl selenenyl sulfide and dimethyl selenone released by bacteria. *Applied Organometallic Chemistry* 7: 335–342.
- Cobelo-García A, Filella M, Croot P i in. (2015). COST action TD1407: network on technology-critical elements (NOTICE) from environmental processes to human health threats. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(19): 15188–15194.
- Cohen BL (1984) Anomalous behavior of tellurium abundances. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 48: 203–205.
- D'Gregorio REP, Miller RK (1988) Teratogenicity of tellurium dioxide. *Teratology* 37: 307–316.
- Diaz-Bone RA, Raabe M, Awißus S i in. (2011) Investigation of biomethylation of arsenic and tellurium during composting. *Journal of Hazardous Materials* 189(3): 653–659.
- El-Shahawi MS, Al-Saidi HM, Al-Harbi EA i in. (2013) Speciation and Determination of Tellurium in Water, Soil, Sediment and other Environmental Samples. In S. Bakirdere (Ed.), *Speciation Studies in Soil, Sediment and Environmental Samples* (pp. 531–548). London: CRC Press/Taylor & Francis Group.
- Emsley J (2002) *Nature's Building Blocks: An A-Z Guide to the Elements*. New York, USA: Oxford University Press.
- Filella M, Rodríguez-Murillo JC (2017) Less-studied TCE: are their environmental concentrations increasing due to their use in new technologies? *Chemosphere* 182: 605–616.
- Goulle JP, Mahieu L, Castermant J i in. (2005) Metal and metalloid multi-elementary ICP-MS validation in whole blood, plasma, urine and hair. *Forensic Science International* 153: 39–44.
- Grandell L, Lehtil A, Kivinen M, i in. (2016). Role of critical metals in the future markets of clean energy technologies. *Renewable Energy* 95: 53–62.
- Groth DH, Stetler L, Mackay G (1976) Interactions of mercury, cadmium, selenium, tellurium, arsenic and beryllium. In G. F. Nordberg (Ed.), *Effects and Dose Response Relationships of Toxic Metals* (pp. 527–543). Amsterdam: Elsevier Scientific Publishing Company.
- Jarosiński A, Żelazny S, Cholewa M. (2016) Raw materials and Possibilities of their Obtaining in Poland. *Mineral Engineering - Journal of the Polish Mineral Engineering Society* 1: 233–240.
- Kabata-Pendias A (2011) *Trace elements in soils and plants*, 4th ed. Boca Raton London New York: Taylor & Francis Group.
- Lewis RJ (1996) *Sax's dangerous properties of industrial materials* 9th ed. New York: Van Nostrand Reinhold.
- Markert B (1994) The biological system of the elements (BSE) for terrestrial plants (Glycophytes). *Science of the Total Environment* 155: 221–228.
- Mudd GM, Jowitt SM, Werner TT (2017) The world's by-product and critical metal resources part I: Uncertainties, current reporting practices, implications and grounds for optimism. *Ore Geology Reviews* 86: 924–938.
- Nuss P, Blengini GA (2018) Towards better monitoring of technology critical elements in Europe: Coupling of natural and anthropogenic cycles. *Science of the Total Environment*, 613–614: 569–578.
- Ramadan SE, Razak AA, Ragab AM i in. (1989). Incorporation of tellurium into amino acids and proteins in a tellurium-tolerant fungi. *Biological Trace Element Research*, 20: 225–232.
- Sredni B (2012) Immunomodulating tellurium compounds as anti-cancer agents. *Seminars in Cancer Biology*, 22: 60–69.
- Stepka Z, Dror I, Berkowitz B (2018) The effect of nanoparticles and humic acid on technology critical element concentrations in aqueous solutions with soil and sand. *Science of the total Environment*, 610–611: 1083–1091.
- Taylor A (1996) Biochemistry of Tellurium. *Biological Trace Element Research* 55(3):231–9.
- Wiklund, JA, Kirk JL, Muir DCG i in. (2018) Widespread Atmospheric Tellurium Contamination in Industrial and Remote Regions of Canada. *Environmental Science & Technology* 52(11): 6137–6145.
- Wojcieszek J, Szpunar J, Lobinski R (2018) Speciation of technologically critical elements in the environment using chromatography with element and molecule specific detection. *Trends in Analytical Chemistry*, 104: 42–53.

8. Wszechstronny potencjał β -laktoglobuliny w świecie nauki

The comprehensive potential of β -lactoglobulin in the world of science

Gryma-Kowalik Jolanta⁽¹⁾, Pożycka Jadwiga⁽²⁾, Szkudlarek Agnieszka⁽²⁾, Rogóż Wojciech⁽²⁾,
Maciążek-Jurczyk Małgorzata⁽²⁾

⁽¹⁾ Studium Doktoranckie, Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

⁽²⁾ Katedra i Zakład Farmacji Fizycznej, Wydział Nauk Farmaceutycznych
w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Opiekun naukowy: dr hab. n. farm. Małgorzata Maciążek-Jurczyk, profesor SUM

Jolanta Gryma-Kowalik: gryma.jolanta@gmail.com

Słowa kluczowe: białko serwatkowe, β -laktoglobulina, alergia, fluorescencja

Streszczenie

β -laktoglobulina jest głównym białkiem serwatki w mleku przeżuwaczy i wielu innych ssaków. Nie występuje w mleku ludzkim. Stanowi małe, rozpuszczalne białko, które jest niezwykle stabilne wobec kwasów. Zwykle przyjmuje formę dimeru o masie pojedynczej podjednostki 18350 Da. Każdy monomer obejmuje 162 aminokwasy z obecnymi w sekwencji pięcioma cysteinami oraz dwoma mostkami disiarczkowymi. Białko to wiąże ligandy hydrofobowe we wnętrzu β -beczułki. β -laktoglobulina może być nośnikiem wielu związków biologicznie czynnych, w tym witaminy D, retinolu czy kwasów tłuszczowych. Ponadto odgrywa istotną rolę w żywieniu człowieka będąc bogatym i zbilansowanym źródłem aminokwasów, przy czym zachowuje działanie alergizujące. Wykazuje aktywność antyoksydacyjną, przeciwnowotworową oraz przeciwwirusową. W świecie nauki β -laktoglobulina pozostaje wciąż częstym obiektem badań wielu naukowców dostarczając coraz to nowych i ważnych informacji dotyczących jej struktury i funkcji.

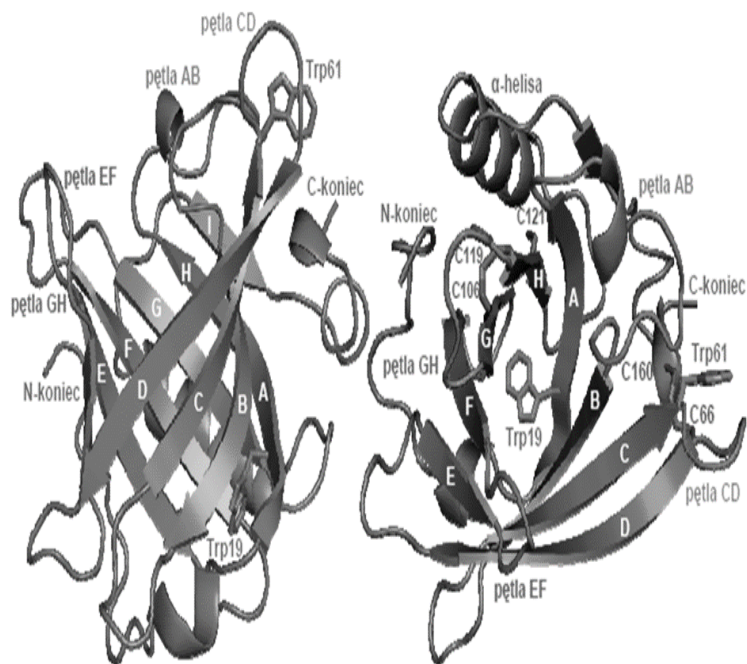
1. Wstęp

W żywieniu człowieka powszechnie cenione są białka serwatkowe ze względu na swoje bogate właściwości funkcyjne i odżywcze (Górska i in. 2011). Laktoglobuliny są niewielkimi globularnymi białkami występującymi we frakcji serwatkowej mleka (Nicolai i in. 2011). Wykazano obecność tych białek zarówno w mleku przeżuwaczy, jak i nie przeżuwaczy, między innymi u świni, konia, kangura, osła, psa czy kota, przy czym nie stwierdzono jego endogennej formy w mleku ludzkim (Radzik-Rant i in. 2014). W większości są reprezentowane przez α -laktoalbuminę (α -LA) i β -laktoglobulinę (β -LG). Zawartość β -laktoglobuliny w mleku wynosi 2-4 g/L, co stanowi ~10% wszystkich białek mleka i w przybliżeniu 50-55% białek serwatkowych (Nicolai i in. 2011). β -LG jest jedną z najszerzej badanych białek w historii proteomiki. Jej obfitość w mleku krowim sprawia, że jest ona łatwo dostępna dla badaczy. Badania z użyciem β -LG rozpoczęły się w pierwszej połowie XX wieku i trwają do dziś, dostarczając coraz to nowych i ważnych informacji dotyczących jej struktury i funkcji (Sakurai i in. 2009).

2. Struktura i właściwości β -laktoglobuliny

β -LG została wyizolowana z mleka krowiego w 1934 roku przez A. H. Palmera (Sawyer i Kontopidis 2000). Struktura dimerycznego białka została określona przy udziale metody magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR), natomiast struktura 3D przez dyfrakcję rentgenowską (Sakurai i in. 2009; Jylhä i in. 2009). β -LG jest białkiem należącym do rodziny lipokalin. Białka z rodziny lipokalin, awidyn oraz białka wiążące kwasy tłuszczowe zaliczono wspólnie do dużej rodziny białek – kalcyn (Sakurai i in. 2009). Lipokaliny to białka wiążące ligandy hydrofobowe we wnętrzu beczułki (Kontopidis i in. 2002). Ich głównym elementem strukturalnym jest β -beczułka/kielich, która stanowi sztywne rusztowanie dla cząsteczki i jest regulowana przy udziale ruchomych pętli. Struktura trzeciorzędowa β -LG jest zdominowana przez β -beczułkę (Wilde i in.

2016). Monomer β -LG jest zbudowany ze 162 reszt aminokwasowych, którego masa pojedynczego łańcucha polipeptydowego wynosi blisko 18300 Da (Kontopidis, Holt i Sawyer 2002). W sekwencji β -LG znajduje się pięć reszt cysteinyłowych (Cys) w pozycjach 66, 106, 119, 121 i 160. Cztery reszty cysteinyłowe zaangażowane są w powstawanie dwóch mostków disiarczkowych w pozycji Cys 66 i Cys 160 oraz Cys 106 i Cys 119 (Kanakis i in. 2011). Jedna wolna grupa tiolowa Cys w pozycji 121 wykazuje aktywność zależną od pH oraz odgrywa rolę w agregacji i denaturacji białka (Sakurai i in. 2009, Wilde i in. 2016; Kanakis i in. 2011). W cząsteczce białka obecne są również dwie reszty tryptofanyłowe (Trp). Reszta Trp w pozycji 19 jest ukryta w rdzeniu białka w pętli A, a reszta Trp w miejscu 61 znajduje się na pętli CD (Sakurai i in. 2009). Ważną rolę odżywczą odgrywają znaczne ilości dziewięciu reszt aminokwasowych (Leu, Ile, Val, Phe, Thr, Met, Trp, Lys i His), które są niezbędne dla zdrowia i zachowania tkanki ludzkiej (Shafaei i in. 2017). Wtórna struktura β -LG składa się z dziewięciu β -nici i jednej α -helisy (Rys.1). Ośmioniciowy antyrównoległy arkusz β , który został przedzielony na dwa przeciwległe elementy powstałe z β -nici, oznaczone kolejno A-H i E-H, tworzy β -beczułkę. Dziewiąta nić I odgrywa kluczową rolę w tworzeniu oraz w interakcjach dimeru i jest umieszczona poza beczułką. Wnętrze β -beczułki jest hydrofobowe i działa jako główne miejsce wiązania hydrofobowych ligandów. Połączenie między β -nićmi A-H β -LG jest tworzone przez siedem pętli, które są znane jako AB, BC, CD, DE, EF, FG i GH. Odpowiednio pętle BC, DE i FG są krótkie i znajdują się na zamkniętym końcu β -beczułki. Natomiast pętle AB, CD, EF i GH są dłuższe, a także bardziej elastyczne oraz otaczają β -beczułkę (Sakurai i in. 2009; Wilde i in. 2016; Kanakis i in. 2011). W zależności od wartości pH, konformacja ruchomej pętli EF reguluje dostęp do beczułki poprzez jej otwieranie bądź zamykanie. Na część odkrywczy, zjawisko odwracalnej modyfikacji konformacji pętli EF zależne od pH zostało nazwane przejściem Tanforda. W pobliżu fizjologicznego pH zachodzi przejście Tanforda wywołane protonowaniem grupy karboksylowej reszty kwasu glutaminowego w pozycji 89 o pKa równym 7.5 (Sawyer i Kontopidis 2000; Brownlow i in. 1997). Struktura drugorzędowa β -LG składa się z 15% α -helisy, 50% β -kartki i 15-20% odwrotnego β -zwrotu (Brownlow i in. 1997). Natomiast czwartorzędową strukturę β -LG tworzą dimery bądź monomery, z przewagą w fizjologicznym pH formy dimerycznej (Shafaei i in. 2017).



Rys. 1. Struktura przestrzenna wołowej β -laktoglobuliny (PDB ID: 3NPO).

W mleku krowim istnieją różne genetyczne warianty β -laktoglobuliny rozróżniane na podstawie odmiennych wartości punktu izoelektrycznego. Najpowszechniejsze są izoformy A i B.

Różnica między nimi dotyczy zamiany sekwencji aminokwasowej z kwasu asparaginowego na glicynę w pozycji 64 oraz z waliny na alaninę w miejscu 118. Ponadto odmiany A i B różnią się minimalnie rozpuszczalnością w wodzie, stabilnością cieplną i zdolnością do asocjacji. Wariant A wydaje się być mniej stabilny od wariantu B, ale dla mniej stężonego roztworu β -LG to wariant B może być mniej stabilny (Brownlow i in. 1997). Temperatura, pH środowiska, stężenie białka, rodzaj buforu oraz siła jonowa roztworu decyduje o tworzeniu się różnych form oligomerycznych β -LG. Punkt izoelektryczny (pI) β -LG wynosi ok. 5.2. Natywną strukturę β -LG zachowuje w szerokim zakresie pH. W temperaturze otoczenia, przy braku soli oraz przy pH poniżej 3.5 bądź powyżej 7.5 białko to przyjmuje formę monomeryczną. Natomiast w przedziale pH 3.5 a 5.2 β -LG tworzy odwracalną postać tetramerów lub oktamerów. W fizjologicznym pH β -LG przyjmuje postać dimeru czyli dwóch identycznych podjednostek (Górska, Ostrowska-Ligęza i Wirkowska 2011; Shafaei i in. 2017). Białko ulega nieodwracalnej denaturacji przy pH powyżej 9.0 lub temperaturze powyżej 80°C (Liang i Subirade 2012). Ponadto β -LG jest bardzo stabilna przy niskim pH i odporna na degradację pepsyną i pozostaje w nienaruszonej postaci podczas przejścia przez żołądek (Górska, Ostrowska-Ligęza i Wirkowska 2011; Sakurai i in. 2009). Fizjologiczna rola β -LG nie została wciąż jednoznacznie określona. Badania potwierdzają, że β -LG może być nośnikiem retinolu, witaminy D, kwasów tłuszczowych, trójglicerydów i cholesterolu (Radzik-Rant i in. 2014). Przypuszcza się również, że białko to pełni istotną funkcję w przekazywaniu biernej odporności noworodkowi, regulacji metabolizmu fosforu w gruczole mlekowym oraz sprzyja łatwiejszemu trawieniu tłuszczu w mleku poprzez wiązanie wolnych kwasów tłuszczowych. Odpowiada za antyoksydacyjne właściwości mleka, gdyż jest cennym źródłem Cys, przyczyniając się do powstawania glutationu. Również istotną rolą β -LG jest aktywność przeciwnowotworowa, związana z obecnością znacznej ilości aminokwasów siarkowych, w tym Met, która ma pozytywny wpływ na stabilność DNA. Niewykluczone, że β -LG utraciła pierwotne funkcje w ciągu ewolucji (Górska, Ostrowska-Ligęza i Wirkowska 2011; Radzik-Rant i in. 2014). Nadwrażliwość na białka mleka krowiego jest najczęściej występującą postacią alergii pokarmowej u dzieci (Jylhä i in. 2009). Mleko krowie stanowi mieszaninę wielu białek. Szczególną postacią alergizującą mają α - i β -kazeiny, α -LA, β -LG i albumina surowicza. Organizm ludzki nie wytwarza białka o homologicznej budowie do β -LG. Ze względu na dużą odporność β -LG na kwaśną hydrolizę i działanie proteaz w układzie pokarmowym, może dochodzić do wchłaniania dużych fragmentów, a nawet całych cząsteczek tego białka w jelicie cienkim i przedostawania się do mleka kobiecego (Hozyasz i in. 2004). β -LG jest białkiem termostabilnym, więc ogrzewanie nie zmniejsza siły uczulającej. Ponadto badania potwierdzają, że β -LG jest głównym i najczęstszym alergenem w mleku krowim. Nie zaleca się podawania mleka koziego, owczego oraz od innych ssaków dzieciom uczulonym na białka mleka, ze względu na duże podobieństwo antygenowe frakcji białkowych obecnych w mleku krowim, kozim oraz owczym (Szumera i Tułowiecka 1993).

3. Kompleksy β -laktoglobuliny z ligandami oraz ich miejsca wiązania w cząsteczce

Jedną z najcenniejszych właściwości β -LG jest powinowactwo do szeregu związków bioaktywnych. β -LG należąc do białek z rodziny lipokalin może wiązać ligandy we wnętrzu β -beczułki, która stanowi centralne miejsce wiązania ligandów. Hydrofobowe związki są połączone z dużym powinowactwem, lecz niską specyficznością z β -LG (Kontopidis, Holt i Sawyer 2002). Zastosowanie różnorodnych dostępnych technik, takich jak spektrofлуorymetria, spektrometria mas, HPLC, kolorymetria, dializa równowagowa czy spektroskopia EPR i NMR umożliwiły przeprowadzenie badań i określenie miejsc wiązania bioaktywnych związków w strukturze przestrzennej β -LG (Sawyer i in. 1998). Wykonano badania z udziałem retinolu, kwasu retinowego, karotenoidów (Kontopidis, Holt i Sawyer 2002), kwasu palmitynowego, kwasu stearynowego, witaminy D, cholesterolu, trójglicerydów (Kontopidis, Holt i Sawyer 2002, Sawyer i in. 1998), α -tokoferolu, kwasu foliowego, polifenoli – stosując ekstrakty z owoców, kawy, herbaty i kakao (Liang i Subirade 2012). Ponadto badano oddziaływanie β -LG z lekami, w tym z eliptycyną (Dodin, Andrieux i Kabbani 1990) oraz norfloksacyną (Bijan i in. 2014). Wszelkie dotychczasowe badania niosą nadzieje na możliwość zastosowania β -LG jako nośnika związków o określonych

właściwościach, w tym leków przeciwnowotworowych bądź przeciwwirusowych (Dodin i in. 1990; Bijan i in. 2014). Wykrycie receptorów w jelicie cieląt dla kompleksu β -LG–retinol pozwala przypuszczać, że β -LG może brać czynny udział w wiązaniu i transportowaniu witaminy A, jednocześnie zwiększając jej wchłanianie w jelicie cienkim (Górska, Ostrowska-Ligęza i Wirkowska 2011; Dodin i in. 1990). Zauważono, że im większy udział struktury α -helikalnej i mniejszy udział struktury pofałdowanej kartki, tym mniejsza jest tendencja do łączenia się z hydrofobowymi cząsteczkami (Górska in. 2011). Istnieją co najmniej trzy niezależne miejsca wiążące ligandy w zależności od ich właściwości do struktury przestrzennej β -LG (Wilde i in. 2016; Sawyer i in. 1998). Badania wskazują na zbliżoną strukturę i konformację β -LG z ludzkim białkiem wiążącym retinol (RBP), stąd też ligandy są wiązane we wnętrzu kielicha utworzonego przez β -beczułkę. Wiązanie z β -LG chroni retinol przed degradacją przez ciepło, utlenianie i promieniowanie (Górska i in. 2011; Zhang i in. 2014). Ponadto odnotowano interakcje lipofilowej witaminy D z dwoma miejscami β -LG. Jednym w hydrofobowej beczułce, a drugim w pobliżu powierzchni na C-końcu pomiędzy resztami w pozycji 136 a 149 zawartej w części α -helisy i β -nitki. β -LG może w ten sposób stać się lepszym nośnikiem witaminy D niż witaminy A. Jednakże wiązanie kwasów tłuszczowych, takich jak kwas palmitynowy bądź kwas stearynowy, wynika z tworzenia się na zewnętrznej powierzchni długiej, hydrofobowej szczeliny między trzecim zwrotem α -helisy a powierzchnią β -beczułki β -LG (Sawyer i in. 1998). Trzecim miejscem wiązania ligandów jest zewnętrzna hydrofobowa powierzchnia β -LG – kieszeń w rowku między spiralą a β -beczułką w pobliżu reszt Trp 19 i Arg 124 (Zhang i in. 2014). To miejsce jest wystarczająco duże, aby pomieścić większe ligandy, takie jak eliptycyna, a nawet protoporfiryna (Liang i Subirade 2012; Sawyer i in. 1998). Zarówno wiązanie wodorowe, jak i oddziaływania van der Waalsa odgrywają ważną rolę w procesie wiązania. Potencjał β -LG może w przyszłości posłużyć jako skuteczny nośnik związków farmaceutycznych lub nutraceutycznych (Liang i Subirade 2012). Divsalar i in. (Shafaei i in. 2017) zbadali interakcje szeregu kompleksów Pd^{2+} i Pt^{2+} z β -LG, w którym białko może pełnić rolę skutecznego wektora dla leków przeciwnowotworowych bez istotnych zmian w swojej strukturze po interakcji z kompleksami metali. Transport nowych związków przeciwcukrzycowych do jelita cienkiego został zbadany przez Mehrabana i in. (Shafaei i in. 2017). Ich wyniki pokazały, że β -LG może być w stanie odegrać rolę nośnika dla nowych związków przeciwcukrzycowych (Shafaei i in. 2017).

4. Fluorescencja β -laktoglobuliny

W strukturze β -LG obecne są dwie reszty tryptofanowe: Trp 19 i Trp 61, które są zlokalizowane w różnych środowiskach oraz cztery reszty tyrozynowe: Tyr 20, Tyr 42, Tyr 99 i Tyr 102. Reszta Trp 19 znajduje się na terenie rdzenia proteinowego o właściwościach hydrofobowych, w dolnej części kieszeni wiążącej, blisko Lys 70, która jest uważana za jedno ze specyficznych miejsc wiążących obecnych w łańcuchu białkowym. Druga reszta Trp 61 jest umieszczona na zewnętrznej powierzchni, w pobliżu kieszeni β -LG, przy końcu β -nici C i w bliskim kontakcie z dwoma silnymi wygaszaczami: resztą asparaginylową i mostkiem disiarczkowym w pozycji Cys 66 - Cys 160 (Sawyer i Kontopidis 2000; Albani i in. 2014). Przypuszcza się, że znaczna część wewnętrznej intensywności fluorescencji β -LG pochodzi od reszty Trp w pozycji 19. Reszta Trp 61 nie przyczynia się do fluorescencji białka (Shafaei i in. 2017). Rentgenowskie badania Brownlow i in. (Brownlow i in. 1997) udowodniły, że reszta Trp 19 znajdująca się na dnie hydrofobowej kieszeni, przed zagięciem β -nici A, przy Leu 22 jest całkowicie schowana we wnętrzu beczułki i zasadniczo niedostępna dla rozpuszczalnika. Natomiast reszta Trp 61 pozostaje odsłonięta i wystawiona na działanie rozpuszczalnika w natywnej strukturze, co czyni ją przydatną dla sond oraz monitorowania zmian konformacyjnych specyficznych dla miejsca. Obserwowane wygaszanie fluorescencji pochodzące od reszty Trp 19 może być wyjaśnione przez przestrzennie przyległą resztę Arg 124, która jest idealnie umieszczona, aby gasić sygnał fluorescencji (Sakurai i in. 2009; Brownlow i in. 1997). Z kolei badania Townend i in. (Townend 1969) wykazały, że jedna z reszt Trp jest całkowicie eksponowana, a druga reszta schowana we wnętrzu β -beczułki. Nie wykluczone, że obie są częściowo wbudowane w wewnętrzną cząsteczkę białka (Townend 1969). Obecna w łańcuchu białkowym tyrozyna praktycznie nie absorbuje długość fali 295 nm, a więc w celu uniknięcia jej wzbudzenia, należy tą długością fali pobudzić do fluorescencji białko i otrzymany sygnał fluorescencyjny

pochodzi wówczas od reszt tryptofanowych Trp (Albani i in. 2014). Miareczkowanie tetranitrometanem czterech reszt tyrozylowych: Tyr 20, Tyr 42, Tyr 99, Tyr 102 udowadnia, że dwie reszty Tyr są niecałkowicie eksponowane do rozpuszczalnika. Kolejne dwie reszty są schowane we wnętrzu trójwymiarowej struktury z tym, że jedna po częściowej denaturacji uzyskuje dostęp do rozpuszczalnika. Z kolei badania rentgenograficzne wskazują, że reszta Tyr 42 jest schowana całkowicie, a Tyr 102 tylko częściowo. Reszta Tyr 20 znajduje się blisko dna postulowanej kieszeni wiążącej, z kolei reszta Tyr 99 umiejscowiona jest w zewnętrznej pętli FG. Obie są eksponowane do rozpuszczalnika z tym, że reszta Tyr 20 bardziej (Brownlow i in. 1997).

5. Podsumowanie

Bogate właściwości funkcyjne i odżywcze białek serwatkowych są powszechnie cenione i wykorzystywane w żywieniu człowieka. Fizjologiczna rola β -LG nie została wciąż jednoznacznie określona przez naukowców. β -LG oddziałuje z wieloma związkami pochodzenia naturalnego i syntetycznego. Wiele ośrodków badawczych podejmuje coraz to nowe badania z udziałem β -LG. Obecność w strukturze reszt tyrozylowych i tryptofanowych umożliwia eksplorację oddziaływania białka z ligandem oraz określenie miejsca wiązania badanej substancji w strukturze przestrzennej β -LG. Biorąc pod uwagę szeroką bazę technik fizykochemicznych, w tym spektroskopii, spektrofluorymetrii, spektroskopii mas, EPR czy NMR, kolorymetrii i chromatografii, zastosowanie ich w badaniach białek serwatkowych rodzi wiele możliwości na pogłębienie dotychczasowych wyników badań.

6. Literatura

- Albani JR, Vogelaer J, Bretesche L et al. (2014) Tryptophan 19 residue is the origin of bovine β -lactoglobulin fluorescence. *J Pharmaceut Biomed* 91: 144-150.
- Bijan KP, Ghosh N, Mukherjee S (2014) Binding interaction of a prospective chemotherapeutic antibacterial drug with β -lactoglobulin: Results and challenges. *Langmuir* 30: 5921-5929.
- Brownlow S, Morais Cabral JH, Cooper R et al. (1997) Bovine β -lactoglobulin at 1.8 Å resolution - still an enigmatic lipocalin. *Structure* 5: 481-495.
- Dodin G, Andrieux M, Kabbani H (1990) Binding of ellipticine to β -lactoglobulin. A physicochemical study of the specific interaction of an antitumor drug with a transport protein. *Eur. J. Biochem* 193: 697-700.
- Górska A, Ostrowska-Ligeża E, Wirkowska M (2011) β -laktoglobulina – potencjalny nośnik witaminy D. *Bromat. Chem. Toksykol.* XLIV(3): 535-538.
- Hozyasz KK, Ambroszkiewicz J, Gajewska J (2004) Zawartość beta-laktoglobuliny w mieszkankach mlecznych dla niemowląt. *Lek. Wojsk.* 80(1): 24-26.
- Jylhä S, Mäkinen-Kiljunen S, Haahtela T et al. (2009) Selection of recombinant IgE antibodies binding the beta-lactoglobulin allergen in a conformation-dependent manner. *J Immunol Methods* 350(1-2): 63-70.
- Kanakis DD, Hasni I, Bourassa P et al. (2011) Milk β -lactoglobulin complexes with tea polyphenols. *Food Chem* 127: 1046-1055.
- Kontopidis G, Holt C, Sawyer L (2002) The ligand-binding site of bovine β -lactoglobulin: evidence for a function? *J. Mol. Biol.* 318: 1043-1055.
- Liang L, Subirade M (2012) Study of the acid and thermal stability of β -lactoglobulin-ligand complexes using fluorescence quenching *Food Chem* 132: 2023-2029.
- Nicolai T, Britten M, Schmitt C (2011) β -lactoglobulin and WPI aggregates: Formation, structure and applications. *Food Hydrocolloid* 25: 1945-1962.
- Radzik-Rant A, Rozbicka-Wieczorek A, Puppel K i in. (2014) Wpływ wariantów β -laktoglobuliny na skład chemiczny i profil kwasów tłuszczowych mleka maciorek rasy wrzosówka. *Roczniki Naukowe Polskiego Towarzystwa Zootechnicznego* 10(4): 151-158.
- Sakurai K, Konuma T, Yagi M et al. (2009) Structural dynamics and folding of β -lactoglobulin probed by heteronuclear NMR. *Biochim Biophys Acta* 1790: 527-537.

- Sawyer L, Brownlow S, Polikarpov I et al. (1998) β -Lactoglobulin: Structural studies, biological clues. *Int. Dairy J* 8: 65-72.
- Sawyer L, Kontopidis G (2000) The core lipocalin, bovine beta-lactoglobulin. *Biochim Biophys Acta* 1482: 136-148.
- Shafaei Z, Ghalandari B, Vaseghi A et al. (2017) β -Lactoglobulin: An efficient nanocarrier for advanced delivery systems. *Nanomed-Nanotechnol* 13: 1685-1692.
- Szumera B, Tułowiecka E (1993). Badania nad alergią na mleko krowie u niemowląt i małych dzieci. *Probl. Lek.* 32(3/4): 414-421.
- Townend et al. (1969) The state of amino acid residues in β -lactoglobulin. *Arch. Biochem. Biophys* 129: 567-580.
- Wilde SK, Keppler JK, Palani K (2016) β -Lactoglobulin as nanotransporter - Part I: Binding of organosulfur compounds. *Food Chem* 197: 1015-1021.
- Zhang J, Liu X, Subirade M (2014) A study of multi-ligand beta-lactoglobulin complex formation. *Food Chem* 165: 256-261.

9. Wybrane metody ekstrakcji w układzie ciało stałe–ciecz i ciecz-ciało stałe – podstawy teoretyczne oraz przykładowe zastosowanie w świetle współczesnych badań naukowych

Chosen methods of extraction in the solid-liquid and liquid-solid systems - theoretical foundations and an example of application within modern approach in scientific researches

Maciej Poznań⁽¹⁾, Kamila Kasprzak-Drozd⁽²⁾, Anna Oniszczyk⁽²⁾

⁽¹⁾Studenckie Koło Naukowe przy Zakładzie Chemii Nieorganicznej Katedry Chemii, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

⁽²⁾Zakład Chemii Nieorganicznej Katedry Chemii, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

Opiekun naukowy: dr hab. n. farm. Anna Oniszczyk, prof. UM

Poznań Maciej: maciej.jan.poznan@gmail.com

Słowa kluczowe: SPE, aparat Soxhleta, USAE

Streszczenie

Problemem analiz bywa dobór odpowiedniej metody ekstrakcji. Praca ma na celu przedstawienie podstaw teoretycznych dla procesu rozdziału substancji w układach ciało stałe-ciecz oraz ciecz-ciało stałe. Opisano podstawy teoretyczne oraz praktyczne aspekty zastosowania technik, takich jak ekstrakcja wspomagana ultradźwiękami, z wykorzystaniem aparatu Soxhleta i ekstrakcji do fazy stałej. Przytoczono literaturowe przykłady zastosowania tych metod.

1. Wstęp

Wybór i optymalizacja efektywnej metody rozdzielczej, która pozwoli uzyskać z mieszaniny ciał stałych lub cieczy pożądany związek chemiczny bądź grupę związków, jest ważnym elementem procesów analitycznych, a także przemysłowych w dziedzinach takich jak chemia, farmacja, czy biotechnologia. Najbardziej czasochłonnym etapem analizy próbek jest ich przygotowanie, włączając etap ekstrakcji (łac. *extraho* – wyciągam) oraz oczyszczanie surowych ekstraktów. W metodach ekstrakcyjnych wykorzystuje się wybiórcze przemieszczanie wybranego składnika mieszaniny między fazami.

Ciała stałe, a wśród nich materiały roślinne stanowią wyzwanie dla ekstrakcji w układzie ciało stałe-ciecz, ponieważ istnieje bardzo duże prawdopodobieństwo, iż rozpuszczalnik nie przeniknie całkowicie do matrycy organicznej. Proces ten zależy przede wszystkim od właściwości rozpuszczalnika, struktury materiału roślinnego oraz właściwości chemicznych pożądanych związków zawartych w ciele stałym. W celu zwiększenia powierzchni kontaktu rozpuszczalnika z ciałem stałym, a co za tym idzie, także zwiększenia wydajności ekstrakcji zwykle uprzednio stosuje się suszenie, mielenie, homogenizację oraz przesiewanie materiału roślinnego. Ekstrakcję w układzie ciało stałe-ciecz reprezentują niżej opisane przykładowe metody z wykorzystaniem aparatu Soxhleta oraz fal ultradźwiękowych (Poole 2020).

Inaczej jest w sytuacji, gdy metoda wymaga przemieszczenia docelowych substancji z fazy ciekłej do fazy stałej. Analiza w takim przypadku polega na przeniesieniu cząsteczek analitu do stałego sorbentu, który stanowi określone złoże. Do głównych celów ekstrakcji w układzie ciecz-ciało stałe należy: izolacja, zateżnianie analitu oraz zmiana nośnika substancji (Poole 2016).

2. Opis zagadnienia (Podstawy teoretyczne)

Skutkiem prawidłowo przeprowadzonego procesu ekstrakcji jest rozdzielenie substancji rozproszonych w mieszaninie. Podstawą tego działania jest zastosowanie różnic w rozpuszczalności substancji zawartych w materiale badawczym. Dochodzi wówczas do ustalenia równowagi podziału substancji między dwiema fazami. Do głównych cech określających stopień podziału związku między

dwie fazy należy polarność zarówno docelowego związku, jak i rozpuszczalnika oraz zdolność do wytwarzania wiązań wodorowych i innych oddziaływań elektrostatycznych (Kealey i Haines 2006).

W przypadku ekstrakcji rozpuszczalnikowej wykorzystuje się prawo podziału Nernsta, które mówi, iż w stałych warunkach temperatury oraz ciśnienia określony związek ulega podziałowi między dwie fazy zawsze w tym samym stosunku. Rozwinięciem tego prawa jest pojęcie stałej podziału (K_D) oraz stosunku podziału (D). Stosunek podziału (D) wyraża proporcję stężeń równowagowych określonej substancji w dwóch fazach. Rozpatrując przypadek rozpuszczenia substancji w dwóch fazach – wodnej oraz organicznej, wzór przyjmując następującą postać:

$$D = \frac{[CX]_{org}}{[CX]_{aq}}$$

gdzie $[C_X]$ stanowi stężenie związku chemicznego „X” występującego we wszystkich postaciach, niezależnie od zjawisk dysocjacji, czy kompleksowania.

Pojęcie stosunku podziału (D), jak i sam wzór można dopasować do ekstrakcji w układzie ciecz-ciało stałe. Wówczas taki proces reprezentuje poniższy wzór:

$$D = \frac{[CX]_{sorb}}{[CX]_{ciecz}}$$

Różnica polega na tym, iż w liczniku podanego ułamka przedstawione jest stężenie związku w podłożu stałym (sorbencie), zaś w mianowniku stężenie w fazie ciekłej (Kealey i Haines 2006).

2.1 Ekstrakcja w aparacie Soxhleta (ang. SE - Soxhlet Extraction)

Ekstrakcja typu ciało stałe-ciecz wykorzystuje rozpuszczalnik pozwalający wyekstrahować substancję z fazy stałej (np. tłuszcze z nasion roślin oleistych). Powszechnie znanym urządzeniem do tego rodzaju rozdziału substancji jest aparat Soxhleta. W gilzie znajduje się ciało stałe (np. materiał roślinny), zaś w kolbie okrągłodennej rozpuszczalnik. Po doprowadzeniu do wrzenia skrapla się on w chłodnicy i spływa do gilzy. Ekstrakt po przekroczeniu określonej objętości spływa do kolby zawierającej podgrzewany rozpuszczalnik. Ekstrakcję wykonuje się wielokrotnie, aż uzyska się odpowiednią ilość pożądanej substancji (Kocjan i in. 2002).

Wybór tej metody jest polecany w przypadku, gdy korzysta się z ekstrahentów o niskiej lepkości oraz gdy związek ekstrahowany charakteryzuje się niższą prężnością pary uwzględniając przy tym temperaturę wrzenia rozpuszczalnika (Poole 2020).

Powyżej opisany typ rozdziału substancji jest powszechnie stosowany od ponad wieku i stanowi dzisiaj przeważnie metodę porównawczą, do której odnosi się skuteczność nowoczesnych metod ługowania. Ponadto, w celu optymalizacji wydajności oraz czasu pracy aparat Soxhleta może być poddawany modyfikacjom, takim jak: automatyzacja oraz przyłączenie generatora ultradźwięków (US) lub mikrofal (MW).

Do zalet SE należą m.in. ciągłe przemywanie materiału stałego kolejnymi porcjami czystego rozpuszczalnika, utrzymanie względnie wysokiej temperatury układu, a także, z ekonomicznego punktu widzenia - stosunkowo niska cena podstawowych elementów aparatu. Główną wadą metody jest względnie długi czas procesu oraz ryzyko termicznego rozkładu związków termolabilnych (López-Bascón, Luque de Castro 2020).

2.2 Ekstrakcja wspomagana ultradźwiękami (ang. UAE, USAE – Ultrasound-Assisted Extraction)

Metoda ekstrakcji wspomaganej ultradźwiękami polega na umieszczeniu próbki (substancja stała) w cieczy, którą następnie poddaje się działaniu fal ultradźwiękowych. Ultradźwięki są falami sprężystymi o częstotliwościach większych niż fale słyszalne - czyli powyżej 16kHz. Do procesu ekstrakcji wykorzystuje się częstotliwości od 20 kHz do 500 kHz. Ponadto, dane warunki fizyczne wywołują procesy wspomagające proces rozdziału, m.in. przez zjawisko kawitacji oraz wytwarzanie energii cieplnej (Wilga 2008).

Kawitacja jest zjawiskiem działania fal ultradźwiękowych w wodzie, wskutek czego powstają szeregi fal ciśnienia, które następnie prowadzą do cyklu tworzenia i rozkładu pęcherzyków w cieczy. Pęcherzyki te ulegają implozji, przyspieszając zderzenia międzycząsteczkowe w układzie, a co za tym idzie, rozbijając cząstki ciała stałego i zwiększając powierzchnię kontaktu z ekstrahentem. Następuje miejscowy wzrost temperatury oraz zmiany ciśnienia w układzie. W związku z tym, że

wzrost temperatury nie jest wysoki i ma charakter lokalny, metoda ta jest powszechnie stosowana w ekstrakcji związków termolabilnych (Poole 2020).

W porównaniu z SE jest to metoda szybsza, często zużywająca mniejsze ilości rozpuszczalnika i mniej skomplikowana. Ponadto koszt techniki jest względnie niski, niestety częściowy rozkład analitu może być istotną wadą użycia tej metody (Poole 2020; Wilga 2008). Innym utrudnieniem jest konieczność oddzielenia stałej pozostałości od ekstraktu. Zazwyczaj stosuje się płukanie pozostałości w celu zwiększenia wydajności procesu, co wydłuża czas przetwarzania próbki (Poole 2020).

2.3 Ekstrakcja do fazy stałej (ang. SPE - *Solid Phase Extraction*)

Prawdopodobnie pierwsze zastosowanie ekstrakcji do fazy stałej miało miejsce w latach 50. XX wieku, gdy użyto kolumn wypełnionych węglem drzewnym w celu izolacji zanieczyszczeń z wód powierzchniowych i oceny ich toksyczności. Trwający wówczas kilka dni proces pobierania próbek zawierających bardzo duże objętości wody (ponad 1000 l) wykluczał zastosowanie ekstrakcji w układzie ciecz-ciecz (Poole 2016).

Metoda ta polega na działaniu o odwrotnym kierunku niż w przypadku dwóch wyżej opisanych rodzajów ekstrakcji tj. badana substancja przemieszcza się z fazy ciekłej do fazy stałej w tzw. kolumnie ekstrakcyjnej. W ekstrakcji do fazy stałej stosowane są kolumny, wypełnione sorbentami, których poszczególne rodzaje omówiono poniżej. SPE umożliwia zateżnienie próbek z dużych objętości, oczyszczanie z zanieczyszczeń i usuwanie matrycy. Zaadsorbowane lub rozpuszczone składniki wymywa się małymi objętościami rozpuszczalników lub w określonych warunkach termicznych. Otrzymany eluat może być natychmiast poddany analizie lub dalszej obróbce, a kolumnienki po poddaniu regeneracji można stosować wielokrotnie (Kocjan i in. 2002).

Typowe narzędzie do ekstrakcji stanowi nieduża kolumnienka (np. cylindryczna strzykawka) zawierająca sorbent w postaci cząstek o wielkości 50-60 μm upakowany między metalowe lub plastikowe płytki (Poole 2016).

2.4 Rodzaje sorbentów w SPE

Sorbent może występować w postaci specjalnych wkładów bądź krążków. Wkłady zazwyczaj charakteryzują się stosunkowo niższą szybkością przepływu, zaś mała gęstość upakowania wkładów zmusza do korzystania z dłuższych złóż sorbentów, co może prowadzić do adsorpcji niepożądanych składników cieczy (Poole 2016). Krążki prawdopodobnie stanowią lepszy wybór w przypadku ekstrakcji zawiesziny o względnie większych objętościach. Ze uwagi na większą powierzchnię kontaktu i mniejsze spadki ciśnienia podczas pracy, krążki te umożliwiają szybszy przepływ próbki przez kolumnienkę. Współcześnie metoda ta ulega nieustannemu rozwojowi, dzięki czemu na rynku dostępne są mikrodyski, a także specjalne końcówki do pipet (Poole 2016).

Stosowane w tej metodzie sorbenty można podzielić na trzy grupy. Są to tlenki pierwiastków nieorganicznych, sorbenty o niskiej specyficzności oraz specyficzne dla konkretnych związków i grup.

Do pierwszej grupy należą głównie żel krzemionkowy, tlenek glinu, Florisil oraz ziemie okrzemkowe. Powierzchnia sorpcyjna poszczególnych złóż waha się od 150 do 800 m^2/g . Mają zastosowanie w izolacji analitów o niskiej i średniej polarności z roztworów niepolarnych, izolacji kationów i anionów z roztworów wodnych oraz frakcjonowaniu analitu w zależności od liczby i rodzaju grup funkcyjnych zawartych w roztworze (Poole 2016).

Złoża o niskiej specyficzności obejmują żele krzemionkowe modyfikowane grupami chemicznymi, porowate polimery i różnorodne sorbenty węglowe. Modyfikacja grupami dużej struktury przestrzennej, długich łańcuchach alkilowych wspomagają izolację małych cząsteczek, zaś krótsze łańcuchy alkilowe powodują zatrzymywanie cząsteczek o większych wymiarach. Złoża składające się z modyfikowanego żelu krzemionkowego są najczęściej stosowanymi uniwersalnymi sorbentami. Do modyfikowanych żelów krzemowych należą m.in. C_{18} (z przyłączoną grupą oktadecylową), C_2 (grupa etylowa), CN (grupa cyjanopropylowa), NH_2 (grupa aminopropylowa), czy CH (grupa cykloheksylowa). Najczęściej spotykanymi formami węgla stosowanymi w SPE są węgiel aktywny, grafitowana sadza oraz węglowe sita molekularne. Innymi postaciami węgla spotykanymi w tej metodzie ekstrakcji są nanorurki, grafen i nanodiamenty. Ich zastosowanie w SPE jest w dużej

mierze ograniczone do izolacji rozpuszczonych związków organicznych w wodach powierzchniowych oraz do pomiarów czystości powietrza w zakładach pracy (Poole 2016).

Złoża specyficzne dla określonych związków chemicznych oparte są na wymianie jonowej, chelatacji, biopowinowactwie i ograniczonym dostępie stosowane są w celu osiągnięcia wysokiej selektywności w procesie ekstrakcji. Wymieniacze jonowe są używane do izolowania związków ulegających dysocjacji jonowej w roztworach wodnych. Zawierają one przeciwny ładunek względem docelowych jonów zawartych w analizie. Wśród nich istnieją także sorbenty złożone zawierające grupy alkilowe i zarazem będące jonitami, co pozwala na precyzyjną izolację leków, narkotyków (m.in. amfetamina, barbiturany) i ich metabolitów w laboratoriach klinicznych i farmaceutycznych (Poole 2016).

3. Przegląd literatury – zastosowanie opisanych metod ekstrakcji w praktyce

3.1 Zastosowanie opisanych metod ekstrakcji w fitochemii

Opracowanie nowych metod ekstrakcji oraz ich modyfikacje służą głównie polepszeniu selektywności, efektywności oraz skróceniu czasu trwania procesu, jednak nie wszystkie metody nadają się w takim samym stopniu do przeprowadzenia rozdziału takich samych substancji. W rozwiązaniu tego problemu i wyciągnięciu odpowiednich wniosków przed zaplanowaniem doświadczenia, a tym samym - dobraniem właściwej metody oraz warunków ekstrakcji, nierzadko pomagają badania porównujące efektywność i przebieg tych procesów.

W jednym z badań prowadzonych przez Oniszczyk i in. (2015) wykorzystano zarówno metody SE i USAE do zmierzenia zawartości furanokumaryn w korzeniach biedrzeńca mniejszego (*Pimpinella saxifraga* L.). Preparaty wytworzone z tej rośliny są wykorzystywane we wspomaganiu trawienia, czy profilaktyce przeciwko kumulacji kamieni nerkowych. Właściwości lecznicze roślina zawdzięcza obecności furanokumaryn. W każdej metodzie do ekstrakcji zastosowano metanol o stężeniu 100% oraz 80%, zaś materiałem poddanym ekstrakcji był proszek z korzeni. Analiza chromatograficzna wykazała, że najbardziej efektywną metodą ekstrakcji dla związków takich jak izopimpinelina, pimpinelina, umbeliferon, bergapten, ksantotoksyna okazała się być SE z 80% MeOH.

Metoda Soxhleta oraz ekstrakcja wspomagana ultradźwiękami są używane także w pozyskiwaniu związków fenolowych z materiałów roślinnych. Caballero-Galván i in. (Caballero-Galván i in. 2018) wykonali eksperyment, w którym wykorzystano obie metody ekstrakcji do otrzymania w/w związków oraz kwasu chlorogenowego z pozostałości po zaparzonej mielonej kawie. Dalszą część analizy przeprowadzono za pomocą HPLC. Wykazano, iż za pomocą aparatu Soxhleta wyekstrahowano większą ilość związków polifenolowych niż metodą USAE. Mimo tego wskazano metodę ultradźwiękową jako bardziej praktyczną oraz wydajną, gdyż tym sposobem w czasie krótszym o 230 minut otrzymano ok. 90% całkowitej liczby polifenoli wyekstrahowanej metodą Soxhleta.

W badaniu ekstrakcji polifenoli oraz tanin z kory sosny kalifornijskiej *Pinus radiata* zauważono, iż oprócz wydajności ilościowej ważny jest także aspekt zachowania pierwotnej bioaktywności ekstrahowanych związków. Jest to znaczące, gdyż związki te mogą tracić aktywność w wyniku działania zbyt wysokiej temperatury lub czynników utleniających podczas ekstrakcji. Przeprowadzono ekstrakcje trzystopniowe. Metodą Soxhleta uzyskano największą ilość ekstraktu głównie w pierwszym etapie ekstrakcji, lecz wymagała ona najwięcej czasu oraz wykorzystano w niej największe ilości ekstrahenta. Z kolei za pomocą USAE z każdym kolejnym etapem otrzymywano większą porcję ekstraktu, polifenoli oraz tanin. Tym samym SE można określić jako metodę stosunkowo długotrwałą i osiągającą wysoką temperaturę ekstrakcji, przez co może prowadzić do rozkładu poszukiwanych substancji fenolowych. Badacze są zatem zgodni - główną przewagą ekstrakcji z użyciem ultradźwięków nad metodą Soxhleta jest krótszy czas pozyskania docelowej substancji (Aspé, Fernández 2011; Caballero-Galván i in. 2018).

Istnieje także szeroka baza publikacji, w których wykorzystano ulepszoną bądź konwencjonalną wersję aparatu do SE. Wiele badań z wykorzystaniem tego urządzenia dotyczy ekstrakcji tłuszczu, głównie z materiałów takich jak algi oraz *Garcinia indica* (w celu uzyskania masła

kakaowego), czy nasiona daktylowca właściwego (*Phoenix dactylifera* L.). Aparat Soxhleta jest także wykorzystywany do odtłuszczania materiału pozyskanego z pędów komosy białej (*Chenopodium album* L.), aby następnie pozyskać związki polarne zawarte w roślinie. Inne przykłady ekstrakcji wraz z danymi przedstawiono w tabeli (Tab.1). Dane potwierdzają, iż w metodzie Soxhleta przeważnie wykorzystuje się większe ilości rozpuszczalników niż w przypadku ekstrakcji z ultradźwiękami (López-Bascón, Luque de Castro 2020).

Tab .1. Porównanie czasu trwania ekstrakcji, zastosowanych rozpuszczalników oraz ich objętości w równoległych ekstrakcjach takich samych materiałów badawczych (López-Bascón, Luque de Castro 2020).

Materiał badawczy	Ekstrahowane związki	Czas trwania ekstrakcji (h)		Rodzaj rozpuszczalnika		Objętość rozpuszczalnika (ml)	
		USAE	SE	USAE	SE	USAE	SE
Nasiona kiwi	Kwasy tłuszczowe	0,5	4,0	N-heksan	N-heksan	400	300
<i>Lonicera macranthoides</i>	Związki lotne	0,5	6,0	Octan etylu	Octan etylu	30	200
<i>Portulaca oleracea</i> L.	Flawonoidy	1,0	4,5	EtOH:H ₂ O	EtOH:H ₂ O	25	80

Wspomnianą ekstrakcję tłuszczu z alg opisuje publikacja Ramluckan'a i in. (2014). Analizowano sproszkowane algi (stwierdzono przewagę należących do *Chlorella* sp) stosując różne ekstrahenty, jednak najlepsze wyniki uzyskano używając etanol, heksan oraz chloroform. Czas trwania ekstrakcji był zróżnicowany, dzięki czemu można było porównać wydajność każdej próby. Stwierdzono, iż najlepsze wyniki otrzymano w ekstrakcjach trwających 3 godziny, a malejące stężenie lipidów w dłuższej trwających próbach przypisano rozkładowi substancji oraz niejednorodności tłuszczu w algach. Ponadto barwienie za pomocą czerwieni Nilu wykazało, iż algi zawierają lipidy w różnych ilościach. Metoda SE jest często wybierana przez badaczy ze względu na prostotę i bezpieczeństwo wykonania (Ramluckan i in. 2014).

USAE jest również metodą wykorzystywaną w ekstrakcji związków z alg takich, jak *Chlorella vulgaris*, *Phaeodactylum tricornutum*, gdyż skutecznie rozbija ich komórki, ułatwiając tym samym przemieszczenie cząsteczek substancji do fazy ciekłej. Badanie przeprowadzano w różnych warunkach temperatury, czasu ekstrakcji i stosunku rozpuszczalnika do materiału analizowanego, natomiast ekstrahentem był 90% etanol. W stałej temperaturze wydajność ekstrakcji wzrastała do czasu wynoszącego ok. 5 godzin, następnie malała, co może świadczyć o chemicznym rozkładzie luteiny w przedłużającym się procesie ekstrakcji. Ustalono, iż najlepszą wydajność otrzymano wykorzystując czas ekstrakcji równy 5 godzin, temperaturę 37,7°C oraz stosunek rozpuszczalnika do materiału wynoszący 31 ml/g. Zbadano także, iż za pomocą USAE powierzchnia kontaktu materiału z rozpuszczalnikiem wzrosła dwukrotnie względem konwencjonalnej metody ekstrakcji polegającej na wytrząsaniu substancji (Vernès, Vian, Chemat 2020; Deenu, Naruenartwongsakul, Kim 2013). W tym przypadku wykorzystanie aparatu Soxhleta byłoby raczej niewskazane, gdyż temperatura rozpuszczalnika w trakcie ekstrakcji prawdopodobnie osiągnęłaby wyższą wartość niż optymalne 37,7°C.

3.2 Technika SPE w analizie farmaceutycznej

Technika SPE służy m.in. do izolacji i oczyszczania materiałów biologicznych w celu oznaczenia jakościowego i ilościowego leków lub ich metabolitów. Jednym z przykładów zastosowania SPE w praktyce jest izolacja wortioksetyny ze śliny i surowicy pacjentów w złożu C₁₈. Technika ta jest również przydatna przy oznaczaniu w płynach ustrojowych leków, które zostały

przyjęte w niskich dawkach. Wówczas mogą one wykazywać stężenie poniżej granicy wykrywalności wielu instrumentów analitycznych. Dzięki SPE możliwa jest dalsza analiza chromatograficzna lub farmakokinetyczna leków (Wróblewski i in. 2017; Głowska, Karaźniewicz-Łada 2009).

Opisywana metoda ma także zastosowanie w analizie alkaloidów (np. taksyn z cisa pospolitego) z krwi pobranej podczas sekcji zwłok, dzięki czemu możliwa jest identyfikacja trucizn z materiałów biologicznych pochodzących od pacjentów oraz zmarłych (Kula i in. 2009).

3.3 Technika SPE w analizie środowiskowej

Innym zastosowaniem w/w metody jest analiza zanieczyszczeń w próbkach środowiskowych. Przykładem jest opracowanie metody oznaczania sztucznych substancji słodzących takich, jak acesulfam i sukraloza, a także leków należących do różnych grup oraz ich metabolitów w wodzie powierzchniowej, pitnej oraz kanalizacyjnej. Dzięki tej technice możliwa jest analiza wydajności pracy oczyszczalni ścieków oraz stopnia konsumpcji określonych substancji w danym regionie. Poza powyższym – SPE wykorzystuje się także do izolacji i oczyszczania pestycydów z żywności, co potwierdza szerokie zastosowanie techniki ekstrakcji do fazy stałej (Paíga i in. 2017; Luo i in. 2019; Stachniuk, Fornal 2016).

4. Podsumowanie i wnioski

Różnorodność znanych dotąd i wciąż powstających metod ekstrakcyjnych świadczy o niesłabnącym trendzie w dążeniu do optymalizacji technik rozdziału substancji. Trend ten wynika także z ciągłego rozwoju innych technologii, dzięki którym możliwa jest np. automatyzacja analiz. Przekłada się to na uproszczenie i przyspieszenie pracy analityka, w wyniku której powstała metoda mikroekstrakcji do fazy stałej (MSPE). Korzystanie z badań i dotychczasowej wiedzy z pewnością pomaga w doborze odpowiedniej techniki i warunków ekstrakcji.

Mimo tego, iż metoda ekstrakcji opracowana przez Soxhleta ma ponad 100 lat, nadal badacze chętnie przystępują do porównywania tej konwencjonalnej metody względem innych, bardziej nowoczesnych technik. Z powyższych publikacji wynika, iż metoda USAE jest często szybszą metodą i zużywającą mniejszą ilość substancji niż SE (Oniszcuk i in. 2015; López-Bascón, Luque de Castro 2020).

Z kolei technika SPE w porównaniu z klasycznymi metodami ekstrakcji ciecz-ciecz charakteryzuje się zmniejszeniem zużycia rozpuszczalników oraz zminimalizowaniem czasu trwania zastosowania metody. SPE wykorzystuje się do izolacji i przygotowania próbek, gdyż jest to metoda selektywna, przyjazna dla środowiska i stosunkowo tania. Technika ta jest bardzo szeroko stosowana dzięki możliwości oczyszczania, zateżniania, derywatyzacji, odsalania i frakcjonowania związków na klasy (Paíga, Santos, Delerue-Matos 2017; Ötles, Kartal 2016).

5. Literatura

- Aspé E, Fernández K (2011) The Effect of Different Extraction Techniques on Extraction Yield, Total Phenolic, and Anti-Radical Capacity of Extracts from Pinus Radiata Bark. *Ind Crops Prod* 34(1): 838–44
- Caballero-Galván AS, Restrepo-Serna DL, Ortiz-Sánchez M, Cardona-Alzate CA (2018) Analysis of Extraction Kinetics of Bioactive Compounds from Spent Coffee Grounds (*Coffea Arábica*). *Waste Biomass Valorization* 9(12): 2381–89
- Deenu A, Naruenartwongsakul S, Kim SM (2013) Optimization and Economic Evaluation of Ultrasound Extraction of Lutein from *Chlorella Vulgaris*. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 18(6): 1151–62
- Głowska F, Karaźniewicz-Łada M (2009) Metody izolacji leków i ich metabolitów z matrycy biologicznej stosowane w badaniach farmakokinetycznych. *Farm Pol* 65(7): 505–10.
- Kealey D., Haines PJ (2005) *Chemia analityczna - krótkie wykłady*
- Kocjan R (red.) (2002) *Chemia analityczna podręcznik dla studentów tom 2*. PZWL, Wydawnictwo Lekarskie

- Kula K, Rojek S, Klementowicz W i in. (2009) Analiza alkaloidów cisa pospolitego w materiale biologicznym z zastosowaniem metod chromatograficznych. *Arch Med Sąd* 59(4): 279–84.
- López-Bascón MA, Luque de Castro MD (2020) Soxhlet Extraction. *Liquid-Phase Extraction*: 327–354
- Luo J, Wu L, Zhang Q i in. (2019) Review on the Determination and Distribution Patterns of a Widespread Contaminant Artificial Sweetener in the Environment. *Environ. Sci. Pollut R.* 26(19): 19078–96
- Oniszczyk A, Waksmundzka-Hajnos M, Podgórski R (2015) Comparison of Matrix Solid-Phase Dispersion and Liquid—Solid Extraction Methods Followed by Solid-Phase Extraction in the Analysis of Selected Furanocoumarins from *Pimpinella* Roots by HPLC—DAD. *Acta Chromatographica* 27(4): 687–96
- Ötles S, Kartal C (2016) Solid-Phase Extraction (SPE): Principles and Applications in Food Samples. *Acta Sci. Pol. Technologia Alimentaria* 15(1): 5–15
- Paíga P, Santos LHMLM, Delerue-Matos C (2017) Development of a Multi-Residue Method for the Determination of Human and Veterinary Pharmaceuticals and Some of Their Metabolites in Aqueous Environmental Matrices by SPE-UHPLC—MS/MS. *J Pharm Biomed Sci.* 135: 75–86.
- Poole CF (2016) EXTRACTION | Solid-Phase Extraction. Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering.
- Poole CF (2020) Milestones in the Development of Liquid-Phase Extraction Techniques. *Liquid-Phase Extraction*: 1–89.
- Ramluckan K, Moodley KG, Bux F (2014) An Evaluation of the Efficacy of Using Selected Solvents for the Extraction of Lipids from Algal Biomass by the Soxhlet Extraction Method. *Fuel* 116: 103–8.
- Stachniuk A, Fornal E (2016) Techniki ekstrakcyjne stosowane w oznaczaniu pozostałości pestycydów w żywności metodą LC-MS. *ŻNTJ* 104(1): 5–18
- Vernès L, Vian M, Chemat F (2020) Ultrasound and Microwave as Green Tools for Solid-Liquid Extraction. *Liquid-Phase Extraction*: 355–374
- Wilga J (2008) Opracowanie metody oznaczania zawartości substancji farmaceutycznych w próbkach środowiskowych. Rozprawa doktorska, Politechnika Gdańska
- Wróblewski K, Petruczynik A, Buszewski B (2017) Determination of Vortioxetine in Human Serum and Saliva Samples by HPLC—DAD and HPLC—MS. *Acta Chromatographica* 29(3): 325–44

10. Właściwości fotokatalityczne ZrO_2 w obszarze światła widzialnego

Photocatalytic properties of ZrO_2 in the visible-light region

Kucio Karolina

Katedra Chromatografii, Instytut Nauk Chemicznych, Wydział Chemii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin

Opiekun naukowy: dr hab. Barbara Charmas, prof. UMCS

Kucio Karolina: karolina.kucio@poczta.umcs.lublin.pl

Słowa kluczowe: fotokataliza, półprzewodniki, domieszkowanie, fotodegradacja barwników

Streszczenie

Szacuje się, że w czasie procesu barwienia w przemyśle tekstylnym utracone zostają duże ilości produkowanych na świecie barwników. W rezultacie borykamy się z problemem ścieków zawierających wiele substancji barwiących, które przyczyniają się do zakłóceń w prawidłowym funkcjonowaniu ekosystemów wodnych. Barwniki powodują m.in. ograniczenie penetracji światła słonecznego w zbiornikach wodnych. Wiele barwników tekstylnych ma działanie rakotwórcze i mutagenne. Z tego powodu dużą uwagę poświęca się procesom usuwania ze ścieków tego typu toksycznych związków organicznych. Jednak metody te często nie przynoszą zadowalających rezultatów. Duże nadzieje pokłada się w zaawansowanych procesach utleniania (*Advanced Oxidation Processes* - AOP), w tym w fotokatalizie heterogenicznej. Większość efektywnych fotokatalizatorów ulega aktywacji pod wpływem promieniowania ultrafioletowego (UV), jednak dąży się do otrzymania takich materiałów, w obecności których fotokatalityczna degradacja barwników będzie możliwa do przeprowadzenia z udziałem światła widzialnego (Vis). Jednym z powszechnie stosowanych fotokatalizatorów jest ZrO_2 . Półprzewodnik ten charakteryzuje się wysoką energią pasma wzbronionego (E_g), co skutkuje jego aktywnością jedynie w obszarze promieniowania ultrafioletowego. Od dawna podejmowane są próby zmniejszenia pasma wzbronionego tego tlenku, co umożliwiłoby otrzymanie fotokatalizatora aktywnego w obszarze światła widzialnego (Vis). Możliwe jest to poprzez domieszkowanie półprzewodników metalami bądź niemetalami.

1. Wstęp

Intensywny rozwój przemysłu spowodował, że obecnie borykamy się z problemami zanieczyszczonego środowiska naturalnego. Często niezamierzone działania ludzkości mają destrukcyjny wpływ na jakość powietrza, gleby oraz wody. Dynamizacja technologiczna spowodowała, że do wód trafiają toksyczne substancje organiczne, w tym barwniki pochodzące z przemysłu tekstylnego. Stanowią one duże zagrożenie dla ludzi, a także fauny i flory wodnej. Barwniki organiczne są związkami stabilnymi chemicznie, które nie ulegają biodegradacji w środowisku naturalnym. Barwniki tekstylne i inne barwniki przemysłowe stanowią jedną z największych grup związków organicznych, które powodują duże zagrożenie dla środowiska. Około 1-20% światowej produkcji barwników jest tracona podczas procesu barwienia po czym trafia do środowiska (Konstantinou i Albanis 2004). W wyniku tego dochodzi do eutrofizacji wód i powstawania licznych produktów ubocznych poprzez utlenianie, hydrolizę i inne reakcje chemiczne zachodzące w ściekach (Konstantinou i Albanis 2004).

Od dawna opracowywane są różne technologie oczyszczania ścieków z barwników przemysłowych, gdyż obecnie znane metody są często nieefektywne oraz czasochłonne. Koagulacja, wymiana jonowa na syntetycznych żywicach czy adsorpcja na węglu aktywnym powodują powstawanie wtórnych zanieczyszczeń, gdyż związki organiczne przenoszone są z wody do innej fazy. Nie mniej jednak bardziej skuteczne wydają się być tradycyjne procesy utleniania, takie jak ozonowanie czy chlorowanie, które powodują skuteczne usuwanie niektórych klas barwników (Tang i An 1995).

Obiecującą metodą usuwania zanieczyszczeń wydają się być zaawansowane procesy utleniania (AOP, *ang. Advanced Oxidation Processes*). Główną rolą tych procesów jest wytwarzanie

w wodzie rodnika hydroksylowego, który stanowi bardzo silny utleniacz powodujący utlenianie szerokiej gamy związków organicznych (Daghrir i in. 2013). Zaawansowane procesy utleniania obejmują m.in. fotolizę i fotokatalizę, w tym fotokatalizę heterogeniczną zachodzącą na granicach faz ciało stałe/ciecz, ciało stałe/gaz lub ciecz/gaz (Rauf i Ashraf 2009). Do przeprowadzenia tego typu procesu niezbędne jest użycie fotokatalizatora. Większość tlenków stosowanych w procesach fotokatalitycznych to półprzewodniki, m.in.: ZrO_2 , TiO_2 , ZnO_2 czy CeO_2 . Tlenki te charakteryzują się szerokim pasmem wzbronionym (*ang. band gap*) umiejscowionym pomiędzy pasmem walencyjnym, a pasmem przewodnictwa półprzewodnika. Ze względu na dużą energię pasma wzbronionego (E_g), wyrażającą szerokość pasma, tlenki te wykazują wysoką aktywność w obecności promieniowania ultrafioletowego (UV), jednak niską w zakresie światła widzialnego (Vis) (Herrmann 1999). Rozwój fotokatalizy przy udziale światła widzialnego stał się obecnie jednym z najważniejszych problemów dotyczących degradacji związków organicznych.

Celem pracy była charakterystyka ZrO_2 jako fotokatalizatora oraz analiza danych literaturowych wskazujących na możliwość zastosowania tego tlenku w procesach fotokatalitycznych prowadzonych w obecności światła widzialnego (Vis).

2. Opis zagadnienia

ZrO_2

Ditlenek cyrkonu (ZrO_2) jest materiałem szeroko stosowanym w technologii ceramicznej oraz katalizie heterogenicznej. Pod ciśnieniem atmosferycznym ZrO_2 występuje w 3 postaciach alotropowych: monoklinicznej (zwanej jednoskośną), tetragonalnej oraz kubicznej (sześcienną). Czysty cyrkon w temperaturze pokojowej występuje w formie monoklinicznej. Pod wpływem ogrzewania do temperatury około 1170°C ulega przekształceniu w postać tetragonalną. Dalsze ogrzewanie (powyżej 2370°C) skutkuje wytworzeniem formy kubicznej (Mihai i in. 2014).

Półprzewodnik ten charakteryzuje się wysoką energią pasma wzbronionego (E_g) w zakresie od 3.25 do 5.1 eV w zależności od metody preparatyki (Botta i in. 1999; Ciuparu i in. 2000; French i in. 1994). Spośród wielu wartości E_g najczęstszą i akceptowaną wartością jest 5.0 eV, z potencjałem pasma przewodnictwa wynoszącym -1.0V w porównaniu z NHE (standardową elektrodą wodorową) przy $\text{pH} = 0$. Odpowiednio, wartość potencjału pasma walencyjnego względem NHE wynosi $+4.0\text{eV}$. Względnie duża wartość E_g i wysoka ujemna wartość potencjału pasma przewodnictwa umożliwiają wykorzystanie ZrO_2 jako efektywnego fotokatalizatora (Botta i in. 1999). Materiał ten oprócz właściwości katalitycznych wykazuje również właściwości adsorpcyjne oraz optyczne, które nie zależą jedynie od jego struktury fazowej, ale również od struktury krystalicznej i morfologii (Renuka i in. 2017). ZrO_2 jako fotokatalizator cechuje się nietoksycznością, obojętnością chemiczną, stosunkowo niskim kosztem oraz łatwą dostępnością (Aflaki i Davar 2016). Tlenek ten był stosowany w reakcjach fotokatalitycznych w celu fotodegradacji m.in. 4-chlorofenolu, 4-nitrofenolu, pentanodiolu, a także utleniania propenu, etanu i CO oraz 2-propanolu do acetonu (Botta i in. 1999).

Materiały na bazie tlenku cyrkonu od lat cieszą się dużą popularnością w procesach usuwania barwników tekstylnych ze ścieków dzięki zastosowaniu fotokatalizy heterogenicznej. ZrO_2 może być wytwarzany wieloma metodami, m.in.: metodą mechanochemiczną, zol-żel, solwotermalną, hydrotermalną, mikrofalową, współstrącania (Renuka i in. 2017) jak również za pomocą chemicznej syntezy par (Srdić i in. 2000) lub metatezy nieorganicznej (Chen i in. 2006). ZrO_2 ze względu na wysoką aktywność fotokatalityczną w zakresie promieniowania ultrafioletowego (UV) jest używany do fotodegradacji zarówno związków organicznych jak i nieorganicznych (Renuka i in. 2016; Renuka i in. 2017). Fotokatalityczna degradacja barwników w obecności ZrO_2 rozpoczyna się od adsorpcji cząsteczek barwnika przez powierzchniowe grupy hydroksylowe znajdujące się na powierzchni tlenku. W wyniku absorpcji promieniowania z zakresu UV o energii większej bądź równej energii pasma wzbronionego (E_g), dochodzi do wzbudzenia tlenku cyrkonu. Następuje przemieszczanie elektronów (e^-) z pasma walencyjnego do pasma przewodnictwa. Równocześnie w paśmie walencyjnym dochodzi do wytworzenia dziur elektronowych (h^+). Uformowane pary elektron-dziura przemieszczają się na powierzchnię ZrO_2 i reagują z cząsteczkami O_2 zaadsorbowanymi na powierzchni tlenku. W konsekwencji tego dochodzi do powstawania rodników hydroksylowych

($\cdot\text{OH}$) i anionowych rodników ponadtlenkowych ($\cdot\text{O}_2^-$). Wytworzone rodniki reagują z cząsteczkami barwnika prowadząc do ich degradacji (Aflaki i Davar 2016).

Prowadzenie procesów fotokatalitycznych w obecności UV niesie za sobą duże koszty związane z wytwarzaniem energii, a także zagrożenie jakie stwarza dla ludzi ten rodzaj promieniowania. Dlatego wciąż poszukiwane są nowe procedury preparatyki i modyfikacji materiałów w celu uzyskania fotokatalizatorów aktywnych w zakresie światła widzialnego. Badania prowadzone są w kierunku uzyskania ZrO_2 , w którego obecności będzie możliwa fotokatalityczna degradacja związków organicznych przy pomocy powszechnie dostępnego źródła energii, którym jest Słońce. Skuteczną metodą do otrzymania ZrO_2 aktywnego w obszarze światła Vis jest jego domieszkowanie metalami bądź niemetalami (Sudrajat i in. 2016; Gionco i in. 2015).

3. Przegląd literatury

Istnieją liczne doniesienia na temat skutecznego domieszkowania ZrO_2 jako alternatywy do poprawy aktywności tego tlenku w zakresie światła widzialnego. Domieszkowanie ZrO_2 może skutecznie zmniejszyć szerokość pasma wzbronionego modyfikując tym samym strukturę półprzewodnika. Działanie to inicjuje aktywność ZrO_2 w obecności światła widzialnego (Vis).

Reddy i współpracownicy (Reddy i in. 2019a) otrzymali nanocząstki czystego ZrO_2 i ZrO_2 domieszkowanego kobaltem (Co-ZrO_2). Domieszkowany tlenek cyrkonu przygotowano poprzez wymieszanie w wodzie dejonizowanej 0,5% mol $\text{ZrCl}_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ oraz $\text{Co}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (prekursor jonów kobaltu) przy jednoczesnym dodawaniu roztworu amoniaku o $\text{pH} = 10$. Tak przygotowany roztwór umieszczono w autoklawie i utrzymywano w temperaturze 220°C przez 10 godzin. Otrzymany proszek przemycy wielokrotnie wodą dejonizowaną, przesączono i wysuszono w temperaturze 110°C po czym dodatkowo ogrzewano w 400°C . W ten sposób otrzymano próbkę Co-ZrO_2 . Podobną procedurę przeprowadzono w przypadku preparatyki czystego ZrO_2 . W celu zbadania aktywności fotokatalitycznej otrzymanych materiałów w świetle widzialnym zastosowano oranż metylowy (MO) stanowiący modelowe zanieczyszczenie organiczne. Używano 20 mg fotokatalizatora i 100 ml roztworu ($C = 10$ ppm). Źródło światła widzialnego stanowiła lampa o mocy 150 W ($\lambda > 400$ nm). Przed włączeniem światła stosowano 60 minutowy etap adsorpcji barwnika na fotokatalizatorze. Po rozpoczęciu naświetlania roztworu co 20 minut pobierano określoną ilość. Pomiaru stężenia MO oraz rejestracji widm absorpcyjnych dokonywano za pomocą spektrofotometru UV-Vis. Naświetlanie roztworu prowadzono przez 100 minut. Dodatkowo obliczono szerokość pasma wzbronionego (E_g) otrzymanych fotokatalizatorów. Zastosowanie Co-ZrO_2 spowodowało zanikanie piku charakterystycznego dla MO ($\lambda = 465$ nm). Wykazano, że barwnik został całkowicie zdegradowany w wyniku zniszczenia pierścieni poliaromatycznych w cząsteczkach MO.

Badanie aktywności fotokatalitycznej wskazało, że w obecności czystego ZrO_2 stężenie wodnego roztworu MO uległo zmniejszeniu jedynie o 3,3% po 100 minutach naświetlania. Obserwowana degradacja oranżu metylowego jest prawdopodobnie spowodowana adsorpcją roztworu barwnika na powierzchni materiału. Szacowana szerokość pasma wzbronionego dla czystego ZrO_2 wynosi 4,95 eV co oznacza, że nie ulega on fotoaktywacji pod wpływem światła widzialnego. W przypadku próbki Co-ZrO_2 zaobserwowano degradację barwnika na poziomie 93,5%. Taki efekt uzyskano dzięki wprowadzeniu w strukturę katalizatora jonów Co. Szerokość pasma wzbronionego tego materiału zmniejszyła się do wartości 2,12 eV. W celu zbadania kinetyki degradacji oranżu metylowego zastosowano równanie Langmuira-Hinshelwooda (reakcja pseudo pierwszego rzędu). Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że nanocząstki Co-ZrO_2 ($k = 0,020525 \text{ min}^{-1}$) wykazywały większą szybkość degradacji w porównaniu do czystego ZrO_2 ($k = 0,000154 \text{ min}^{-1}$).

Fotokatalityczna degradacja MO jest związana ze zdolnością do wytwarzania fotogenerowanych par nośników ładunku oraz silnych czynników utleniających ($\cdot\text{OH}$ i $\cdot\text{O}_2$). Po ekspozycji w świetle widzialnym fotokatalizator wytwarza fotowzbudzone nośniki ładunku (pary elektronów e^- i dziur h^+). Tak więc, aby wytworzyć rodnik ponadtlenkowy ($\cdot\text{O}_2$) i rodnik hydroksylowy ($\cdot\text{OH}$), elektron (e^-), cząsteczka tlenu (O_2), dziura elektronowa (h^+) oraz cząsteczka wody (H_2O) reagują ze sobą wzajemnie. Wytworzone silne rodniki ($\cdot\text{OH}$ i $\cdot\text{O}_2$) powodują degradację

oranżu metylenowego do CO_2 i H_2O . Mechanizm ten działa jedynie w warunkach dostępu światła (Reddy i in. 2019a).

W innym eksperymencie Reddy i współpracownicy (Reddy i in. 2019b) opracowali fotokatalizator na bazie ZrO_2 domieszkowany manganem (Mn-ZrO_2). Materiał przygotowano analogicznie jak to zostało opisane w (Reddy i in. 2019a), a jako prekursor jonów manganu zastosowano $\text{Mn}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Aktywność fotokatalityczną zarówno czystego ZrO_2 jak i Mn-ZrO_2 zbadano w odniesieniu do oranżu metylenowego (MO, $C=10$ ppm). Testy aktywności fotokatalitycznej przeprowadzono z zastosowaniem światła widzialnego. Czas naświetlania roztworu wraz z fotokatalizatorem wynosił 100 min.

Po tym czasie zaobserwowano 2 % zmniejszenie stężenia MO w obecności czystego ZrO_2 , spowodowane jedynie absorpcją cząsteczek barwnika na fotokatalizatorze, ponieważ szerokość pasma wzbronionego wynosiła $E_g = 4.96$ eV, co świadczy o braku aktywności katalizatora w obszarze Vis. Po zastosowaniu Mn-ZrO_2 zaobserwowano 83.5% degradację barwnika, a wartość E_g była równa 2.43 eV, wskazując na aktywność katalizatora w stosowanym zakresie promieniowania. Stała szybkości degradacji domieszkowanego katalizatora ($k = 0.01971 \text{ min}^{-1}$) była wyższa niż ten parametr dla czystego tlenku cyrkonu ($k = 0.000121 \text{ min}^{-1}$) (Reddy i in. 2019b).

Próbie syntezy tlenku cyrkonu domieszkowanego azotem (N-ZrO_2) podjęli Sudrajat i współpracownicy (Sudrajat i in. 2016). Pierwszym etapem syntezy było wytrącenia wodorotlenku cyrkonu z tlenochloroku cyrkonu. Tlenochlorek cyrkonu rozpuszczono w wodzie stosując ciągle mieszanie do roztworu powoli dodawano NaOH aż do uzyskania $\text{pH} = 8$. Otrzymany osad wodorotlenku cyrkonu ($\text{Zr}(\text{OH})_4$) odwirowano, kilkakrotnie przemyto wodą i w moździerzu agatowym zmieszano z mocznikiem. Zmieloną mieszaninę suszono w piecu w 100°C przez 24 godziny, a następnie kalcynowano w piecu muflowym w temperaturze 600°C przez 3 godziny. Wytworzony krystaliczny N-ZrO_2 charakteryzował się jasnożółtą barwą. Zsyntetyzowany materiał przemyto wodą, a następnie etanolem i suszono przez 24 godziny w 100°C . Jako odnośnik wykorzystano czysty ZrO_2 . Dodatkowo, zgodnie z opisaną procedurą, domieszkowany fotokatalizator otrzymano z zastosowaniem komercyjnego ZrO_2 (c/ZrO_2). Został on zmielony z mocznikiem w moździerzu agatowym, kalcynowany, przemyty i wysuszony. Otrzymany materiał oznaczono jako N-c/ZrO_2 . Aktywność fotokatalityczną oceniono na podstawie stopnia degradacji amarantu (AM) i błękitu metylenowego (MB) w obszarze światła widzialnego. Zawiesinę zawierającą znane stężenia barwnika i fotokatalizatora poddano wstępnie 15 minutowemu działaniu ultradźwięków. Po przeniesieniu zawiesiny do fotoreaktora stosowano 2 godzinny etap adsorpcji w ciemności. Jako źródło światła widzialnego zastosowano świetlówkę o mocy 24W. Średnie natężenie światła widzialnego wynosiło 16.5 W m^{-2} . Test aktywności fotokatalitycznej prowadzono w czasie 4 godzin przy $\text{pH} = 8$. Stężenie MB lub AM wynosiło 10 mg L^{-1} natomiast stężenie fotokatalizatora 1 g L^{-1} . Po określonym czasie napromieniania zawiesinę pobierano i odwirowano. Pomiary absorbancji wykonywano za pomocą spektrofotometru UV-Vis przy długościach fali $\lambda = 664 \text{ nm}$ (MB) lub $\lambda = 521 \text{ nm}$ (AM). Dodatkowo oszacowano szerokość pasma wzbronionego (E_g) wszystkich uzyskanych materiałów. Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono, że aktywność fotokatalityczna ZrO_2 jest wyższa w porównaniu do c/ZrO_2 . Po 4 godzinnym naświetlaniu w obecności czystego tlenku cyrkonu (ZrO_2) zaobserwowano 6% zmniejszenie stężenia wodnego roztworu MB oraz 4% AM. W przypadku komercyjnego ZrO_2 (c/ZrO_2) wartości te wyniosły odpowiednio ~4% (AM) i ~3% (MB). Może to wynikać z różnicy w energii pasma wzbronionego. Wartość ta dla czystego ZrO_2 wynosiła 4.8 eV, natomiast dla c/ZrO_2 5.16 eV. Ponadto N-c/ZrO_2 wykazywał niższą aktywność fotokatalityczną niż N-ZrO_2 . Zaobserwowano degradację MB na poziomie ~52% (N-ZrO_2) i ~28% (N-c/ZrO_2). W przypadku drugiego barwnika (AM) wartości te wynosiły odpowiednio ~30% (N-ZrO_2) i ~10% (N-c/ZrO_2). Niższa aktywność N-c/ZrO_2 może być spowodowana nieefektywnym włączeniem N do sieci ZrO_2 . Dodatkowo domieszki w postaci N mogą znajdować się tylko na powierzchni fotokatalizatora. Porównując wyniki fotorozkładu amarantu (AM) i błękitu metylenowego (MB) widać wyraźnie, że AM jest bardziej oporny na fotodegradację. Może to wynikać z faktu, iż ma on bardziej złożoną strukturę w porównaniu do MB. Po drugie, grupy sulfonowe AM mogą zmniejszać gęstość elektronową struktury aromatycznej. To sprawia, że ten

fragment cząsteczki jest mniej podatny na elektrofilowy atak rodnika hydroksylowego (Sudrajat i in. 2016).

Celem badań prowadzonych przez Agorku i współautorów (Agorku i in. 2015) było otrzymanie ZrO_2 współdomieszkowanego Eu, C, N i S metodą współstrącania. Uzyskanie wysoko wydajnego fotokatalizatora zoptymalizowano poprzez zmianę ilości Eu. Fotokatalizator wytworzono przez dodanie $\text{Zr}(\text{NO}_3)_4$ (1 mmol) do $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ HNO}_3$. Do uzyskanej mieszaniny dodano polietylen i mieszano przez 30 minut. Do mieszaniny dodano określone ilości $\text{Eu}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, otrzymując trzy materiały, w których zawartość Eu wynosiła 0,3%, 0,6% i 1%. Następnie do mieszaniny reakcyjnej wprowadzono tiomocznik jako źródło C, N i S i mieszano przez 2 godziny. Powstałą mieszaninę suszono w piecu w temperaturze 100°C przez 12 godzin w atmosferze powietrza a następnie kalcynowano w 500°C przez 2 godziny. Uzyskano 3 materiały, które oznaczono: $\text{Eu}(0.3\%), \text{C}, \text{N}, \text{S}-\text{ZrO}_2$, $\text{Eu}(0.6\%), \text{C}, \text{N}, \text{S}-\text{ZrO}_2$ i $\text{Eu}(1\%), \text{C}, \text{N}, \text{S}-\text{ZrO}_2$. Następnie w podobny sposób przygotowano katalizator domieszkowany jedynie C, N, S bez dodatku $\text{Eu}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, oznaczony jako $\text{C}, \text{N}, \text{S}-\text{ZrO}_2$. Aktywność fotokatalityczną materiałów oceniano na podstawie stopnia degradacji indygokarminu ($\text{C} = 20 \text{ mg L}^{-1}$). Stosowano 100 mg fotokatalizatora i 100 ml wodnego roztworu barwnika. Jako źródło światła stosowano lampę ksenonową z filtrem UV, co zapewniało wiązkę światła o długości fali $\lambda > 420 \text{ nm}$. Naświetlanie prowadzono przez 150 min. W określonych odstępach czasu pobierano próbki roztworu i przesączano przez filtr membranowy. Stężenie pozostałej w roztworze indygokarminy określono za pomocą spektrofotometru przy długości fali $\lambda = 610 \text{ nm}$. Zastosowanie metody UV-Vis/DRS umożliwiło wyznaczenie szerokości pasma wzbronionego (E_g) otrzymanych materiałów. Dla czystego ZrO_2 wartość ta wynosiła 5.77 eV natomiast dla $\text{C}, \text{N}, \text{S}-\text{ZrO}_2$ 3.01 eV, co wskazuje, że w wyniku domieszkowania tlenku cyrkonu C, N i S zaobserwowano znaczne zwężenie szerokości pasma wzbronionego. W przypadku materiałów $\text{Eu}(0.3\%), \text{C}, \text{N}, \text{S}-\text{ZrO}_2$, $\text{Eu}(0.6\%), \text{C}, \text{N}, \text{S}-\text{ZrO}_2$ i $\text{Eu}(1\%), \text{C}, \text{N}, \text{S}-\text{ZrO}_2$ wartości te wynosiły odpowiednio 2.94, 2.99 i 2.91 eV. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że fotokatalizatory współdomieszkowane (Eu, C, N, S) wykazywały lepsze właściwości fotokatalityczne w porównaniu do komercyjnego ZrO_2 . Wraz z wydłużeniem czasu naświetlania zaobserwowano zmniejszanie pasm absorpcji przy $\lambda = 610 \text{ nm}$, co potwierdziło degradację barwnika w obecności fotokatalizatorów. Po 150 minutach degradacja barwnika przy zastosowaniu $\text{C}, \text{N}, \text{S}-\text{ZrO}_2$ wynosiła 54,1%. Całkowitą fotodegradację zaobserwowano w obecności $\text{Eu}(0.6\%), \text{C}, \text{N}, \text{S}-\text{ZrO}_2$. Dla katalizatorów $\text{Eu}(0.3\%), \text{C}, \text{N}, \text{S}-\text{ZrO}_2$ i $\text{Eu}(1\%), \text{C}, \text{N}, \text{S}-\text{ZrO}_2$ degradacja była na poziomie odpowiednio 83.4 i 64.5% (Agorku i in. 2015).

4. Podsumowanie

Liczne badania wskazują, że domieszkowanie bądź współdomieszkowanie półprzewodnika metalem bądź niemetalem może doprowadzić do uzyskania wysoce wydajnego fotokatalizatora, którego aktywacja następuje w obecności światła widzialnego. Wprowadzenie odpowiedniej domieszki w strukturę ZrO_2 umożliwia zwężenie pasma wzbronionego (E_g) półprzewodnika, co powoduje przesunięcie krawędzi adsorpcji w kierunku fal o wyższej długości. Działanie to inicjuje możliwość efektywnej fotokatalitycznej degradacji związków organicznych, w tym toksycznych barwników, pod wpływem światła widzialnego (Vis). Zastosowanie fotokatalizy heterogenicznej umożliwia wydajną degradację zanieczyszczeń, nie powodując jednocześnie generowania niebezpiecznych produktów wtórnych, co jest częstym zjawiskiem przy zastosowaniu innych metod.

5. Literatura

- Aflaki M, Davar F (2016) Synthesis, luminescence and photocatalyst properties of Zirconia nanosheets by modified Pechini method. *Journal of Molecular Liquids* 221: 1071-1079.
- Agorku ES, Kuvarega AT, Mamba BB i in. (2015) Enhanced visible-light photocatalytic activity of multi-elements-doped ZrO_2 for degradation of indigo carmine. *Journal of Rare Earths* 33(5): 498-506.

- Botta SG, Navío JA, Hidalgo MC i in. (1999) Photocatalytic properties of ZrO₂ and Fe/ZrO₂ semiconductors prepared by a sol-gel technique. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 129(1-2): 89-99
- Chen F, Huang L, Zhong Z i in. (2006) Synthesis of nanocrystalline tetragonal zirconia by inorganic metathesis reaction. *Materials chemistry and physics* 97(1): 162-166.
- Ciuparu D, Ensueque A, Shafeev G i in. (2000) Synthesis and apparent bandgap of nanophase zirconia. *Journal of Material Science Letters* 19(11): 931-933.
- Daghrir R, Drogui P, Robert D (2013) Modified TiO₂ for environmental photocatalytic applications: a review. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 52(10): 3581-3599.
- French RH, Glass SJ, Ohuchi FS i in. (1994) Experimental and theoretical determination of the electronic structure and optical properties of three phases of ZrO₂. *Physical Review* 49: 5133-5142.
- Gionco C, Paganini MC, Chiesa M i in. (2015) Cerium doped zirconium dioxide as a potential new photocatalytic material. The role of the preparation method on the properties of the material. *Applied Catalysis A: General* 504: 338-343.
- Herrmann JM (1999) Heterogeneous photocatalysis: fundamentals and applications to the removal of various types of aqueous pollutants. *Catalysis Today* 53: 115-129.
- Konstantinou KI, Albanis AT (2004) TiO₂-assisted photocatalytic degradation of azo dyes in aqueous solution: kinetic and mechanistic investigations. A review. *Applied Catalysis B: Environmental* 49: 1-14.
- Mihai LL, Parlatescu I, Gheorghe C i in. (2014) In vitro study of the effectiveness to fractures of the aesthetic fixed restorations achieved from zirconium and alumina, *Revista de Chimie* 65: 725-729.
- Rauf MA, Ashraf SS (2009) Fundamental principles and application of heterogeneous photocatalytic degradation of dyes in solution. *Chemical Engineering Journal* 151(1-3): 10-18.
- Reddy CV, Reddy IN, Reddy KR i in. (2019a) Template-free synthesis of tetragonal Co-doped ZrO₂ nanoparticles for applications in electrochemical energy storage and water treatment. *Electrochimica Acta* 317: 416-426.
- Reddy CV, Reddy IN, Akkinapally B i in. (2019b) Mn-doped ZrO₂ nanoparticles prepared by a template-free method for electrochemical energy storage and abatement of dye degradation. *Ceramics International* 45(12): 15298-15306.
- Renuka L, Anantharaju KS, Sharma SC i in. (2017) A comparative study on the structural, optical, electrochemical and photocatalytic properties of ZrO₂ nanooxide synthesized by different routes. *Journal of Alloys and Compounds* 695: 382-395.
- Renuka L, Anantharaju KS, Sharma SC i in. (2016) Hollow microspheres Mg-doped ZrO₂ nanoparticles: Green assisted synthesis and applications in photocatalysis and photoluminescence. *Journal of Alloys and Compounds* 672: 609-622.
- Sudrajat H, Babel S, Sakai H i in. (2016) Rapid enhanced photocatalytic degradation of dyes using novel N-doped ZrO₂. *Journal of Environmental Management* 165: 224-234.
- Srdić VV, Winterer M, Hahn H (2000) Sintering behavior of nanocrystalline zirconia prepared by chemical vapor synthesis. *Journal of the American Ceramic Society* 83(4): 729-736.
- Tang W, An H (1995) UV/TiO₂ photocatalytic oxidation of commercial dyes in aqueous solutions. *Chemosphere* 31(9): 4157-4170.

11. Synteza fotokatalizatorów na bazie TiO_2

Synthesis of TiO_2 based photocatalysts

Kucio Karolina

Katedra Chromatografii, Instytut Nauk Chemicznych, Wydział Chemii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskie, Lublin

Opiekun naukowy: dr hab. Barbara Charmas, prof. UMCS

Kucio Karolina: karolina.kucio@poczta.umcs.lublin.pl

Słowa kluczowe: fotokataliza heterogeniczna, domieszkowanie, fotodegradacja

Streszczenie

Fotokataliza heterogeniczna jest jedną ze skutecznych metod prowadzących do degradacji toksycznych związków organicznych. Powszechnie stosowanym fotokatalizatorem jest ditlenek tytanu. Półprzewodnik ten charakteryzuje się wysoką energią pasma wzbronionego, przez co wykazuje wysoką aktywność jedynie pod wpływem promieniowania UV. Modyfikacja TiO_2 poprzez wprowadzenie w jego strukturę odpowiedniej domieszki powoduje zwężenie pasma wzbronionego, a tym samym indukuje jego aktywność fotokatalityczną w obszarze światła widzialnego (Vis). Jako domieszki najczęściej stosowane są jony metali lub niemetalu. Możliwe jest także połączenie ditlenku tytanu z innym półprzewodnikiem charakteryzującym się niższą energią pasma wzbronionego. Działania te mają na celu otrzymanie wysokowydajnych fotokatalizatorów na bazie TiO_2 umożliwiających całkowitą degradację trudno biodegradowalnych związków zanieczyszczających wodę przy wykorzystaniu światła słonecznego stanowiącego odnawialne źródło energii.

1. Wstęp

Istnieje wiele metod oczyszczania wód z zanieczyszczeń. Od wielu lat intensywna uwaga naukowców skierowana jest na procesy fotokatalityczne. O możliwościach ich skutecznego zastosowania świadczy imponująca liczba publikacji dotycząca w szczególności fotokatalizy heterogenicznej. Proces ten zachodzi między fazą gazową lub ciekłą a stałym fotokatalizatorem. Ten rodzaj fotokatalizy obejmuje szerokie spektrum reakcji chemicznych, w tym: utlenianie, osadzanie metali, odwodornienie, usuwanie zanieczyszczeń oraz detoksykację wody (Herrmann 1999). Główną zaletą tego procesu jest fakt, iż fotokataliza heterogeniczna umożliwia utlenianie szkodliwych związków chemicznych do CO_2 i H_2O oraz jonów nieorganicznych, które są nieszkodliwe dla środowiska (Ożóg 2015; Mills i in. 1993). Klasyczna fotokataliza heterogeniczna przebiega w 5 etapach. Proces ten rozpoczyna się od przeniesienia reagentów na powierzchnię fotokatalizatora. Następnie zachodzi etap adsorpcji co najmniej jednego z reagentów. Kolejna faza to właściwa reakcja fotokatalityczna. Następnie powstałe produkty są desorbowane, a w ostatnim etapie usuwane z przestrzeni międzyfazowej. Jediną różnicą w porównaniu z konwencjonalną katalizą jest sposób aktywacji katalizatora, w którym aktywacja termiczna jest zastąpiona aktywacją za pomocą kwantu promieniowania elektromagnetycznego (Herrmann 1999). Gdy katalizator półprzewodnikowy w formie tlenku lub siarczku (TiO_2 , ZnO , ZrO_2 , CeO_2 , ZnS , CdS) jest oświetlany fotonami, których energia jest równa lub większa niż energia pasma wzbronionego półprzewodnika, dochodzi do absorpcji tych fotonów i tworzenia par elektron (e^-) / dziura (h^+), które następnie dysocjują na fotoelektrony w pasmie przewodnictwa oraz fotodziury w pasmie walencyjnym. Jednocześnie w obecności fazy ciekłej lub gazowej zachodzi spontaniczna adsorpcja na powierzchni fotokatalizatora. Zgodnie z potencjałem redoks każdego adsorbentu dochodzi do przeniesienia elektronu w kierunku cząstek akceptorowych, podczas gdy dodatnio naładowane fotodziury są transportowane do cząstek donorowych (Herrmann 1999; Mills i in. 1993).

W przypadku fotokatalizy heterogenicznej prowadzonej w obecności światła widzialnego (Vis) wyróżnia się fotokatalizę sensybilizowaną, w której degradacji ulega barwnik pełniący jednocześnie rolę sensybilizatora. Pod wpływem światła widzialnego dochodzi do absorpcji światła przez cząsteczki barwnika zaadsorbowane na powierzchni fotokatalizatora. Pod wpływem absorpcji

promieniowania następuje wzbudzenie cząsteczek barwnika i przeniesienia elektronu pochodzącego od barwnika do pasma przewodnictwa fotokatalizatora. Jednocześnie z cząsteczki barwnika tworzony jest kationorodnik B^{+} , który uczestniczy w reakcjach prowadzących do pełnej mineralizacji degradowanego barwnika- sensybilizatora (Rajeshwar i in. 2008; Konstantinou i Albanis).

2. Opis zagadnienia

Jednym z najczęściej stosowanych fotokatalizatorów jest TiO_2 . Umożliwia on usuwanie ze ścieków związków organicznych, które stanowią zagrożenie dla wielu organizmów wodnych. Dytlenek tytanu oprócz zastosowań w procesach fotokatalitycznych jest również powszechnie używany w przemyśle kosmetycznym, medycznym oraz malarskim. Czysty TiO_2 należy do grupy półprzewodników typu „n”, które posiadają większą liczbę elektronów w paśmie przewodnictwa w porównaniu z liczbą dziur w paśmie walencyjnym.

Wyróżnia się 3 formy krystaliczne TiO_2 : anataz, rutyl i brykit. Charakteryzują się one takim samym położeniem pasma walencyjnego, natomiast różnice dotyczą pasma przewodnictwa. Szerokość pasma wzbronionego anatazu, rutylu i brykitu wynosi odpowiednio 3.2 eV; 3.0 eV i 3.02 eV (Bettinelli i in. 2007; Daghrir i in. 2013). W trakcie syntezy TiO_2 najpierw powstaje forma amorficzna, która stopniowo pod wpływem wygrzewania zmienia się w formę anatazu. W temperaturze około 600°C powstaje rutyl. Za najbardziej aktywną fotokatalitycznie odmianę krystaliczną TiO_2 uważa się anataz, jednak kompozyty składające się zarówno z anatazu jak i rutylu wykazują znacznie wyższą aktywność fotokatalityczną w porównaniu do form indywidualnych (Ożóg 2015).

Fotowzbudzenie ditlenku tytanu rozpoczyna się w chwili, gdy energia słoneczna dociera do jego powierzchni. W wyniku absorpcji promieniowania dochodzi do wybijania elektronów, które wraz z cząsteczkami tlenu tworzą anionorodnik ponadtlenkowy $O_2^{\cdot-}$. Następnie dodatnio naładowana powierzchnia TiO_2 pobiera elektrony znajdujące się w wodzie występującej w otoczeniu (fotokataliza w fazie ciekłej lub gazowej), w wyniku czego dochodzi do wytworzenia rodników hydroksylowych $\cdot OH$. Proces ten stosowany jest do degradacji zanieczyszczeń, ponieważ reaktywne formy tlenu ($O_2^{\cdot-}$ i $\cdot OH$) powodują ich utlenianie do CO_2 i H_2O (Kosmala i Szymańska 2016).

TiO_2 wykazuje wysoką aktywność w obecności promieniowania UV. Oznacza to, że może pochłaniać światło o długości fali $\lambda < 387$ nm, co związane jest z szerokością jego przerwy energetycznej (Zaleska 2008). Sztuczne źródła światła wytwarzające promieniowanie ultrafioletowe generują wysokie koszty, dlatego konieczne jest przesunięcie krawędzi absorpcji TiO_2 w kierunku światła widzialnego o długości fali $\lambda > 400$ nm (Zaleska 2008). Otrzymanie fotokatalizatora działającego efektywnie w zakresie światła widzialnego (Vis) jest dużym wyzwaniem. Efekt taki można uzyskać dzięki domieszkowaniu ditlenku tytanu. Jako domieszki stosuje się najczęściej niemetale, metale przejściowe lub jony metali alkalicznych (Ożóg 2015). W celu zwiększenia szerokości pasma wzbronionego TiO_2 możliwe jest również domieszkowanie ditlenku tytanu innym półprzewodnikiem, charakteryzującym się niższą energią pasma wzbronionego (Hirai i in. 2001) lub połączenie go z innym tlenkiem np. SiO_2 lub Al_2O_3 (Anderson i Bard 1997). Istnieje wiele metod domieszkowania TiO_2 , jednak do najpopularniejszych należą: metoda zol-żel, hydroliza termiczna, metoda hydrotermalna oraz mechanochemiczna synteza z wykorzystaniem wysokoenergetycznych młynów planetarnych. Domieszkowanie przyczynia się do tworzenia nowych stanów energetycznych, zwężenia szerokości przerwy energetycznej TiO_2 oraz przesunięcia krawędzi absorpcji tlenu w kierunku wyższych długości fal ($\lambda > 400$ nm). Działania te indukują aktywność TiO_2 w obszarze światła widzialnego (Zaleska 2008). Domieszkowanie TiO_2 w celu uzyskania wysokowydajnych fotokatalizatorów zostało szeroko opisane w literaturze.

3. Przegląd literatury

Kerkez i Boz (Kerkez i Boz 2016) przygotowali fotokatalizatory na bazie TiO_2 domieszkowane srebrem. W tym celu rozpuścili w etanolu odpowiednią ilość izopropanolanu tytanu. Roztwór mieszano przez 1 godzinę, a następnie wkroplono do niego wodny roztwór kwasu octowego. Działanie to miało na celu wymuszenie hydrolizy prekursora TiO_2 . Następnie roztwór ogrzewano

temperaturze 80°C przez 1 godzinę i pozostawiono w temperaturze pokojowej na 24 godziny. Otrzymane nanocząstki TiO_2 przefiltrowano, przemyto wodą destylowaną i suszono w temperaturze 120°C przez 2 godziny. Dodatkowo przeprowadzono kalcynację w atmosferze powietrza w 550°C przez 5 godzin. Otrzymany TiO_2 impregnowano jonami Ag^+ . Jako prekursor jonów srebra zastosowano wodny roztwór AgNO_3 o różnych stężeniach. Po impregnacji otrzymane materiały suszono w temperaturze 120°C przez 1 godzinę oraz kalcynowano (1 godz.) w atmosferze powietrza w 350°C. Otrzymano następujące próbki: C1- $\text{Ag}_2\text{O}/\text{TiO}_2$ ($\text{Ag}/\text{Ti}=0.05/100$), C2- $\text{Ag}_2\text{O}/\text{TiO}_2$ ($\text{Ag}/\text{Ti}=0.10/100$) oraz C3- $\text{Ag}_2\text{O}/\text{TiO}_2$ ($\text{Ag}/\text{Ti}=0.50/100$). Aktywność fotokatalityczną próbek oceniono na podstawie stopnia degradacji błękitu metylenowego ($C = 5; 10; 15; 20$ ppm). Po przeprowadzeniu dwugodzinnego etapu adsorpcji wykonano pomiar stężenia barwnika dla czasu zerowego i rozpoczęto naświetlanie. Źródło światła widzialnego (Vis) stanowiła lampa emitująca światło o długości fali $\lambda_{\text{max}} = 530$ nm. Na podstawie uzyskanych wyników zaobserwowano, że czysty TiO_2 wykazywał najniższą aktywność fotokatalityczną. Efektywność degradacji błękitu metylenowego wzrastała wraz ze wzrostem zawartości domieszki. Stwierdzono również, że efektywność rozkładu barwnika zmniejszyła się wraz ze wzrostem wyjściowego stężenia błękitu metylenowego. Mogło być to spowodowane mniejszą adsorpcją barwnika na fotokatalizatorze, co spowodowało zwiększenie ilości cząsteczek błękitu metylenowego w roztworze, w związku z czym absorpcja fotonów przez fotokatalizator była utrudniona. Zmniejszenie się ilości fotonów docierających do powierzchni fotokatalizatora spowodowało spadek wydajności degradacji barwnika (Kerkez i Boz 2016).

Próbę otrzymania fotokatalizatorów aktywnych w obecności światła widzialnego podjął Ali oraz współpracownicy (Ali i in. 2017). Przygotowali oni fotokatalizatory na bazie TiO_2 domieszkowane żelazem. Fotokatalizatory zostały otrzymane za pomocą metody zol-żel. Odpowiednią ilość azotanu żelaza rozpuszczono w wodzie dejonizowanej z dodatkiem lodowatego kwasu octowego. Następnie tetraizopropanolan tytanu zmieszano z etanolem stosując ciągłe mieszanie. Jeden roztwór dodano kroplami do drugiego i energicznie mieszano. Otrzymany zol mieszano przez 2 godziny a następnie poddano starzeniu przez 48 godzin w temperaturze 25°C. Powstały osad przefiltrowano i przemyto kilkakrotnie etanolem oraz wodą destylowaną. Następnie przeprowadzono 12-sto godzinne suszenie w temperaturze 100°C oraz etap kalcynacji w temperaturze 400°C przez 4 godziny. Stężenie Fe w materiałach wynosiło od 3 do 10% molowych. Aktywność fotokatalityczną materiałów w świetle widzialnym oszacowano na podstawie stopnia degradacji błękitu metylenowego. Jako źródło światła widzialnego zastosowano lampę halogenową. Najlepsze wyniki rozkładu błękitu metylenowego zaobserwowano dla próbki o zawartości jonów Fe 3%. Po 90 minutach naświetlania światłem widzialnym fotodegradacji uległo aż 75% barwnika. Zaobserwowano, że przy wyższej zawartości domieszki dochodziło do nadmiernego jej gromadzenia na powierzchni fotokatalizatora. Powodowało to zmniejszenie głębokości penetracji światła oraz redukcję ilości miejsc aktywnych na fotokatalizatorze. Tylko odpowiednia ilość domieszki może poprawić właściwości fotokatalityczne TiO_2 w obszarze światła widzialnego (Ali i in. 2017).

Aguiral i współpracownicy (Aguiral i in. 2013) przeprowadzili syntezę TiO_2 domieszkowanego jonami Cu. W tym celu zastosowano metodę niskotemperaturowej hydrolizy. Jako prekursor TiO_2 zastosowano n-butanolanu tytanu natomiast różne ilości $\text{CuCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ stanowiły źródło jonów Cu. Otrzymano 3 fotokatalizatory o różnej zawartości Cu: 2.5%; 5.0% oraz 7.5%. Materiały poddano kalcynacji w atmosferze powietrza przez 1 godzinę w temperaturze 450°C. Próbę kontrolną stanowił czysty TiO_2 bez dodatku Cu. Aktywność fotokatalityczną otrzymanych materiałów oszacowano na podstawie stopnia degradacji błękitu metylenowego o stężeniu początkowym $C = 0.056$ g L^{-1} . Źródłem światła widzialnego była lampka LED. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że aktywność fotokatalityczna domieszkowanego TiO_2 była około 10% większa w porównaniu z aktywnością czystego TiO_2 . Wzrost zawartości domieszki Cu spowodował wzrost absorpcji w rejonie światła widzialnego (Aguiral i in. 2013).

Zhang wraz ze współpracownikami (Zhang i in. 2007) podjęli próbę domieszkowania ditlenku tytanu siarką stosując metodę mechanochemiczną. TiO_2 zmieszano z siarką (10% wagowych) i umieszczono w naczynku z siedmioma kulkami mielącymi. Mieszanie mielono w planetarnym

młynie kulowym z szybkością 700 obr./min przez 20, 60, 120 oraz 240 min. Uzyskane materiały kalcynowano w atmosferze argonu przez 60 minut w temperaturze 400°C. Aktywność fotokatalityczną zbadano na podstawie stopnia utlenienia tlenku azotu (NO). Mieszaninę powietrza i NO doprowadzano do reaktora z szybkością przepływu równą 200 cm³ min⁻¹. Źródło światła widzialnego stanowiła wysokociśnieniowa lampa rtęciowa. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że niedomieszkowany TiO₂ wykazywał niską aktywność fotokatalityczną w świetle widzialnym $\lambda > 510$ nm. Domieszkowany siarką TiO₂ otrzymany w wyniku mielenia w czasie 20 minut spowodował ~20% rozkładu NO. Wydajność degradacji NO w obecności fotokatalizatora domieszkowanego siarką, poddanego 120-minutowemu mieleniu była dwukrotnie wyższa i wyniosła około 40% (Zhang i in. 2007).

Próbkę domieszkowania TiO₂ za pomocą C i N podjął Chen wraz ze współpracownikami (Chen i in. 2007). Materiały o potencjalnej aktywności fotokatalitycznej przygotowano metodą zol-żel. TiO₂ domieszkowany C oznaczono jako C-TiO₂ natomiast N jako N-TiO₂. Przeprowadzono również równoczesne współdomieszkowanie TiO₂ C i N (C-N-TiO₂). Jako prekursor tytanu, węgla i azotu zastosowano odpowiednio: tytanian n-butylu, wodorotlenek tetrabutylamonowy oraz mocznik. Fotokatalizator C-N-TiO₂ otrzymano poprzez dodanie tytanianu n-butylu do wodnego roztworu wodorotlenku tetrabutylamonowego i mocznika. Roztwór mieszało przez 24 godziny w temperaturze pokojowej aby umożliwić hydrolizę tytanianu n-butylu. W celu odparowania wody i alkoholu przeprowadzono etap suszenia w temperaturze 100°C przez 8 godzin. Powstały kserożel kalcynowano przez 1 godzinę w atmosferze powietrza w temperaturze 400 i 500°C. Próbkę C-TiO₂ i N-TiO₂ przygotowano w analogiczny sposób. Aktywność fotokatalizatorów badano na podstawie stopnia degradacji błękitu metylenowego. Źródło światła widzialnego stanowiła lampa ksenonowa emitująca promieniowanie w zakresie λ od 420 do 700 nm. Wszystkie domieszkowane materiały wykazywały wyższą aktywność w porównaniu do czystego TiO₂, który powodował degradację barwnika na poziomie 26% w przypadku tlenku kalcynowanego w temperaturze 400°C i 21% dla TiO₂ kalcynowanego w 500°C. Najwyższą aktywnością odznaczał się TiO₂ domieszkowany jednocześnie C i N (C-N-TiO₂) oraz kalcynowany w temperaturze 400°C. Po 7 godzinach naświetlania roztworu zaobserwowano 90% degradację barwnika. Fotokatalizator o tym samym składzie, jednak kalcynowany w 500°C powodował degradację błękitu metylenowego na poziomie 69%. Najniższą efektywność rozkładu błękitu metylenowego zaobserwowano w przypadku próbek domieszkowanych azotem (N-TiO₂). Dla materiału N-TiO₂ kalcynowanego w 400°C zaobserwowano degradację barwnika na poziomie 61%, natomiast kalcynacja w 500°C spowodowała 45% degradację błękitu metylenowego. Jednoczesne domieszkowanie TiO₂ węglem i azotem umożliwia uzyskanie fotokatalizatora, który zapewnia efektywną degradację barwnika w obecności światła widzialnego. Stwierdzono również, że proces kalcynacji nie wpłynął korzystnie na zwiększenie aktywności fotokatalitycznej kompozytów na bazie TiO₂ (Chen i in. 2007).

Fotokatalizatory na bazie TiO₂ domieszkowane innym półprzewodnikiem (CdS) otrzymali Wu i współpracownicy (Wu i in. 2006). Zastosowano metodę solwotermalną, w której źródłem tytanu był tetraizopropanolan tytanu. Prekursorami siarczku kadmu były wodne roztwory Cd(NO₃)₂ i (NH₄)₂S o różnych stężeniach. Otrzymano 3 materiały o różnej zawartości CdS. Jako medium rozpraszające zastosowano cykloheksan oraz 1-heksanol, natomiast Triton X-100 posłużył jako środek powierzchniowo czynny. Na wstępie przygotowano roztwory Cd(NO₃)₂ i (NH₄)₂S o odpowiednich stężeniach. Otrzymane roztwory dodano do roztworu tetraizopropanolanu tytanu i tak przygotowaną mieszaninę mieszało przez 24 godziny w temperaturze pokojowej. Po tym czasie układ umieszczano w autoklawie stalowym i przedmuchiwano strumieniem argonu w celu usunięcia powietrza. Próbkę ogrzewano w 200°C przez 12 godzin, następnie odwirowano i przemyto mieszaniną etanolu i wody. Otrzymane materiały zawierały różną zawartość siarczku kadmu: S1 (1% CdS), S2 (3% CdS) i S3 (5% CdS). Czyste TiO₂ i CdS otrzymano zgodnie z tą samą procedurą. Aktywność fotokatalityczną materiałów badano w odniesieniu do błękitu metylenowego. Źródło światła stanowiła lampa halogenowa emitująca promieniowanie o długości fali $\lambda > 400$ nm. Przed rozpoczęciem właściwego etapu fotokatalizy przeprowadzano czterdziestominutowy etap adsorpcji. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że domieszkowanie TiO₂ siarczkiem kadmu umożliwia otrzymanie fotokatalizatorów aktywnych w obszarze światła widzialnego. W przypadku

czystego TiO_2 nie zaobserwowano zmiany stężenia błękitu metylenowego. Podobne rezultaty uzyskano dla czystego CdS. Najwyższą aktywnością fotokatalityczną odznaczały się materiały, które zawierały 3 i 5% CdS. Po 60 minutach naświetlania roztworu w obecności tych fotokatalizatorów degradacji uległo około 80 % barwnika. Zaobserwowano, że wraz ze wzrostem procentowej zawartości CdS w materiale efektywność rozkładu barwnika w świetle widzialnym zwiększała się (Wu i in. 2006).

4. Podsumowanie

Zastosowanie fotokatalizy heterogenicznej przy użyciu materiałów półprzewodnikowych umożliwia skuteczną degradację toksycznych związków organicznych zawartych w wodzie. Metoda ta jest przyjazna środowisku, gdyż nie powoduje powstawania produktów ubocznych. Ważne jest uzyskanie fotokatalizatora, który wykazuje aktywność w obecności światła widzialnego. Jest to istotne z punktu widzenia ekonomii, gdyż nie powoduje generowania dodatkowych kosztów związanych z wytwarzaniem energii. Taki efekt można uzyskać dzięki wprowadzeniu w strukturę TiO_2 odpowiedniej domieszki. Dużą rolę w syntezie takich fotokatalizatorów odgrywa odpowiednia zawartość domieszki, jak również etap kalcynacji.

5. Literatura

- Aguilar T, Navas J, Alcántara R i in. (2013) A route for the synthesis of Cu-doped TiO_2 nanoparticles with a very low band gap. *Chemical Physics Letters* 571: 49-53.
- Ali T, Tripathi P, Azam A i in. (2017) Photocatalytic performance of Fe-doped TiO_2 nanoparticles under visible-light irradiation. *Materials Research Express* 4(1): 015022.
- Anderson C, Bard AJ (1997) Improved photocatalytic activity and characterization of mixed $\text{TiO}_2/\text{SiO}_2$ and $\text{TiO}_2/\text{Al}_2\text{O}_3$ materials. *The Journal of Physical Chemistry B* 101(14): 2611-2616.
- Bettinelli M, Dallacasa V, Falcomer D i in. (2007) Photocatalytic activity of TiO_2 doped with boron and vanadium. *Journal of hazardous materials* 146: 529-534.
- Chen D, Jiang Z, Geng J i in. (2007) Carbon and nitrogen co-doped TiO_2 with enhanced visible-light photocatalytic activity. *Industrial & engineering chemistry research* 46(9): 2741-2746.
- Daghrir R, Drogui P, Robert D (2013) Modified TiO_2 for environmental photocatalytic applications: a review. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 52(10): 3581-3599.
- Herrmann JM (1999) Heterogeneous photocatalysis: fundamentals and applications to the removal of various types of aqueous pollutants. *Catalysis Today* 53: 115-129.
- Hirai T, Suzuki K, Komasaawa I (2001) Preparation and photocatalytic properties of composite CdS nanoparticles-titanium dioxide particles. *Journal of Colloid and Interface Science* 244(2): 262-265.
- Kerkez Ö, Boz I (2015) Photodegradation of Methylene Blue with $\text{Ag}_2\text{O}/\text{TiO}_2$ under Visible Light: Operational Parameters. *Chemical Engineering Communications* 202: 534-541.
- Konstantinou KI, Albanis AT (2004) TiO_2 -assisted photocatalytic degradation of azo dyes in aqueous solution: kinetic and mechanistic investigations. A review. *Applied Catalysis B: Environmental* 49: 1-14.
- Kosmala K, Szymańska R (2016) Nanocząstki tlenku tytanu (IV). Otrzymywanie, właściwości i zastosowanie. *Kosmos problemy nauk biologicznych*, 65(2): 235-245.
- Mills A, Davies RH, Worsley D (1993) Water purification by semiconductor photocatalysis. *Chemical Society Reviews* 22(6): 417-425.
- Ożóg S (2015) Fotokatalityczna degradacja herbicydów: nowe katalizatory na bazie TiO_2 . *Wiadomości Chemiczne* 69(7-8).
- Rajeshwar K, Osugi ME, Chanmanee W i in. (2008) Heterogeneous photocatalytic treatment of organic dyes in air and aqueous media. *Journal of photochemistry and photobiology C: photochemistry reviews* 9(4): 171-192.

- Wu L, Yu JC, Fu X (2006) Characterization and photocatalytic mechanism of nanosized CdS coupled TiO₂ nanocrystals under visible light irradiation. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* 244(1-2): 25-32.
- Zaleska A (2008) Doped-TiO₂: A review. *Recent Patents on Engineering*, 2(3): 157-164.
- Zhang Q, Wang J, Yin S i in. (2004) Synthesis of a visible-light active TiO₂-xS_x photocatalyst by means of mechanochemical doping. *Journal of the American Ceramic Society* 87: 1161-1163.

12. Antybakteryjne działanie kwasu hialuronowego

Antibacterial activity of hyaluronic acid

Ładniak Agata

Katedra Zjawisk Międzyfazowych, Instytut Nauk Chemicznych, Wydział Chemii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

Opiekun naukowy: dr hab. Agnieszka Ewa Wiącek, prof. UMCS

Ładniak Agata: agata.gozdecka@poczta.umcs.lublin.pl

Słowa kluczowe: polisacharyd, bakterie, synergizm, biofilm

Streszczenie

Opracowanie technologii produkcji nanokompozytów na bazie naturalnych polimerów budzi duże zainteresowanie naukowców ze względu szereg wartościowych właściwości tych związków, prostą ekstrakcję, niezwykłą łatwość modyfikacji z możliwością jednoczesnego sprawowania kontroli nad jakością wytwarzanego produktu oraz jego cenne właściwości biologiczne. Kwas hialuronowy (HA) jest liniowym polisacharydem, będącym składnikiem zewnątrzkomórkowej matrycy tkanki łącznej ssaków. Obecnie HA jest szeroko stosowany ze względu na swoje unikalne cechy, z których najważniejsze to biokompatybilność, nietoksyczność, właściwości lecznicze. Ponadto można go przygotować w różnych postaciach, takich jak hydrożel, włókna lub rusztowanie. Poniższy przegląd przedstawia najświeższe doniesienia literaturowe w dziedzinie medycyny, dotyczące charakterystyki różnego rodzaju układów zawierających kwas hialuronowy z naciskiem na jego właściwości antybakteryjne.

1. Wstęp

Zanieczyszczenia bakteryjne stanowią kluczowy problem podczas stosowania implantów medycznych. Są one, bowiem, preferencyjnymi miejscami adhezji większej liczby bakterii, prowadząc do infekcji. Wpływa to niekorzystnie na zdrowie i układ odpornościowy pacjentów, jednocześnie zwiększają się koszty leczenia. Konsekwencją adhezji bakterii jest tworzenie się biofilmu, który można zdefiniować jako zbiorowisko różnych mikroorganizmów osadzonych na powierzchni matrycy. Rolą biofilmu jest m.in. ochrona bakterii przed działaniem antybiotyków i toksyn (Valverde i in. 2019).

Dlatego też, w preparatyce implantów, należy wziąć pod uwagę warunki, które sprzyjają przyłączaniu się drobnoustrojów do ich powierzchni. Stąd, modyfikacja materiałów implantacyjnych polega głównie na wprowadzeniu dodatkowych substancji chemicznych mającym na celu zmianę rozkładu sił, takich jak: oddziaływania elektrostatyczne, siły van der Waalsa i hydrofobowe, lub modulację topografii powierzchni. Chropowatość na poziomie mikro- i nanometrów umożliwia kontrolowanie kumulacji bakterii, zapobiegając ich adhezji bezpośrednio po implantacji (Ivanova i in. 2012).

Kwas hialuronowy (HA) składa się z kwasu glukuronowego i N-acetylo-glukozaminy. HA jest hydrofilowy, biokompatybilny i biodegradowalny oraz naładowany ujemnie w szerokim zakresie pH (pK_a 3-4) (Mero i in. 2014), co umożliwia jego zastosowanie jako polianionu.

Niniejszy przegląd ma na celu szersze spojrzenie na kwas hialuronowy w preparatach o właściwościach antybakteryjnych, głównie na jego ukierunkowane użycie i charakter działania w/w produktach.

2. Opis zagadnienia

Wykorzystanie naturalnych polimerów, w tym także kwasu hialuronowego (HA), daje możliwość stworzenia materiałów o właściwościach fizykochemicznych zbliżonych do matrycy międzykomórkowej. Przewagą tego typu materiałów jest dodatkowo niska skłonność do wywoływania odczynów alergicznych. Dlatego też, najczęściej sięgają po nie specjaliści z dziedziny

inżynierii tkankowej, implantologii lub medycyny estetycznej. Poniższy przegląd przedstawia możliwości wynikające ze stosowania HA w medycynie ze szczególnym uwzględnieniem jego właściwości antybakteryjnych.

3. Przegląd literatury

3.1 Antybakteryjne powłoki implantów

Zapobieganie infekcjom na powierzchni implantów pozostającej w kontakcie z żywą tkanką kostną jest kluczowym wyzwaniem dla chirurgów, ortopedów i dentystów. Wychodząc mu naprzeciw zespół badawczy pod kierunkiem Valverde (Valverde i in. 2019) opracował polisacharydowe powłoki na zmodyfikowanych powierzchniach tytanowych, które miały spełniać rolę rezerwuarów dla środków przeciwbakteryjnych. Wybrano tytan, ponieważ stanowi on najpowszechniejszy komercyjny materiał implantacyjny. Na wstępie naukowcy dokonali modyfikacji powierzchni stopu Ti-6Al-4 V poprzez hydrolizę kwasową, w celu nadania jej odpowiednich właściwości topograficznych (niekorzystnych dla gromadzenia się i rozwoju bakterii). Następnie stosując metodę „layer-by-layer” (LbL) powleczone ją kwasem hialuronowym i chitozanem (Ch). Drugi związek wykorzystano ze względu na jego wysoką gęstość ładunku dodatniego, który wywołuje zaburzenia w strukturze ujemnie naładowanych błon komórkowych drobnoustrojów (Gour i in. 2014).

Największą zaletą wielowarstwowych polielektrolitów jest, nie tylko ich duża stabilność, ale przede wszystkim struktura umożliwiająca uzyskanie właściwości antybakteryjnych i zwiększenie biokompatybilności materiału. Ogólnie dobór składników był podyktowany znajomością ich budowy, właściwości i wzajemnej mieszalności. Na szczególną uwagę zasługuje stabilność sił elektrostatycznych pomiędzy tymi polielektrolitami w szerokim zakresie pH (3,5 – 9,0) (Kujawa i in. 2006) oraz w buforze fosforanowym przez 24 godziny nawet w obecności wysokich stężeń enzymów lizozymu i hialuronidazy (Del Hoyo i in. 2016). Ostatecznie, modyfikacja przy użyciu tych polimerów (HA i Ch) doprowadziła do wzrostu hydrofilowości powierzchni implantu. Powłoka zachowała stabilność w buforze fizjologicznym (pH 7,4) w 37°C w ciągu co najmniej 7 dni po implantacji. Jest to decydujący okres czasu, w którym najczęściej dochodzi do adhezji i namnażania bakterii (Valverde i in. 2019). Aktywność przeciwbakteryjną wielowarstwowej powłoki z ułożonych naprzemiennie HA i Ch oceniano w stosunku do oportunistycznego Gram-dodatniego patogenu *Staphylococcus aureus* za pomocą testów żywotności i adhezji. Wyniki wykazały, iż na „czystej” powierzchni implantu bakterie te były w 100% żywotne, a zastosowanie powyższej modyfikacji spowodowało obniżenie żywotności do poziomu 28%. Natomiast dodatkowe wprowadzenie do powłoki HA/Ch Triclosanu – środka przeciwbakteryjnego, wywołało całkowitą utratę żywotności.

Kolejna kwestia dotyczy implantacji protez naczyń krwionośnych. Chociaż infekcja bakteryjna występuje rzadko we wczesnym etapie implantacji stentu naczyniowego, jej rozwój może być śmiertelny. Dlatego stent powinien mieć właściwości antybakteryjne już na wczesnym etapie implantacji. W tym celu Jiang i in. (2019) wytworzyli nowe powłoki kompozytowe z kwasem hialuronowym, do których wykorzystano nanocząstki HA (HA-NP) wytworzone z HA o masie cząsteczkowej 100 kDa. Wykazywały one najlepszą stabilność w środowisku hialuronidazy. HA-NP zostały wytworzone poprzez reakcję amidową między HA a polietylenoiminą (PEI). Następnie naniesiono je na powierzchnie ze stali nierdzewnej 316L pokryte polidopaminą (PDA) i heksametylendiaminą (HD).

Do badań przyczepności komórek wybrano reprezentatywne bakterie: Gram-ujemną *Pseudomonas aeruginosa* i Gram-dodatnią *S. aureus*. Okazało się, że na kompozytach złożonych z HA-NP obserwuje się znacznie niższą liczbę i aktywność obu rodzajów bakterii w porównaniu do powłok PDA/HD, a także stal/PDA/HD/HA (100 kDa). Wysoka aktywność przeciwdrobnoustrojowa HA-NCF może wynikać z synergistycznego działania przeciwbakteryjnego HA i PEI. We wcześniejszych badaniach HA wykazał dobrą odporność na w/w bakterie. Powodował ich dezaktywację poprzez obniżenie przepuszczalności tkanek. Z kolei PEI dodatkowo zwiększał przepuszczalność zewnętrznej błony bakteryjnej i hamował wzrost bakterii poprzez zmniejszenie aktywności metabolicznej biofilmów.

Z kolei Bračić i in. (2019) wykazali, że powłoki kwasu hialuronowego (HA) z lizyną (L) posiadają znacznie lepsze właściwości antybakteryjne i przeciwpodorostowe wobec Gram-ujemnych *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* i *P. aeruginosa*, a także dla Gram-dodatnich *S. aureus* i grzybów *Candida albicans*, w porównaniu z materiałami na bazie chitozanu (Ch) lub jego karboksymetylowanej pochodnej (CMCh). Badania zostały wykonane w celu opracowania nowych powłok dla cewek moczowych zawierających w składzie polidimetylosiloksan (PDMS).

Powyższe grupy drobnoustrojów są pospolitymi patogenami występującymi w moczu podczas infekcji dróg moczowych, z koniecznością stosowania cewnika. Określono właściwości przeciwdrobnoustrojowe za pomocą stopnia redukcji kolonii bakteryjnych. Zaobserwowano, że powłoki HA-L powodowały hamowanie wzrostu bakterii nawet o 86%, podczas gdy działanie Ch i CMCh pozostawało na poziomie ~60%. Dodatkowo nie odnotowano znaczących różnic pomiędzy Ch i CMCh. Ponadto, testy tworzenia biofilmu bakteryjnego wykazały, że powłoka HA-L redukuje jego przyrost. Te właściwości antyadhezyjne przypisuje się wyższej hydrofilowości preparatu HA-L w porównaniu do bardziej szorstkich i mniej hydrofilowych powierzchni powłok Ch i CMCh. Mniej skuteczne działanie chitozanu uwarunkowane jest zmniejszeniem liczby wolnych grup aminowych, które zostały zaangażowane w przyczepność do PDMS. Z kolei w przypadku HA-L nastąpił synergistyczny efekt bakteriobójczy, uwarunkowany naładowanymi grupami polimeru i środka powierzchniowo czynnego.

3.2 Antybakteryjne płyny do płukania jamy ustnej

Zapalenie przyzębia jest częstym efektem nieprawidłowego utrzymywania higieny jamy ustnej. Badania kliniczne wykazały, że jest ono wywoływane przez zwiększoną kolonizację drobnoustrojów chorobotwórczych, głównie: *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* i *Tannerella forsythia*. W preparatach na wymienione schorzenie najczęściej spotyka się glukonian chlorheksydyny (CHX), który posiada działanie przeciwdrobnoustrojowe na różne bakterie, w tym *Enterococcus Faecalis*, *Prevotella Intermedia*, *S. aureus* oraz wspomniany *P. gingivalis*.

Zespół badawczy Binshabaiba i in. (2020) porównał działanie antybakteryjne 0,8% HA z aktualnie wykorzystywanych przy tym schorzeniu 0,2% CHX. W tym celu wytworzono biofilmy *P. gingivalis*, które następnie hodowano przez 72 godziny w 37°C w warunkach beztlenowych, na szkiełkach szklanych pokrytych ludzką śliną. Po tym czasie wystawiono je na działanie 0,8% HA oraz 0,2% CHX. Wyniki porównano z próbką kontrolną oraz między sobą. Eksperyment ten wykazał, że efektywność 0,8% HA w zmniejszaniu liczby drobnoustrojów przyzębia jest wyższa niż w przypadku CHX. Ponadto, dokonano randomizowanego badania klinicznego na grupie 24 pacjentów, u których występowała infekcja o zróżnicowanym stopniu (od umiarkowanego do ciężkiego). Po 12 tygodniach stosowania żelu z 0,8% HA nastąpiło istotne statystycznie zmniejszenie zapalenia przyzębia w porównaniu z miejscami kontrolnymi. Zaobserwowano obniżenie liczby drobnoustrojów chorobotwórczych. W efekcie zmniejszyły się kliniczne objawy zapalenia przyzębia, jak krwawienie dziąseł i głębokość kieszeni (Al-Shammari i in. 2018).

Badacze stwierdzili, iż taki wynik został podyktowany hydrofilowością HA, która przyczyniła się do naprawy komórek, różnicowania i proliferacji podstawowych keratynocytów i komórek mezenchymalnych jako skutek zwiększenia receptywności koagulatów. Niniejszy eksperyment przeprowadzony *in vitro* jest jednym z nielicznych, które wykazały, że HA wywiera działanie przeciwbakteryjne wobec *P. gingivalis*.

3.3 Skuteczne działanie HA w zapaleniu pęcherza moczowego wywołanego przez *Escherichia coli*

Bardziej efektywne działanie HA w porównaniu z dotychczas stosowanymi lekami przeciwdrobnoustrojowymi (np. gentamycyna) odnotowali również Yıldız i in. (2015). Badacze zauważyli, że dopęcherzowe leczenie kwasem hialuronowym redukuje bakteryjne zapalenie pęcherza moczowego (ZUM) i zmniejsza wywołaną przez zapalenie pęcherza nadkreczliwość u szczurów. ZUM pozostaje drugim najczęściej spotykanym, i niestety często nawracającym, zakażeniem bakteryjnym u dzieci. Powodowane jest głównie przez *E. coli*. Aby zapobiec ponownemu wystąpieniu ZUM, powszechnie stosuje się profilaktyczne leczenie przeciwdrobnoustrojowe. Naukowcy zainspirowani doniesieniami o skuteczności leczenia HA w nawracającym bakteryjnym

zapaleniu pęcherza (Riedl i in. 2008), możliwościami ochrony przed inwazją bakterii (Lee i in. 2010) i zmniejszania obciążenia bakteryjnego w moczu (Lv i in. 2013), podali HA dopęcherzowo na zapalenie pęcherza wywołane przez *E. coli*. Oceniając efekt terapeutyczny poddano analizie histologicznej funkcje skurczowo-relaksacyjne mięśnia wypieracza oraz uszkodzenia oksydacyjne tkanki pęcherza, po 8 dniach leczenia. Zaobserwowano, że podanie kwasu hialuronowego odwróciło zmiany wywołane przez bakterie. Odnotowano, nie tylko gojenie się nabłonka, ale także obniżenie się progu skurczu i zmniejszenie stresu oksydacyjnego, podczas gdy gentamycyna wpływała jedynie na hamowanie infiltracji komórek zapalnych.

3.4 Antybakteryjne nanożele o kontrolowanym uwalnianiu substancji aktywnej

GRAS są to związki uwzględnione na liście ogólnie uznawanych za bezpieczne przez Amerykańską Agencję ds. Żywności i Leków. Wykorzystywanie biologicznie pozyskiwanych i biodegradowalnych związków GRAS jest atrakcyjną strategią w projektowaniu i wytwarzaniu nanomateriałów z uwzględnieniem zasad zielonej chemii. Ponadto, związki te są często niedrogie oraz łatwo dostępne. Dodatkowo istnieje większe prawdopodobieństwo dopuszczenia przez organy regulacyjne materiału zbudowanego z GRAS niż syntetycznych analogów. Na liście GRAS znaleźć można kwas hialuronowy (HA) oraz ϵ -poli-L-lizynę (PLL). Związki te wykorzystali Simonson i in. (2019) w celu wytworzenia nanoonośnika o kontrolowanym uwalnianiu substancji aktywnej, który byłby dostarczany do komórek ssaczych lub bakteryjnych za pomocą uzupełniających się mechanizmów zależnych od warunków biologicznych.

Nanożel został przygotowany poprzez elektrorozpylanie kwasu hialuronowego do kąpieli ϵ -poli-L-lizyny (PLL). W efekcie otrzymano stabilną monodispersyjną zawiesinę. Wytworzone cząstki miały średnicę około 120 nm – niezależnie od warunków podczas elektrorozpylania. Wybrano taką metodę syntezy, ze względu na jej prostotę, oraz eliminację powszechnie używanych, toksycznych rozpuszczalników, przez co redukcji uległy również koszty, przy jednoczesnej dość znacznej wydajności (kilka gram żelu ~ 1 godzina).

Charakterystyka otrzymanego materiału pokazuje, że ma wysoce elektryczny ładunek powierzchniowy (-35 mV), co sugeruje, że cząstki prawdopodobnie składają się z anionowej powłoki HA otaczającej rdzeń bogaty w PLL. Całość, utrzymywana zarówno przed, jak i po spęczeniu w buforze PBS, jest homogeniczna, bez widocznej fragmentacji lub aglomeracji cząstek. Matryca pęcznieje, aż do osiągnięcia krytycznego progu gęstości usieciowania i utraty integralności cząstek. Co więcej, czas potrzebny do degradacji nanożelu jest liniowo zależny od stosunku stechiometrycznego jonów „COO⁻„ HA: „NH₃⁺” PLL stosowanych podczas ich syntezy. Sumaryczne wyniki wskazują, że można kontrolować gęstość usieciowania nanożelu, a dzięki temu także monitorować pęcznienie cząstek w warunkach fizjologicznych zapewniając precyzyjne uwolnienie zamkniętego ładunku PLL.

W następnym etapie dokonano oceny aktywności antybakteryjnej leków o różnych ładunkach molekularnych: chemoterapeutyczna doksorubicyna (DOX) i antybiotyk wankomycyna (VAN) wobec Gram-ujemnych (*P. aeruginosa*, *E. coli*, *Acinetobacter baumannii*, *Salmonella enterica*) i Gram-dodatnich (*S. aureus*) bakteryjnych patogenów.

Aktywność VAN wobec wszystkich bakterii Gram-ujemnych, prowadząca do zahamowania wzrostu bakterii została zarejestrowana tylko przy najwyższym jej stężeniu - 144 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Oporność bakterii na ten lek, wynika z ich budowy, dokładniej z posiadania dodatkowej zewnętrznej błony, która stanowi barierę zapobiegającą jego dyfuzji (posiada ograniczoną przepuszczalność). Natomiast lek silnie zabija kontrolny szczep Gram-dodatni *S. aureus* (minimalne stężenie hamujące = 4,5 $\mu\text{g ml}^{-1}$). Z drugiej strony, nie odnotowano toksycznego działania na bakterie nieobciążonych nanożeli sugerując, że zastosowanie samego nośnika nie jest wystarczające do wywołania znaczącej aktywności przeciwdrobnoustrojowej. Jednakże, wprowadzenie VAN do nanożelu doprowadziło do 4-krotnego zwiększenia aktywności wobec bakterii Gram-ujemnych oraz 15-krotnego w stosunku do bakterii Gram-dodatniej w porównaniu z wolną VAN. Wskazuje to na synergizm działania HA, PLL i VAN. Badacze tłumaczą mechanizm w ten sposób, że HA – jako składnik macierzy pozakomórkowej ssaka, jest wykorzystywany przez patogeny jako źródło węgla podczas inwazji i replikacji tkanek, przez co może preferencyjnie przyciągać bakterie do powierzchni nanożelu.

Z kolei łańcuchy boczne PLL oddziałują z fosfolipidami z powierzchni błony bakterii, zwiększając jej przepuszczalność i powodując późniejsze rozerwanie ściany komórkowej. Ostatecznie „osłabiona” bakteria jest narażona na uwalniającą się z matrycy VAN.

Podobne zależności uzyskali Makvandi i in. (2019), którzy przygotowali termoczułe i iniecyjne hydrożele na bazie kwasu hialuronowego (HA), wyciągu z jedwabiu kukurydzianego (CSE) i nanosrebra, jako potencjalne materiały do leczenia ran. Do badań wykorzystano zawiesiny komórek bakteryjnych bakterii Gram-dodatnich *S. aureus*, *P. aeruginosa* i Gram-ujemnych *Bacillus subtilis*, *E. coli*. Pomimo doniesień, iż HA i CSE posiadają właściwości przeciwbakteryjne, przy niskim stężeniu nanosrebra ($0,85 \mu\text{g ml}^{-1}$) próbki nie wykazywały aktywności przeciwbakteryjnej wobec *E. coli* i *B. subtilis*, ale zaobserwowano znaczny procent redukcji bakterii Gram-dodatnich. Ostatecznie dowiedziono, że próbki zawierające nanocząstki srebra $\geq 1,7 \mu\text{g ml}^{-1}$ działają hamująco na rozrost (około 100%) wszystkich badanych mikroorganizmów.

Eksperyment przeprowadzony przez zespół badaczy Chen i in. (2020) również nie wykazał aktywności przeciwbakteryjnej „samego” kwasu hialuronowego, ale nabył je w wyniku reakcji N-fluorowcowania w wodzie, w temperaturze pokojowej, przy użyciu HA i czynnika N-halogenującego (tj. NaClO). W rezultacie otrzymano antybakteryjny hydrożel (NCHA) do zaawansowanych zastosowań antybakteryjnych *in vitro* i *in vivo*. Stwierdzono, że, HA prawie nie ma zdolności bójczych wobec dwóch modelowych bakterii (*E. coli*, *S. aureus*) w warunkach eksperymentalnych. Jednak nie zaobserwowano przeżywalności bakterii obu szczepów na płytkach z NCHA, co wskazuje na jego silne działanie hamujące aktywność bakteryjną, dzięki właściwościom utleniającym utworzonych grup N-Cl. Obserwacja morfologii bakterii przed i po kontakcie z NCHA przy użyciu techniki SEM wykazała zniszczenie ich struktury po leczeniu. Ponadto, aby dokonać oceny skuteczności terapeutycznej N-chlorowanego HA wobec *S. aureus in vivo* zastosowano model mysiej infekcji rany skóry. Porównano efekt wywierany przez modyfikowany i niemodyfikowany HA. Po czterech dniach zaobserwowano znaczne obkurczenie się rany (nieco większe dla NCHA), w porównaniu z ranami nieleczonymi, co przypisano wysokiej zdolności wiązania wody przez HA, sprzyjającej gojeniu się rany i regeneracji nabłonka w jej obrębie. Ponadto, badania tkanki naskórka i krwi myszy wykazały, iż tylko w NCHA przeżywalność bakterii jest znacznie zmniejszona co świadczy o dobrej aktywności przeciwbakteryjnej NCHA wobec bakterii *in vivo*.

Natomiast w wytworzonych metodą odlewania-odparowywania żelowych nanokompozytach z hialuronianu (HA) i chitozanu (Ch) o ulepszonych właściwościach mechanicznych, właściwości przeciwbakteryjne również zostały przypisane substancji dodatkowej, tj. Ch (Abdelrahman i in. 2020). Badania przeprowadzono wobec bakterii Gram-ujemnych (*E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*) i Gram-dodatnich (*B. subtilis*, *Streptococci*). Natywny biofilm HA nie miał właściwości przeciwbakteryjnych wobec wymienionych typów bakterii. Jednakże zaobserwowano strefę hamowania po wprowadzeniu do matrycy Ch. Dodatkowo odnotowano jej powiększanie podczas zwiększenia stężenia Ch w zakresie 1 do 50%. Wyniki odnotowane względem bakterii Gram-ujemnych są nieco lepsze niż w przypadku bakterii Gram-dodatnich. W związku z tym zaproponowano potencjalne mechanizmy działania antybakteryjnego chitozanu oparte na (i) zaburzeniach błony komórkowej bakterii, (ii) zaburzeniach syntezy RNA i białek w wyniku przenikania do jądra, (iii) zahamowaniu wzrostu bakterii i produkcji toksyn po połączeniu Ch z metalami.

4. Podsumowanie

Kwas hialuronowy jest szeroko wykorzystywany przez koncerny medyczne, w różnego rodzaju preparatach żelowych, gdzie spełnia rolę antybakteryjną, lub w połączeniu z innymi związkami (w tym z lekami) potęguje tą aktywność. Zachowanie bio-reagujące pozwala nanożelom na zwiększenie aktywności różnych obciążonych bioczuźników i leków, tym samym stanowi potencjalną platformę teranostyczną o szerokich zastosowaniach w dostarczaniu leków i obrazowaniu biomedycznym. Ponadto, wszystkie opisane materiały wykazują znaczną biokompatybilność oraz brak cytotoksyczności, dzięki czemu mogą być z powodzeniem stosowane w regeneracji tkanek, jako materiały opatrunkowe oraz w postaci płynnych/żelowych leków bądź ich nośników. Dzięki niezwyklej łatwości i prostocie modyfikacji, a także ze względu na możliwość

występowania synergizmu właściwości w połączeniu z innymi materiałami, stanowi on idealną matrycę do opracowywania kolejnych zastosowań przez wzgląd na wysoki poziom kontroli właściwości wytwarzanych materiałów.

Jednakże, ocena antybakteryjności preparatów na bazie kwasu hialuronowego, pozostaje kwestią sporną. W związku z tym konieczne jest przeprowadzanie dalszych badań wobec bakterii zarówno metodami *in vitro*, jak i *in vivo*. Należałoby się także przyjrzeć dokładniej pochodzeniu HA, gdyż jest prawdopodobne, że może mieć istotny wpływ na właściwości przeciwdrobnoustrojowe.

5. Literatura

- Abdelrahman RM, Abdel-Mohsen AM, Zboncak M i in. (2020) Hyaluronan biofilms reinforced with partially deacetylated chitin nanowhiskers: Extraction, fabrication, in-vitro and antibacterial properties of advanced nanocomposites. *Carbohydr Polym.* 235: 115951.
- Al-Shammari NM, Shafshak SM, Ali MS (2018) Effect of 0.8% hyaluronic acid in conventional treatment of moderate to severe chronic periodontitis. *J Contemp Dent Pract.* 19:527–534.
- Binshabaib M, Aabed K, Alotaibi F i in. (2020) Antimicrobial efficacy of 0.8% hyaluronic acid and 0.2% chlorhexidine against *porphyromonas gingivalis* strains: An in-vitro study. *Pak J Med Sci.* 36(2): 111–114.
- Bračič M, Šauperl O, Strnad S i in. (2019) Surface modification of silicone with colloidal polysaccharides formulations for the development of antimicrobial urethral catheters. *Appl Surf Sci* 463: 889–899.
- Chen W, Zhu Y, Zhang Z i in. (2020) Engineering a multifunctional N-halamine-based antibacterial hydrogel using a super-convenient strategy for infected skin defect therapy. *Chem Eng J* 379: 122238.
- Del Hoyo-gallego S, Pérez-Álvarez L, Gómez-Galván F, i in. (2016). Construction of antibacterial poly (ethylene terephthalate) films via layer by layer assembly of chitosan and hyaluronic acid. *Carbohydr Pol* 143: 35–43.
- Gour N, Ngo KX, Vebert-Nardin C (2014) Anti-infectious surfaces achieved by polymer modification. *Macromol Mater Eng* 299(6): 648–668.
- Iarikov DD, Kargar M, Sahari A i in. (2014) Antimicrobial surfaces using covalently bound polyallylamine. *Biomacromol* 15: 169–176.
- Ivanova EP, Hasan J, Webb HK i in. (2012) Natural bactericidal surfaces: Mechanical rupture of *Pseudomonas aeruginosa* cells by cicada wings. *Small* 8(16): 2489–2494.
- Jiang T, Xie Z, Wu F (2019) Hyaluronic Acid Nanoparticle Composite Films Confer Favorable Time-Dependent Biofunctions for Vascular Wound Healing. *ACS Biomater Sci Eng* 5(4): 1833–1848.
- Kujawa P, Sanchez J, Badia A i in. (2006) Probing the stability of biocompatible sodium hyaluronate/chitosan nanocoatings against changes in salinity and pH. *J Nanosci Nanotechnol* 6(6): 1565–1574.
- Lee DG, Cho JJ, Park HK i in. (2010) Preventive effects of hyaluronic acid on *Escherichia coli* – induced urinary tract infection in rat. *Urology* 75: 949–954.
- Lv YS, Yao YS, Lin ME i in. (2013) Interleukin-6 levels in female rats with protamine sulfate-induced chronic cystitis treated with hyaluronic acid. *Int J Urol* 20: 1017–22.
- Makvandi P, Ali GW, Della Sala F (2019) Biosynthesis and characterization of antibacterial thermosensitive hydrogels based on corn silk extract, hyaluronic acid and nanosilver for potential wound healing. *Carbohydr Pol* 223: 115023.
- Mero A, Campisi M (2014) Hyaluronic acid bioconjugates for the delivery of bioactive molecules. *Pol*, 6(1): 346–369.
- Riedl CR, Engelhardt PF, Daha KL I in. (2008) H. Hyaluronan treatment of interstitial cystitis/painful bladder syndrome. *Int. Urogynecol. J.* 19: 717–721.
- Simonson AW, Lawanprasert A, Goralski TDP i in. (2019) Bioresponsive peptide-polysaccharide nanogels - A versatile delivery system to augment the utility of bioactive cargo. *Nanomed* 17: 391–400.

- Valverde A, Pérez-Álvarez L, Ruiz-Rubio L i in. (2019) Antibacterial hyaluronic acid/chitosan multilayers onto smooth and micropatterned titanium surfaces. *Carbohydr Pol* 207: 824–833.
- Yıldız N, Alpay H, Tuğtepe H i in. (2015) Intravesical hyaluronic acid treatment improves bacterial cystitis and reduces cystitis-induced hypercontractility in rats. *Int J Urol*. 22(6): 598–603.

13. Rola parametrów powierzchniowych w adhezji i tworzeniu biofilmu przez bakterie

Role of surface parameters in ability of adhesion and biofilm formation by bacteria

Ładniak Agata

Katedra Zjawisk Międzyfazowych, Instytut Nauk Chemicznych, Wydział Chemii, UMCS, Lublin
Opiekun naukowy: dr hab. Agnieszka Ewa Wiącek, prof. UMCS

Ładniak Agata: agata.gozdecka@umcs.pl

Słowa kluczowe: hydrofobowość, chropowatość, topografia, właściwości przeciwpiorostowe

Streszczenie

Chropowatość powierzchni została szeroko opisana jako główny parametr mający wpływ na adhezję bakterii. Ogólnie przyjmuje się, że w pewnym zakresie wartości koreluje ze zdolnością bakterii do przylegania. W szczególności powierzchnie o cechach topograficznych (wgłębienia, rynienki) porównywalnych pod względem wielkości do komórek bakteryjnych (około 1–2 μm) sprzyjają silnemu przyczepieniu się bakterii, przy możliwie największej powierzchni kontaktu między komórkami a podłożem. Jednakże, niektóre badania dowodzą, że otrzymanie materiału o ściśle określonej wartości chropowatości powierzchni nie jest w 100% wystarczające, aby uznać go za antybakteryjny. Poniższy przegląd przedstawia porównanie rodzaju powierzchni, typu modyfikacji, a co za tym idzie topografii oraz zwilżalności na właściwości adhezyjne i filmotwórcze bakterii w warunkach *in vitro* lub/i *in vivo*.

1. Wstęp

Komórki bakteryjne mają tendencję do przylegania do różnych powierzchni, tworząc samoorganizujące się struktury wielokomórkowe zwane biofilmami. Stanowi to poważny problem we współczesnym społeczeństwie zarówno z ekonomicznego, jak i zdrowotnego punktu widzenia. Biorąc pod uwagę, że dojrzałe biofilmy są w stanie funkcjonować jako fizyczna i fizjologiczna bariera przed zabiegami chemicznymi, antybiotykoterapią i mechanizmami obronnymi ludzkiego gospodarza, zapobieganie początkowemu etapowi adhezji, kontrolowanej przez fizyko-chemiczne właściwości (hydrofobowość, chropowatość) oddziałujących powierzchni, jest wysoce pożądane. W wielu badaniach wyjaśniono powinowactwo szeregu szczepów i gatunków bakterii do różnych materiałów w oparciu o ich właściwości powierzchniowe, ale często występują również rozbieżności między obserwacjami eksperymentalnymi a oczekiwaniami teoretycznymi, dając niejednoznaczne i/lub sprzeczne wyniki.

2. Opis zagadnienia

Wiele zespołów badawczych podjęło badania mające na celu określenie, który czynnik w głównej mierze decyduje o adhezji komórek bakteryjnych, a tym samym o zdolności tworzenia biofilmu. Naukowcy poddali pod wątpliwość stwierdzenie, iż same cechy topograficzne oraz zdefiniowana chropowatość są wystarczające do spełnienia warunku antybakteryjności danych powierzchni. Poniższy przegląd przedstawia ostatnie doniesienia literaturowe opisujące dążenia zespołów badawczych do poznania optymalnych parametrów powierzchni, zapewniających funkcjonalność biomateriałów nieodzownych dla w/w preparatów.

3. Przegląd literatury

3.1 Wpływ geometrii elementów powierzchni na początkową lokalizację przylegających komórek

Naukowcy Vadillo-Rodríguez i in. (2018) przeprowadzili badania mające na celu ocenę chropowatości w skali nanometrycznej w aspekcie adhezji bakteryjnej i tworzenia biofilmu, przy użyciu zorganizowanych przestrzennie wzorów mikrotopograficznych powierzchni usieciowanego

polidimetylosiloksanu (PDMS). Ten wysoko biokompatybilny elastomer jest szeroko wykorzystywany w farmacji oraz medycynie. Pełni rolę nośnika substancji aktywnych oraz stanowi dodatek do wyrobów medycznych, np. plastrów opatrunkowych, poprawiając ich stabilność, wytrzymałość oraz polepszając działanie. Tego typu materiały są wysoce narażone na atak ze strony mikroorganizmów. Wśród bakterii najczęściej wywołujących zakażenia, jako efekt kolonizacji urządzeń biomedycznych, znajdują się *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228, ATCC 35983) i *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923, ATCC 29213). Do testów wykorzystano różne powierzchnie o dokładnie określonych, litograficznie wygenerowanych cechach (o głębokości/wysokości 117nm - grupa A i 21,1nm - grupa B), tj. elementy kwadratowe ($6 \times 6 \mu\text{m}$ z przestrzenią je oddzielającą $4 \mu\text{m}$) 1-wklęsłe i 2-wypukłe; kołowe (o średnicy $3 \mu\text{m}$ z odstępem $2 \mu\text{m}$) 3-wklęsłe i 4-wypukłe oraz 5-równoległe kanały (grzbiety o szerokości $2 \mu\text{m}$ oddzielone kanałami o szerokości $3 \mu\text{m}$), które poddano działaniu czterech oportunistycznych patogenów w/w rodzaju. Jako kontrolę zastosowano gładkie próbki wytworzone przez odlewanie polimeru na płaskie płytki krzemowe. Co ważne, zwilżalność wszystkich badanych materiałów plasowała się na tym samym poziomie, na którym kąt zwilżania wody wynosił $108 \pm 7^\circ$, pomimo znacznych różnic w zanotowanych wartościach średniej chropowatości powierzchni, dla kontroli $1,6 \pm 0,5 \text{ nm}$, dla grupy A: $55 \pm 9 \text{ nm}$, a dla grupy B: $9,6 \pm 1 \text{ nm}$. Przedstawione wyniki wykazały, że niezależnie od zastosowanego szczepu początkową adhezję bakterii na powierzchniach PDMS kierowała zasada maksymalizacji punktów kontaktowych powierzchnia-komórka. Oznacza to, że organizmy bakteryjne selektywnie wybierają swoją pozycję do osadzenia, faworyzując narożniki i ściany elementów wgłębionych, aniżeli te wystające, pomimo, iż z punktu widzenia matematycznego dostarczają one takiego samego pola powierzchni. Przy czym, elementy o okrągłym kształcie są szczególnie uprzywilejowane nad kwadratowymi. Stąd, sam fakt dostępności powierzchni nie stanowi czynnika decydującego o adhezji bakteryjnej, a istotny jest także kształt sąsiadujących elementów.

Ponadto oszacowano, że w obrębie jednej próbki 96–100% całkowitej liczby przylegających komórek promuje w/w obszary, niż powierzchnie płaskie. Dane te dotyczą grupy A, natomiast w obrębie grupy B nie zanotowano znaczących różnic pomiędzy poszczególnymi wzorami, co było spowodowane adhezją na znikomym poziomie, uniemożliwiającym wyciągnięcie rzetelnych wniosków. To pokazuje, że mikrotopograficzne cechy powierzchni o wysokości/głębokości nanometrów (tj. o pionowym wymiarze znacznie mniejszym niż rozmiar komórek) są skuteczne w zmniejszaniu adhezji bakteryjnej dla wszystkich badanych szczepów (o 40 – 95% w stosunku do kontroli).

Dodatkową, dość ciekawą obserwacją był fakt osadzania się w zagłębieniach wyłącznie pojedynczych komórek, podczas gdy na płaszczyźnie kontrolnej widoczne były ich agregaty. Spośród zastosowanych szczepów bakteryjnych *S. epidermidis* ATCC 12228 jest niezdolny do tworzenia biofilmu, co potwierdzono brakiem kolonii po 8h inkubacji. W przypadku pozostałych trzech, zaobserwowano obecność jednorodnych wielowarstw komórek, które kolonizowały z jednakowym prawdopodobieństwem całą powierzchnię wszystkich badanych próbek, nie faworyzując żadnej z nich. Niemniej stwierdzono, że praktycznie wszystkie wzory powierzchni wywoływały statystycznie znaczące zmniejszenie pokrycia powierzchni biofilmem w stosunku do gładkich próbek. W odniesieniu do kontroli powierzchnie grupy A redukowały tworzenie biofilmu o 22 – 32%, natomiast grupy B – dalej hamowały lub opóźniały wzrost komórek do 43 – 58%. Różnice stwierdzone w pokryciu powierzchni biofilmem pomiędzy grupami powiązano z różną liczbą początkowo przylegających komórek i/lub dostępną, sąsiadującą powierzchnią zdolną do przyłączenia kolejnych mikroorganizmów.

Wypukłe, kwadratowe wzory wykorzystali do swoich badań także Hou i in. (2011), przy czym operowali oni długością boku ($L=2, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 100 \mu\text{m}$) i odległością pomiędzy nimi ($D=5, 10, 15, 20 \mu\text{m}$), natomiast ich wysokość pozostawała niezmienna $10 \mu\text{m}$. Jako podłoże zastosowali polidimetylosiloksan (PDMS), a do oceny właściwości antyadhezyjnych i przeciwporostowych posłużyła *Escherichia coli*. Stwierdzono, bakteria preferencyjnie przyłącza się i tworzy biofilmy w dolinach między wystającymi elementami, nawet gdy wymiar płaskowyzów (górna część kwadratowych elementów) jest znacznie większy niż doliny. Co ciekawsze, zauważono, że istnieje próg wymiaru wystających elementów, tj. $20 \times 20 \mu\text{m}$, który zapewnia efektywną adhezję

bakteryjną. Nie zaobserwowano istotnych statystycznie zmian w średnim pokryciu powierzchni, gdy długość boku wzrosła z 5 do 15 μm , natomiast drastyczny przyrost biofilmu wystąpił, gdy L wzrosło do 20 μm . Dalsze zwiększanie L nie doprowadziło do znaczącej zmiany pokrycia powierzchni, która była zbliżona do tej na gładkich powierzchniach PDMS. Taką tendencję stwierdzono dla każdego badanego D, co sugeruje, że wzorce mikrotopograficzne ułatwiają komórkom osiadającym w dolinach bliskie oddziaływanie i tworzenie gęstszych biofilmów. Aby wykluczyć w tym zdarzeniu efekt grawitacji, a uznać jedynie preferencję pozycji do adhezji przetestowano te same wzory wystawiając je na działanie bakterii „do góry nogami”. Zgodnie z poprzednimi wynikami stwierdzono, że *E. coli* nadal preferowały przymocowanie do dolin, niż do szczytów wystających wzorów, z tym, że wymiar progowy wyniósł 40×40 μm .

Z kolei Chien i in. (2020) zbadali mikrotopografię i cechy powierzchni skóry rekina (z gat. *Ostronotus atlanticus*) pokrytej łuskami o ząbkowatym kształcie (z obszaru brzucha przy ogonie (A) i płetwy piersiowej (F)) oraz jej repliki wykonanej z polimetakrylanu metylu (PMMA). Zbadano wpływ właściwości powierzchni na adhezję i tworzenie biofilmu przez bakterie *S. aureus* i *E. coli*. Skóra oraz jej replika z części A charakteryzowała się znacznie większymi nierównościami: wysokość grzbietu zębów $11,83 \pm 1,25 \mu\text{m}$ oraz ich gęstością $118,84 \pm 5,77$ zębów mm^{-2} (średnia chropowatość powierzchni R_a $6,08 \pm 0,44 \mu\text{m}$) i nieco wyższym kątem zwilżania wody θ $105,1 \pm 2,6^\circ$, podczas gdy obszar F wykazywał odpowiednio: $7,48 \pm 1,28 \mu\text{m}$, $83,57 \pm 4,02$ zębów mm^{-2} (R_a $3,57 \pm 0,79 \mu\text{m}$) i θ $100,8 \pm 1,1^\circ$. Jako kontrolę zastosowano gładką powierzchnię PMMA (R_a $0,17 \pm 0,02 \mu\text{m}$, θ $73,78 \pm 1,69^\circ$). Pierwszego dnia zaobserwowano ograniczoną ilość obu bakterii na gładkiej kontroli i na wszystkich wzorzystych powierzchniach. Biofilm stopniowo rozwijał się na gładkiej powierzchni przez 7 dni, a po 14 dniach był już wyraźnie widoczny, podczas gdy powierzchnie przypominające skórę rekina nie wykazały żadnych oznak rozwoju lub tworzenia się biofilmów.

3.2 Wpływ zwilżalności i rodzaju modyfikacji powierzchni na zdolności porostowe bakterii

De-la-pinta i in. (2019) oceniali wpływ chropowatości różnych powierzchni (tytanowych (Ti), poliwęglanowych (PC), silikonowych (SI), borokrzemowych (BS), poliuretanowych (PU) i teflonowych (TE)), które jednocześnie wykazywały zmienną zwilżalność, na zdolność do tworzenia biofilmu przez *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *S. epidermidis* i *Candida albicans*, oraz wpływ generowania różnej topografii powierzchni w dyskach PU na rozwój biofilmu *S. epidermidis*. Różnice chropowatości były efektem szlifowania za pomocą papieru z węgliku krzemu o różnych stopniach ziarnistości: 320, 800, 1200 i 4000. Zauważono, że im drobniejsze ziarna karborundu, tym obrabiany materiał wykazuje niższą wartość średniej arytmetycznej wysokości powierzchni (R_a) i kąta zwilżania wody (θ), tj. dla SiC 320: R_a $1,88 \mu\text{m}$, θ $130,09 \pm 2,80^\circ$; SiC 800: R_a $1,08 \mu\text{m}$, θ $130,89 \pm 3,59^\circ$; SiC 1200: R_a $0,51 \mu\text{m}$, θ $119,05 \pm 1,76^\circ$; SiC 4000: R_a $0,38 \mu\text{m}$, θ $108,41 \pm 4,48^\circ$, podczas gdy powierzchnia nieobrabiana wykazywała R_a $0,34 \mu\text{m}$ i θ $103,84 \pm 0,93^\circ$. Ilość biofilmu *S. epidermidis* wyrażona za pomocą logarytmu gęstości przybrała wartości od 6,65 CFU cm^{-2} (dla powierzchni o R_a $0,38 \mu\text{m}$) do 7,45 CFU cm^{-2} (dla powierzchni o R_a $1,88 \mu\text{m}$). Co ciekawe, chropowatość wpłynęła na obciążenie biofilmem tylko modyfikowanych materiałów, bowiem oryginalny dysk bez szlifowania (o najniższym R_a) posiadał pośrednie stężenie biofilmu, wykluczając jakoby była jedynym parametrem decydującym o przyleganiu bakterii. Potwierdzono to w kolejnym etapie badań, uwzględniając materiały o dużo niższej hydrofobowości (Tab.1).

Wykazano, że Ti materiał o pośrednich wartościach chropowatości i hydrofobowości, był najbardziej odporny na tworzenie biofilmu przez hydrofilowe bakterie *C. albicans* i *E. coli*. Z kolei, wobec hydrofobowych bakterii *S. epidermidis* i *P. aeruginosa* efekt był nieco słabszy i porównywalny do efektu wywieranego przez krążki szkła borokrzemowego. Niemniej jednak wyniki uzyskane dla obu powierzchni były najlepsze spośród przebadanych próbek. Z drugiej strony TE i SI o wysokich wartościach kąta zwilżania wody, jednocześnie różniących się drastycznie parametrem R_a , stwarzały najkorzystniejsze warunki do wzrostu wszystkich użytych bakterii. Ponadto na powierzchniach Ti i BS odnotowano znacznie mniej obfite biofilmy, niż na hydrofobowych TE i SI.

Znaczący wpływ zwilżalności i rodzaju obróbki powierzchni na zdolność do tworzenia się biofilmu potwierdzili także Han i in. (2018). Do testów wykorzystano dyski dwutlenku cyrkonu, które poddano modyfikacji (sterylizacji w autoklawie parowym (SA), sterylizacji na sucho (DH), napromieniowaniu ultrafioletem C (UVC) i promieniowaniem gamma (γ)), otrzymując materiały o zbliżonych wartościach średniej chropowatości powierzchni i jednocześnie różniących się zwilżalnością (Tab.2). Właściwości przeciwpowrostowe oceniono względem *S. aureus* oraz *Porphyromonas gingivalis*. Tworzenie biofilmu *S. aureus* oceniono po 2 dniach wzrostu, natomiast *P. gingivalis* – po 7.

Tab. 1. Średnia wartość chropowatości powierzchni (Ra) oraz jej zwilżalność wyrażona kątem zwilżania wody (θ).

Parametr	Biomaterial					
	TE	SI	PU	PC	Ti	BS
Ra [μm]	3,81	0,08	0,34	0,96	0,29	0,03
θ [°]	111.64 $\pm$	108.05 $\pm$	103.84 $\pm$	76.63 $\pm$	55.18 $\pm$	20.88 $\pm$
	5.15	2.69	0.93	7.02	19.63	4.82

Tab. 2. Charakterystyka powierzchni tlenku cyrkonu po modyfikacji (Ra – średnia chropowatość powierzchni, θ – kąt zwilżania wody).

Parametr	Modyfikacja				
	kontrola	SA	DH	UVC	γ
Ra [μm]	0,24 $\pm$	0,22 $\pm$	0,22 $\pm$	0,18 $\pm$	0,22 $\pm$
	0,08	0,08	0,08	0,03	0,03
θ [°]	100,24 $\pm$	92,03 $\pm$	96,14 $\pm$	81,58 $\pm$	69,89 $\pm$
	2,48	4,52	3,08	1,14	0,17

Wyniki wykazały, że ilość wyhodowanego biofilmu *S. aureus* na powierzchni tlenku cyrkonu poddanego sterylizacji promieniowaniem γ była znacznie wyższa niż DH. Pomiędzy wartościami uzyskanymi dla SA i UVC nie stwierdzono istotnych różnic, które plasowały się na średnim poziomie. Natomiast w przypadku *P. gingivalis* największą ilość biofilmu odnotowano na ZrO₂-UVC, zaś najmniejszą na ZrO₂-DH. Najwyższą zdolność przeciwpowrostową próbek DH przypisuje się mniejszej liczbie grup OH⁻ na powierzchni tlenku, utraconych w wyniku modyfikacji, a których obecność jest niezwykle korzystna dla adsorpcji białek adhezyjnych komórek bakteryjnych.

Poza tym Chan i in. (2018) dowiedli, że indukowana laserowo chropowatość powierzchni i topografia (w skali mikrometrycznej) mają niewielki wpływ na przyczepianie się bakterii *S. aureus*. Komercyjna próbka stopu niklowo-tytanowego Ni-Ti (Ra 1,2 μm , θ 68,4°) efektywniej pokryła się biofilmem w porównaniu do wypolerowanej próbki (Ra 0,1 μm , θ 73,2°), co wyjaśniono wyższym stężeniem niklu (toksycznego dla mikroorganizmów) na polerowanej powierzchni. Natomiast obie powierzchnie poddane obróbce laserowej, tj. LT40W (Ra 0,7 μm , θ 61,4°) i LT45W (Ra 1,1 μm , θ 57,5°) skutecznie ograniczyły przyczepianie się bakterii i tworzenie się biofilmu, ale nie odnotowano istotnych różnic pomiędzy nimi. Oznacza to, że chropowatością i topografią tych powierzchni nie można wytłumaczyć słabego rozwoju biofilmu. Ostatecznie działanie przeciwbakteryjne badanych powierzchni przypisano tlenkom formującym się podczas obróbki laserowej, które przyniosły pożądane zmiany w chemii powierzchni Ni-Ti.

3.3 Porównanie badań przeciwpowrostowych *in vitro* i *in vivo*

Naukowcy Bevilacqua i in. (2018) scharakteryzowali wpływ chropowatości modyfikowanej (obróbka: mechaniczna (M), laserowa (LT), piaskowanie (SB)), tytanowej powierzchni implantów zębowych na zdolność do tworzenia biofilmu w warunkach *in vitro* przez *P. aeruginosa* ATCC 27853 i bakterie ślinowe od dawców-ochotników oraz *in vivo* poprzez ekspozycję krążków tytanowych

w jamie ustnej zdrowych ochotników. W testach *in vitro*, część modyfikowanych próbek tytanu inkubowano w jałowej ślinie, a następnie poddano inkubacji z *P. aeruginosa*, natomiast pozostałe bezpośrednio (bez wstępnego powlekania śliną) wystawiono na działanie mieszanych bakterii ślinowych (MSB) *P. aeruginosa*. MSB przygotowano przez zmieszanie równych ilości śliny zebranej od trzech zdrowych ochotników. Jednocześnie dokonano inkubacji bakterii *P. aeruginosa* ATCC 27853 i MSB na szkiełkach w celu charakterystyki wizualnej tworzącego się biofilmu. Eksperyment wykazał, że biofilm utworzony przez MSB wyglądał na znacznie bardziej złożony, niż ten uformowany przez samą *P. aeruginosa*, zawierając komórki o różnych morfologiach pogrupowane w klastry lub filamenty.

Analiza biofilmu utworzonego *in vitro* przez *P. aeruginosa* na powierzchniach bez wstępnego powlekania śliną wykazała, że bakteria ta produkuje więcej biomasy i rozwija grubsze biofilmy na powierzchniach tytanowych LT i SB w porównaniu do M w kolejności M<LT<SB. Sugeruje to, że gładkie powierzchnie są trudniejsze do zasiedlenia niż chropowate. Wstępne powlekanie śliną powodowało zwiększenie przyczepności bakterii i produkcji biofilmu, przy czym największe zmiany odnotowano dla powierzchni M. Natomiast mieszanina MSB wytworzyła nieco mniejsze ilości biofilmu w porównaniu do *P. aeruginosa*, a powlekanie śliną miało wpływ jedynie na powierzchnię SB, powodując zmniejszenie „produkcji”. Mogło to być spowodowane zatrzymywaniem śliny przez mikrowgłębienia powierzchni wytworzone podczas modyfikacji. Badania te sugerują, że w środowisku jamy ustnej różnice w przyczepności i tworzeniu biofilmu między powierzchniami o różnej chropowatości mogą być zmniejszone przez obecność śliny, przynajmniej dla niektórych gatunków bakterii.

Wyniki zamieszczone w poniższej tabeli (Tab.3) wskazują, że rodzaj obróbki powierzchni tytanu, a co za tym idzie, jej chropowatość nie wpływają w znaczący sposób na ilość i grubość tworzącego się biofilmu. Niemniej jednak eksperymenty *in vivo* wykazały, że bakteryjna kolonizacja tarcz tytanowych rozpoczyna się w miejscach, w których występują rowki lub dziury. Rezultaty te są sprzeczne z wynikami uzyskanymi dla *P. aeruginosa in vitro*, potwierdzając że w jamie ustnej obecne są różne gatunki bakterii posiadające różne preferencje do adhezji i tworzenia biofilmu. Stwierdzono zatem, że chropowatość powierzchni i topografia wpływają tylko na wczesne etapy rozwoju biofilmu, szczególnie na początkowym etapie przylegania bakterii, przy czym największy wpływ odnotowano dla bakterii jednego rodzaju niż dla mieszaniny drobnoustrojów.

Tab. 3. Charakterystyka powierzchni tytanowych oraz wyhodowanych biofilmów w środowisku *in vivo* (Ra – chropowatość powierzchni).

Obróbka	Ra [μm]	Biofilm					
		Dzień 1			Dzień 4		
		Adhezja	Ilość [μm ³ μm ⁻²]	Średnia grubość [μm]	Adhezja	Ilość [μm ³ μm ⁻²]	Średnia grubość [μm]
M	0,5-1	wzdłuż rowków	≈ 22	≈ 33	Cały dostępny obszar	≈ 33	≈ 39
LT	0,4	w otworach (całkowicie wypełnione)	≈ 25	≈ 34	Cały dostępny obszar	≈ 33,5	≈ 39
SB	2,0	losowe	≈ 24	≈ 34	Cały dostępny obszar	≈ 32	≈ 37

Podobne badania przeprowadzili Di Salle i in. (2018). Naukowcy również wykorzystali powierzchnie tytanowe do oceny zdolności przeciwporostowej wobec szczepów referencyjnych *P.*

aeruginosa PAO1 (ATCC[®]BAA-47[™]), *S. aureus* (ATCC[®]25923) oraz wobec bakterii *Streptococcus* spp., *Bacteroides fragilis* i *S. epidermidis* wyizolowanych ze śliny 3 ochotników. Z tą różnicą, że zastosowane dyski tytanowe przed i po obróbce wykazywały chropowatość rzędu nanometrów. Średnia wartość chropowatości powierzchni po poszczególnych modyfikacjach wynosiła: kontrola – 134,2±8,0nm, pasta ścierna do polerowania DZ – 86,2±4,1nm, skaler ultradźwiękowy – 174,3±13,7nm, kireta stomatologiczna – 82,4±15,7nm, polerowanie powietrzem – 179,7±7,3nm. Zastosowane materiały mogą powodować uszkodzenia implantu uzyskiwane podczas codziennego stosowania. Spośród nich wyróżniła się pasta ścierna DZ, która przyczyniła się do wytworzenia nieco mniejszej ilości biofilmu wśród wszystkich zastosowanych szczepów. Jednakże, pomimo pewnych różnic w wartościach CFU (wskaźnik kolonizacji bakteryjnej; log₁₀ jednostki tworzącej kolonię) dla poszczególnych modyfikowanych próbek, nie zaobserwowano statystycznie istotnej redukcji biofilmu, co wskazuje na brak jakiegokolwiek istotnego powinowactwa do konkretnej powierzchni implantu.

Ponadto, Ionescu i in. (2018), podczas sprawdzania wpływu różnych warunków utwardzania kompozytów na bazie żywicy (RCB) na tworzenie biofilmu *in vitro* przez *Streptococcus mutans* i mieszaną mikroflorę jamy ustnej, także wykazali, że chropowatość nie wywiera wpływu na tworzenie biofilmu, gdy powierzchnie wstępnie kondycjonowano śliną. Wykorzystano dwa RBC: 1-kompozyt na bazie aluminium, baru i fluoru, 2- SiO₂ i ZrO₂, które poddano utwardzaniu powietrzem (Air), argonem (Ar), azotem (N) i gliceryną (Gly). W grupie 1 nie odnotowano znaczących różnic w średniej chropowatości powierzchni, odpowiednio: 1,046±0,158μm, 0,918±0,351μm, 0,968±0,530μm, 1,088±0,280μm, podczas gdy w 2 wystąpiły pewne rozbieżności, odpowiednio: 0,866±0,261μm, 1,336±0,254μm, 1,660±0,220μm, 1,469±0,240μm. Biorąc pod uwagę powierzchnie bez wstępnego kondycjonowania śliną, w RBC 1 utwardzanie N dawało najmniejszą efektywność w tworzeniu biofilmu *S. mutans*, a w grupie RBC 2 – utwardzanie Air zredukowało tworzenie biofilmu zarówno przez *S. mutans*, jak i mieszaną mikroflorę śliny ludzkiej. Dodatkowo, na powierzchniach RBC 1 po modyfikacji Ar i N odnotowano znacznie mniej *S. mutans*, niż na RBC 2. Natomiast nie wykryto żadnej zależności pomiędzy rodzajem RBC a warunkami obróbki powierzchni przy wstępnym kondycjonowaniu śliną.

Ta sama grupa naukowców (Ionescu i in. 2018) zauważyła wzmocnienie właściwości przeciwpowrostowych powierzchni tytanowych po obróbce laserowej (Ra 0,62±0,07μm, z wgłębieniami o średnicy 18-20μm) zarówno w badaniach *in vitro* z wykorzystaniem mikroflory jamy ustnej ochotników, jak i *in situ* (implanty noszone przez nich przez 48h), w odniesieniu do innych metod modyfikacji (obróbka mechaniczna: Ra 0,35±0,14μm i piaskowanie: Ra 0,84±0,07μm). Zaobserwowano podobny wzór tworzenia biofilmu w obu typach eksperymentu, tj. bardzo efektywne tworzenie się biofilmu na piaskowanych próbkach, całkowicie pokrywającego ich powierzchnie. Tytan obrobiony mechanicznie sprzyjał formowaniu mikrokolonii, a obrobiony laserowo wykazał kolonizację drobnoustrojów skoncentrowaną na brzegach wgłębień, z bardzo małą liczbą komórek, głównie ziarniaków, przylegających do wewnętrznych części jam.

4. Podsumowanie

Duża część wiedzy na temat formowania biofilmu na powierzchniach implantów opiera się na eksperymentach *in vitro*, które są łatwe do wykonania i zapewniają kontrolę warunków dla rozwoju prostych populacji bakterii, które składają się z jednego lub kilku gatunków. Jednak w infekcjach, np. skórnych czy jamy ustnej, społeczność drobnoustrojów jest złożona i występują setki gatunków, z których każdy ma własne preferencje do określonego mikrośrodowiska. Tak więc oddziaływania bakterii z powierzchniami implantu *in vivo* są znacznie bardziej złożone niż *in vitro*. Dlatego też, określenie wpływu chropowatości/topografii, zwilżalności, składu chemicznego powierzchni na zdolności adhezyjne i rozwój biofilmu *in vivo* wymaga odpowiedniego podejścia, do każdego przypadku indywidualnie. Stąd, przy projektowaniu nowych materiałów do budowy urządzeń biomedycznych należy wiernie odtworzyć/zachować warunki naśladujące rzeczywiste środowisko, w którym będzie użytkowane, aby wyniki były miarodajne.

5. Literatura

- Bevilacqua L, Milan A, Del Lupo V i in. (2018) Biofilms developed on dental implant titanium surfaces with different roughness: comparison between in vitro and in vivo studies. *Curr Microbiol* 75, 766-772.
- Chan CH, Carson L, Smith GC (2018) Fibre laser treatment of martensitic NiTi alloys for load-bearing implant applications: Effects of surface chemistry on inhibiting *Staphylococcus aureus* biofilm formation. *Surf Coat Technol* 349: 488-502.
- Chien HW, Chen XY, Tsai WP i in. (2020) Inhibition of biofilm formation by rough shark skin-patterned surfaces. *Colloids Surf B* 186: 110738(1-9).
- De-la-Pinta I, Cobos M, Ibarretxe J i in. (2019) Effect of biomaterials hydrophobicity and roughness on biofilm development. *J Mater Sci: Mater Med* 30: 77(1-11).
- Di Salle A, Spagnuolo G, Conte R i in. (2018) Effects of various prophylactic procedures on titanium surfaces and biofilm formation. *J Periodontal Implant Sci.* 48(6): 373-382.
- Han A, Tsoi JKH, Matinlinna JP i in. (2018) Effects of different sterilization methods on surface characteristics and biofilm formation on zirconia in vitro. *Dental Mat* 34(2): 272-281.
- Hou S, Gu H, Smith C i in. (2011) Microtopographic patterns affect *Escherichia coli* biofilm formation on poly(dimethylsiloxane) surfaces. *Langmuir* 27(6): 2686-2691.
- Ionescu AC, Brambilla E, Azzola F i in. (2018) Laser microtextured titanium implant surfaces reduce in vitro and in situ oral biofilm formation. *PLoS One.* 13(9): e0202262(1-19).
- Ionescu AC, Cazzaniga G, Ottobelli M i in. (2018) In vitro biofilm formation on resin-based composites cured under different surface conditions. *J Dent* 77: 78-86.
- Vadillo-Rodríguez V, Guerra-García-Mora AI, Perera-Costa D i in. (2018) Bacterial response to spatially organized microtopographic surface patterns with nanometer scale roughness. *Colloids Surf B* 169: 340-347.

14. Pęcherzyki błonowe – jeden z mechanizmów antagonistycznych oddziaływań międzykomórkowych

Część I: charakterystyka pęcherzyków błonowych i ich udział w patogenezie bakteryjnej

Membrane vesicles – antagonistic effect of intercellular communication

Part 1: membrane vesicles characterization and the role in bacterial pathogenesis

Adrian Macion

Uniwersytet Warszawski; Wydział Biologii
Studenckie Koło Naukowe Biologii Molekularnej
ul. I. Miecznikowa 1; 02-096 Warszawa
Opiekun naukowy: prof. dr hab. Dariusz Bartosik

Macion Adrian: az.macion@student.uw.edu.pl

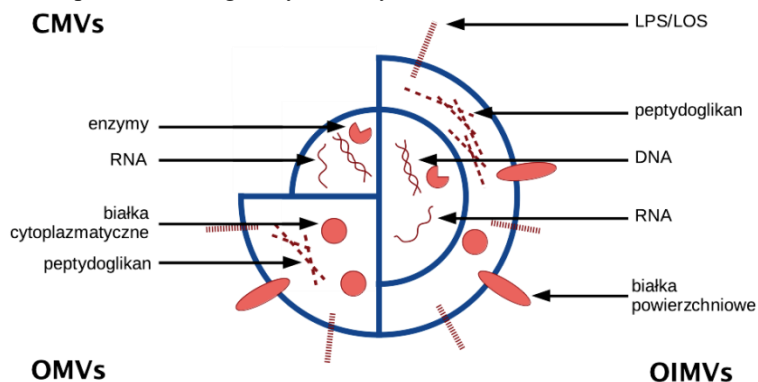
Słowa kluczowe: bakterie patogenne, czynniki wirulencji, mechanizmy patogenyzy, sekrecja białek

Streszczenie

Zarówno bakterie wolnożyjące, jak i symbiotyczne oraz patogenne wytwarzają pęcherzyki błonowe (MV, ang. *Membrane Vesicles*). MV pełnią ważne funkcje sekrecyjne, umożliwiając nie tylko transport białek (w formie chronionej przed degradacją), lecz także DNA i innych polimerów. Struktura samego pęcherzyka, jak i przenoszony materiał, zależy od biogenezy MV. Wykazano, że jeden gatunek bakterii może, w różnych warunkach, wytwarzać odmienne rodzaje MV. W pracy tej omówiono biogenezę, strukturę oraz podstawowe funkcje MV, determinujące antagonistyczne oddziaływania bakterii z innymi organizmami.

1. Wstęp: rodzaje pęcherzyków błonowych

Wytwarzanie pęcherzyków błonowych (MV) (zarówno w formie zewnątrzkomórkowej jak i wewnątrzkomórkowej) zaobserwowano u organizmów ze wszystkich trzech domen życia (Deatherage i Cookson 2012). Duża różnorodność struktury i biogenezy MV sprawia, że struktury te pełnią wiele funkcji, np. biorą udział w komunikacji międzykomórkowej, obronie przed negatywnymi czynnikami środowiska, patogenyzy i interakcjach symbiotycznych (Caruana i Walper 2020). Ponad 50 lat badań nad pęcherzykami wytwarzanymi przez bakterie doprowadziło do poznania różnych typów MV, które, na podstawie biogenezy, zaklasyfikowano do kilku klas.



Rys. 1. Porównanie struktury trzech rodzajów pęcherzyków błonowych. Skład jakościowy macierzy i błon MV zależy od stanu fizjologicznego komórki i szczegółowych mechanizmów produkcji pęcherzyków (LPS – lipopolisacharyd, LOS – lipooligosacharyd).

1.1 OMVs (ang. Outer-Membrane Vesicles)

Odkryte jako pierwsze w planktonowej hodowli *Vibrio cholerae* w połowie XX wieku. Stanowią najlepiej zbadaną i najczęściej obserwowaną klasę MV. Są charakterystyczne dla bakterii gramujemnych. Są zbudowane z bakteryjnej błony zewnętrznej, w której ulokowane są białka transbłonowe, LPS i fragmenty eDNA (ang. *environmental DNA*) elektrostatycznie związane z powierzchnią, a ich wnętrze wypełnia peryplazma. MV wytwarza wiele gatunków patogennych bakterii, np. *Neisseria meningitidis*, *Helicobacter pylori*, *Escherichia coli* (EHEC), *Salmonella* spp. (Pathirana i Kaparakis-Liaskos 2016). Ich wzmożone wydzielanie ma miejsce zazwyczaj w warunkach stresowych dla komórek, czemu towarzyszy odkładanie się złogów nieprawidłowo sfałdowanych białek w obrębie peryplazmy. Według jednego z modeli biogenezy, to właśnie nacisk tych białek na wewnętrzną powierzchnię OM odpowiada za wyrzucenie błony i jej oderwanie od komórki w formie pęcherzyka (Kulp i Kuehn 2010). Odmienny mechanizm opisano dla biofilmów *Pseudomonas aeruginosa*, gdzie czynnikiem indukującym interakcje międzykomórkowe i wytwarzanie polisacharydowej macierzy jest autoinduktor PQS (ang. *Pseudomonas Quinolone Signal*). Czynniki te pełnią kluczową rolę w procesie QS (ang. *Quorum Sensing*). Oddziałując na błony komórek *P. aeruginosa*, wiąże się regionem hydrofobowym do lipidu A u podstawy LPS, co powodując lokalne wyrzucenie osłon (Palmer i in. 2011). Jest to jeden z niewielu przykładów autoinduktorów, które przez swoją strukturę hydrofobową nie dyfundują swobodnie w środowisku, lecz są transportowane w formie związanej z błonami MV. Ciekawa jest obserwacja, że spośród wielu cząstek chinolonów o budowie zbliżonej do PQS wydzielanych przez *P. aeruginosa*, jedynie PQS wykazuje cechy czynnika aktywującego wydzielanie OMV (Déziel i in. 2004). Wykazano nawet, że PQS stymuluje powstawanie OMV u innych bakterii gramujemnych np. *Salmonella minnesota* R60 (Mashburn-Warren i in. 2008). Proces ten jest bardziej intensywny w środowisku z niedoborem jonów Ca^{2+} i Mg^{2+} , które, oddziałując z ujemnie naładowanymi regionami antygeny O, maskują ładunek i zmniejszają wzajemnie odpychanie polimerów LPS. Brak tych jonów zmniejsza więc stabilność samej błony (Schneck i in. 2009).

1.2 OIMV (ang. Outer-Inner Membrane Vesicles)

Stanowią jeden z niewielu przykładów (wraz z EMV, które omówiono w dalszej części pracy) pęcherzyków podwójnie obłonionych. Wytwarzane są przez bakterie gramujemne; zbudowane są zarówno z bakteryjnej błony wewnętrznej jak i zewnętrznej, między którymi znajduje się cienka warstwa peryplazmy ze zdegradowaną siecią peptydoglikanu (aktywność autolizyn lub hydrolaz bakteriofagowych jest niezbędna do wytworzenia tego typu MV). Centrum pęcherzyka zajmuje cytoplazma, w której, oprócz białek, odnajdywano są również cząsteczki RNA (w tym regulatorowe sRNA) oraz DNA, pochodzące z pofragmentowanego chromosomu lub plazmidów. Skład pęcherzyka zależy od stanu fizjologicznego bakterii. Komórki obumierające wydzielają pęcherzyki z większą ilością fragmentów DNA; w przypadku komórek o intensywnym metabolizmie we frakcji kwasów nukleinowych przeważa RNA (Pérez-Cruz i in. 2015).

1.3 CMV (ang. Cytoplasmatic Membrane Vesicles)

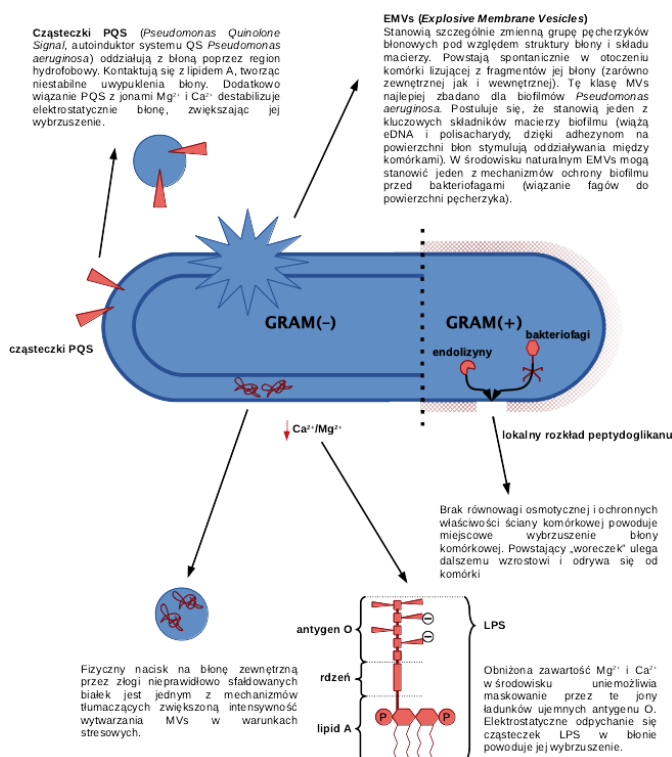
Na skutek obecności wielowarstwowej ściany komórkowej, bakterie gramododatnich produkują MV ze znacznie mniejszą intensywnością. Pęcherzyki te, zbudowane z błony komórkowej, wymagają do powstania lokalnej degradacji peptydoglikanu za sprawą wewnętrznych lub zewnętrznych enzymów litycznych (rozszczepiających zarówno wiązania glikozydowe w szkieletie cukrowym, jak i peptydowe w łańcuchach aminokwasów łączących wiązki peptydoglikanu) (Liu 2018). Udało się wykazać produkcję CMV dla kilku modelowych bakterii gramododatnich, w tym: *Bacillus subtilis* (Brown 2014), *Bacillus anthracis* i *Staphylococcus aureus* (Brown 2015).

1.4 EMV (ang. Explosive Membrane Vesicles)

Stanowią najbardziej zróżnicowany pod względem struktury typ pęcherzyków. Powstają samoistnie w otoczeniu lizującej komórki bakteryjnej, której błony wraz z wypływającą cytoplazmą (w przypadku bakterii gramujemnych również peryplazmą) tworzą w środowisku struktury obłonione. Sam proces „składania” pęcherzyka jest więc niezależny od komórki i spontaniczny. Bakteria nie ma więc możliwości kontroli zawartości EMV. W efekcie z jednej komórki powstaje

frakcja pęcherzyków o różnych rozmiarach, składzie, a przez to też funkcji. Najlepiej zbadano ten proces dla biofilmów *P. aeruginosa*, w których głęboko usytuowane komórki (na skutek niedotlenienia, niedoboru składników odżywczych i aktywacji systemu SOS) ulegają autolizie, poprzez aktywację endolizyn oraz piocyn typy R i F (Nakayama i in. 2000). Uwolnione w ten sposób EMV stanowią istotny czynnik wirulencji patogennych szczepów *P. aeruginosa*. Jako składnik macierzy biofilmu, wiążą się z eDNA i polisacharydami, a poprzez adhezyny powierzchniowe również z bakteriami, co powoduje usztywnianie tej struktury (Turnbull i in. 2016). Dodatkowo MV odgrywają istotną rolę w HGT (ang. *Horizontal Gene Transfer*) – wspomagają transformację, a po rozpadzie biofilmu i uwolnieniu do otoczenia mogą oddziaływać z komórkami gospodarza.

Jako struktury obłonione MV mają cechy wektorów, umożliwiając bowiem transport substancji wysoce wrażliwych na warunki środowiska. Chronią one zamknięte w swym wnętrzu białka przed rozkładem enzymatycznym, degradacją związaną z niskim czy wysokim pH oraz warunkami stresu oksydacyjnego. Nie dziwi więc fakt, że bakterie patogenne transportują w ten sposób nie tylko białka wspomagające pobieranie substancji odżywczych z otoczenia, lecz także toksyny oddziałujące bezpośrednio na komórki gospodarza i enzymy pełniące rolę *spreading-factors* (czynników ułatwiających penetrację infekowanych tkanek i migrację w ustroju gospodarza), degradujących szkielety białkowe tkanek i połączenia międzykomórkowe. W pewnych przypadkach zaobserwowano tzw. wzbogacanie pęcherzyka, polegające na występowaniu w jego wnętrzu określonych białek w stężeniu wyższym niż w cytoplazmie/peryplazmie. Umożliwia to pewnego rodzaju specyfikację funkcji pęcherzyka do: aktywności toksycznej, rozkładu polimerów, dezaktywacji antybiotyków czy sekwestracji jonów metali przejściowych. Niewielkie rozmiary samych MV umożliwiają pokonywanie im barier nabłonka, np. bariera krew-jelito (GBB, ang. *Gut-Blood Barrier*), i transfer do tkanek, które nie są zasiedlane przez wydzielające je bakterie. Obecność antygenów powierzchniowych umożliwia oddziaływanie MV na komórki układu immunologicznego, a czynniki wirulencji transportowane w pęcherzykach, na modulację aktywności tych komórek (indukcję lub inhibicję odpowiedzi immunologicznej). Pełnią też rolę „pułapek” dla krążących w zasiedlanej tkance przeciwciał, a w środowisku naturalnym – dla bakteriofagów. Tak duża wszechstronność pęcherzyków wynika z zróżnicowanej budowy i składu, a sam system wydzielania czynników aktywnych w tej formie stanowi jeden z najbardziej złożonych i różnorodnych mechanizmów oddziaływania bakterii z otoczeniem i innymi komórkami.



Rys. 2. Omówienie mechanizmów wytwarzania różnych typów pęcherzyków błonowych.

2. Bakterie patogenne

2.1 Relacje bakterie–człowiek

Bakterie wykształciły kilka mechanizmów sekrecji białek, w tym T3SS, T4SS i T6SS, które umożliwiają dostarczanie efektorów bezpośrednio do innej komórki (Green i Mecsas 2016). Efektorami tymi mogą być białka modulujące aktywność szlaków sygnalizacji wewnątrzkomórkowej, zmieniające strukturę cytoszkieletu, uszkadzające mitochondria lub DNA genomowy komórki (Voth i in. 2012). Pęcherzyki stanowią istotne źródło efektorów dla komórki eukariotycznej. Do najbardziej podstawowych czynników wirulencji należy LPS transportowany na powierzchni OMV i OIMV bakterii gramujemnych. Obecność adhezyn i innych antygenów na powierzchni MV, rozpoznających odpowiednie białka, umożliwia ukierunkowane dostarczanie zawartości pęcherzyka. Samo oddziaływanie MV z komórką może przebiegać według kilku mechanizmów:

- Bezpośrednia fuzja pęcherzyk-komórka następuje w specjalnych domenach błonowych, tzw. tratwach lipidowych, które charakteryzują się zwiększoną sztywnością (za sprawą cholesterolu) i obecnością kompleksów białek receptorowych (na powierzchni) i remodelujących cytoszkielet (od strony cytoplazmy) (Nagakubo i in. 2020).
- Pęcherzyki również mogą ulegać fagocytozie przez komórki układu immunologicznego (makrofagi, neutrofile i komórki dendrytyczne) lub nabłonkowe (na skutek obecności odpowiednich białek efektorowych w błonie pęcherzyka, które oddziałują z receptorami komórki eukariotycznej i aktywują szlaki fagocytozy). We wnętrzu komórki pęcherzyk ulega fuzji z błoną endosomu wczesnego, indukuje rozpad błony endosomu lub po związaniu endosom-lizosom – ulega rozkładowi pod wpływem enzymów litycznych i niskiego pH. Czynniki aktywne, które wykazują oporność na degradację lizosomalną, dostają się do cytoplazmy i oddziałują z odpowiednimi celami molekularnymi. W przypadku wprowadzenia pęcherzyka do komórki intensywnie migrującej po organizmie (np. komórki dendrytyczne)

i zachowaniu odpowiedniej stabilności w jej wnętrzu, może dochodzić do opóźnionej reakcji komórki na toksyny wydzielone przez pewną część pobranych MV. Jeśli reakcja ta jest związana z nekrozą komórki eukariotycznej, dochodzi do jej lizy i uwolnienia nienaruszonej frakcji MV, które mogą teraz oddziaływać na kolejne napotkane w nowej tkance komórki (Cecil i in. 2017).

- c) Oprócz oddziaływania bezpośredniego na komórkę, z którą pęcherzyk ma kontakt w pierwszej kolejności, wykazano też procesy transcytozy. W obrębie kępek Peyera (elementy tkanki limfoidalnej w błonie śluzowej jelita) ułożone są komórki M – różniące się morfologicznie od enterocytów (cieńszy glikokaliks i warstwa śluzu, mniejszy rozwój mikrokosmków szczycowych) i posiadające unikatową zdolność transferu antygenów ze światła jelita do warstwy tkanki łącznej pod nabłonkiem, gdzie dochodzi do kontaktu antygeny z elementami układu immunologicznego. Wiązanie komórki M i pęcherzyka następuje dzięki obecności PAMP (ang. *Pathogen Associated Molecular Patterns*) w błonie MV. Pęcherzyk zamknięty w endosomie jest transportowany do przestrzeni boczno-podstawnej, która dzięki formowaniu kieszeni zapewnia warunki ścisłego oddziaływania MV z komórką układu odpornościowego (np. limfocyt B, neutrofil, makrofag) (Rubio i in. 2020).

Warto zaznaczyć, że bakterie wytwarzają pęcherzyki nie tylko w formie planktonowej czy związanej w biofilmie. W przypadku bakterii wewnątrzkomórkowych (np. *Salmonella* spp., *Legionella pneumophila*, *Francisella tularensis*) wykazano bezpośrednie wydzielanie MV w obrębie komórki aktualnie infektowanej przez bakterie (Jung i in. 2017).

2.2 Relacje bakteria–roślina

Pęcherzyki błonowe są zaangażowane w wiele etapów patogenyzy bakteryjnej. Podobnie jak w przypadku infekcji tkanek ludzkich, przy atakowaniu roślin dochodzi do podobnych zjawisk. Każda infekcja związana jest z przyleganiem komórki bakteryjnej do tkanki gospodarza, co, w większości przypadków, skutkuje jej uszkodzeniem (Mhedbi-Hajri i in. 2011). Przeprowadzono dotychczas niewiele badań dotyczących udziału MV w kolonizacji roślin. Może to wynikać z faktu, że badania prowadzone na hodowlach tkanek zwierzęcych lub ludzkich uważane są za bardziej atrakcyjne i przyszłościowe. Dla kilku modelowych przykładów patogenów roślinnych wykazano już możliwość wydzielania pęcherzyków i częściowo zbadano ich skład.

Wśród lepiej poznanych gatunków jest *Xylella fastidiosa*, która jest gramujemną bakterią tlenową zasiedlającą wnętrza wiązek ksylemu. Jest ona zdolna do infekcji ponad 300 gatunków roślin z całego świata, w tym istotnych gatunków roślin uprawnych, np. winorośl (*Vitis vinifera*), śliwa domowa (*Prunus domestica*), wiśnia (*Prunus cerasifera*) czy czereśnia (*Prunus avium*). Gatunki dzikich traw i roślin uznawanych za chwasty mogą stanowić grupę bezobjawowych nosicieli. Częstość ich występowania w środowisku dodatkowo zwiększa ryzyko infekcji roślin uprawnych i zasięg działania bakterii patogennej (Sicard i in. 2018). Ze względu na dużą liczbę infektowanych gatunków roślin, objawy chorobowe są wysoce niespecyficzne – od niewielkich zmian blaszki liściowej po obumieranie całych roślin. Rozwijający się w ksylemie biofilm i reakcje obronne rośliny blokują transport wody z solami mineralnymi, dlatego do pierwszych objawów choroby należy wędnięcie partii rośliny ponad miejscem infekcji. Transfer między roślinami odbywa się przy udziale wektora, będącego żywicielem sokami roślinnymi owadem z rzędu Hemiptera (Saponari i in. 2014). Wykazano, że bakteria ta produkuje znaczne ilości MV bez konieczności indukcji procesu poprzez obecność gospodarza. W środowisku glebowym poruszanie się bakterii jest utrudnione ze względu na heterogeniczność otoczenia. Komórki mogą być blokowane poprzez powierzchnie adherentne, zarówno nieorganiczne (elektrostatycznie naładowane minerały) jak i organiczne (rozkładające się szczątki roślin i zwierząt). Produkowane przez *X. fastidiosa* pęcherzyki skutecznie zwiększały mobilność bakterii w glebie poprzez blokowanie punktów niespecyficznej adhezji do elementów otoczenia. Maskowanie tych regionów uniemożliwiało więc ich wiązanie z komórką, która mogła swobodniej migrować w przestrzeni wypełnionej roztworem glebowym. We wnętrzu wiązek ksylemu wydzielane MV również mogą pełnić rolę czynników antyadhezyjnych i zwiększać intensywność migracji bakterii w roślinie oraz szansę na transfer poprzez owada. Równie interesującą funkcją MV jest transport hydrofobowej cząsteczki sygnałowej DSF, mechanizm ten jest zbliżony do komunikacji międzykomórkowej *P. aeruginosa* (Ionescu i in. 2014).

Podobnie jak w przypadku infekcji tkanek zwierzęcych, pęcherzyki błonowe bakterii atakujących rośliny również mogą modulować odpowiedź gospodarza na patogen. U roślin występuje analogiczny układ receptorów rozpoznających wzorce molekularne, które związane są z patogenami (bakteriami, grzybami, wirusami i innymi pasożytami). Obecność polisacharydowej ściany komórkowej, której rozmiar porów oceniono na 5 nm, uniemożliwia bezpośrednie oddziaływanie bakterii, a nawet samych pęcherzyków z receptorami ułożonymi w błonie komórki roślinnej. W procesie infekcji dochodzi jednak do lokalnego rozkładu tkanki gospodarza i odsłonięcia błony komórkowej. Również fragmenty białek i polisacharydów bakteryjnych powstające przy lizie komórki mogą dyfundować przez bariery anatomiczne i tkankowe, co umożliwia ogólnoustrojową odpowiedź na wczesnym etapie infekcji. Do reakcji na patogen należy wzmożone wytwarzanie ROS (ang. *Reactive Oxygen Species*), które nie tylko zabijają bakterie, ale także uszkodzają same MVs, uniemożliwiając ich udział w patogenezie. Utlenianie reszt –SH w białkach zmienia ich strukturę i prowadzi do dezaktywacji, a peroksydacja lipidów błonowych zwiększa kruchość błon i szansę na spontaniczny rozpad (Miller i in. 2017).

3. Podsumowanie

Długotrwała ewolucja, liczne kontakty z innymi organizmami i bytowanie w skrajnych środowiskach sprawiły, że bakterie wykształciły wiele strategii oddziaływania z komórkami. Zastosowanie odpowiedniego wektora warunkuje nie tylko możliwość działania na odległość, ale również zapewnia większą specyficzność działania wobec wielu celów jednocześnie. Pęcherzyki błonowe zapewniają jedno z najbardziej złożonych i wszechstronnych interakcji, które współczesna biotechnologia usiłuje wykorzystać np. w zastosowaniach biomedycznych. Oprócz dostarczania antygenów w szczepionkach, pęcherzyki poddane odpowiednim modyfikacjom (zmniejszającym reakcję układu odpornościowego na ich obecność w ustroju) mogą być stosowane jako wektory transportujące leki i kwasy nukleinowe w terapiach genowych oraz celowanych strategiach leczenia nowotworów.

4. Literatura

- Brown L, Kessler A, Cabezas-Sanchez P, Luque-Garcia et al (2014) Extracellular vesicles produced by the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis* are disrupted by the lipopeptide surfactin. *Molecular Microbiology* 93(1): 183–198.
- Brown L, Wolf JM, Prados-Rosales R et al. (2015) Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. *Nature Reviews. Microbiology* 13(10): 620–630.
- Caruana JC, Walper SA (2020) Bacterial membrane vesicles as mediators of microbe - microbe and microbe - host community interactions. *Frontiers in Microbiology* 11: 432.
- Cecil JD, O'Brien-Simpson NM, Lenzo JC et al. (2017) Outer membrane vesicles prime and activate macrophage inflammasomes and cytokine secretion in vitro and in vivo. *Frontiers in Immunology* 8: 1017.
- Deatherage BL, Cookson BT (2012) Membrane vesicle release in bacteria, eukaryotes, and archaea: a conserved yet underappreciated aspect of microbial life. *Infection and Immunity* 80(6): 1948–1957.
- Déziel E, Lépine F, Milot S et al. (2004) Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQs) reveals a role for 4-hydroxy-2-heptylquinoline in cell-to-cell communication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(5): 1339–1344.
- Green ER, Meccas J (2016) Bacterial secretion systems: an overview. *Microbiology Spectrum* 4(1): 10.1128/microbiolspec.VMBF-0012–2015.
- Ionescu M, Zaini PA, Baccari C et al. (2014) *Xylella fastidiosa* outer membrane vesicles modulate plant colonization by blocking attachment to surfaces. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111(37): 3910–3918.

- Jung AL, Hoffmann K, Herkt CE et al. (2017) *Legionella pneumophila* outer membrane vesicles: isolation and analysis of their pro-inflammatory potential on macrophages. *Journal of Visualized Experiments* 120: 55146.
- Kulp A, Kuehn MJ (2010) Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles. *Annual Review of Microbiology* 64: 163–184.
- Liu Y, Defourny KAY, Smid EJ et al. (2018) Gram-positive bacterial extracellular vesicles and their impact on health and disease. *Frontiers in Microbiology* 9: 1502.
- Mashburn-Warren L, Howe J, Garidel P et al. (2008) Interaction of quorum signals with outer membrane lipids: insights into prokaryotic membrane vesicle formation. *Molecular Microbiology* 69(2): 491–502.
- Mhedbi-Hajri N, Darrasse A, Pigné S et al. (2011) Sensing and adhesion are adaptive functions in the plant pathogenic xanthomonads. *BMC Evolutionary Biology* 11: 67.
- Miller RNG, Costa Alves GS, van Sluys MA (2017) Plant immunity: unravelling the complexity of plant responses to biotic stresses. *Annals of Botany* 119(5): 681–687.
- Nagakubo T, Nomura N, Toyofuku M (2020) Cracking open bacterial membrane vesicles. *Frontiers in Microbiology* 10: 3026.
- Nakayama K, Takashima K, Ishihara H et al. (2000) The R-type pyocin of *Pseudomonas aeruginosa* is related to P2 phage, and the F-type is related to lambda phage. *Molecular Microbiology* 38(2): 213–231.
- Palmer GC, Schertzer JW, Mashburn-Warren L et al. (2011) Quantifying *Pseudomonas aeruginosa* quinolones and examining their interactions with lipids. *Methods in Molecular Biology* 692: 207–217.
- Pathirana RD, Kaparakis-Liaskos M (2016) Bacterial membrane vesicles: biogenesis, immune regulation and pathogenesis. *Cellular Microbiology* 18(11): 1518–1524.
- Pérez-Cruz C, Delgado L, López-Iglesias C et al. (2015) Outer-inner membrane vesicles naturally secreted by gram-negative pathogenic bacteria. *PloS One* 10(1): e0116896–e0116896.
- Rubio APD, Martínez J, Palavecino M et al. (2020) Transcytosis of *Bacillus subtilis* extracellular vesicles through an in vitro intestinal epithelial cell model. *Scientific Reports* 10(1): 3120.
- Saponari M, Loconsole G, Cornara D et al. (2014). Infectivity and Transmission of *Xylella fastidiosa* by *Philaenus spumarius* (Hemiptera: Aphrophoridae) in Apulia, Italy. *Journal of Economic Entomology* 107(4): 1316–1319.
- Schneck E, Papp-Szabo E, Quinn BE et al. (2009) Calcium ions induce collapse of charged O-side chains of lipopolysaccharides from *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of the Royal Society, Interface*, 6: S671–S678.
- Sicard A, Zeilinger AR, Vanhove M (2018) *Xylella fastidiosa*: Insights into an emerging plant pathogen. *Annual Review of Phytopathology* 56(1): 181–202.
- Turnbull L, Toyofuku M, Hynen AL et al. (2016) Explosive cell lysis as a mechanism for the biogenesis of bacterial membrane vesicles and biofilms. *Nature Communications* 7(1): 11220.
- Voth DE, Broederdorf LJ, Graham JG (2012) Bacterial Type IV secretion systems: versatile virulence machines. *Future Microbiology* 7(2): 241–257.

15. Pęcherzyki błonowe – jeden z mechanizmów antagonistycznych oddziaływań międzykomórkowych

Część II: charakterystyka pęcherzyków błonowych produkowanych przez patogenne bakterie gramujemne

Membrane vesicles – antagonistic effect of intercellular communication

Part 2: characterization of Gram-negative bacteria' membrane vesicles

Adrian Macion

Uniwersytet Warszawski; Wydział Biologii
Studenckie Koło Naukowe Biologii Molekularnej
ul. I. Miecznikowa 1; 02-096 Warszawa
Opiekun naukowy: prof. dr hab. Dariusz Bartosik

Adrian Macion: az.macion@student.uw.edu.pl

Słowa kluczowe: bakterie patogenne, mechanizmy patogenez, toksyny bakteryjne, biofilmy

Streszczenie

Wytwarzanie pęcherzyków błonowych zaobserwowano u przedstawicieli wszystkich domen organizmów żywych, jednak ich największa różnorodność występuje u bakterii. Do najczęściej obserwowanych strategii należy dostarczanie antygenów i toksyn do komórek docelowych w formie związanej z MV (ang. *Membrane Vesicles*). Zapewnia to nie tylko większą stabilność czynników wirulencji, lecz umożliwia także ich precyzyjne dostarczenie, nawet do tkanek, które nie mogą być zasiedlone przez bakterie.

1. Wstęp

Pęcherzyki błonowe umożliwiają oddziaływanie na odległość bakterii z komórkami infektowanego organizmu. W przypadku wielu gatunków patogennych zaobserwowano zależność między ilością powstających MV a postępującymi zmianami w tkankach gospodarza. Udział w sekrecji białek rozpuszczalnych i transbłonowych powoduje, że MV są rozpatrywane jako kluczowy czynnik wirulencji. Pęcherzyki umożliwiają transport nie tylko toksyn bakteryjnych, lecz także czynników modyfikujących funkcjonowanie układu odpornościowego gospodarza. Wykazano ponadto, że dzięki niewielkim rozmiarom, MV mogą przekraczać barierę krew-mózg i docierać do tkanek, które są znacznie mniej dostępne dla infekujących bakterii.

2. Wytwarzanie MV przez patogenne bakterie gramujemne

2.1 *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa jest jednym z najbardziej znaczących patogenów oportunistycznych, szczególnie w przypadku osób chorych na mukowiscydozę. W płucach takich pacjentów następuje nadmierne gromadzenie się gęstego śluzu za sprawą mutacji w obrębie genu kodującego białko CFTR (transbłonowy kanał dla jonów chlorkowych). Mutacje takie są najczęściej wywołane substytucjami i delecjami, które doprowadzają do: (a) braku syntezy prawidłowego białka, (b) powstania kanału wysoce niestabilnego, który szybko ulega ubiquitynacji i degradacji proteosomalnej, (c) kanału z zablokowaną możliwością otwarcia. Bakterie *P. aeruginosa* tworzą wielowarstwowe biofilmy, dzięki którym bardzo skutecznie zasiedlają powierzchnie nabłonków błon śluzowych dolnych dróg oddechowych. Oprócz prozapalnej aktywności antygenów prezentowanych, na powierzchni wydzielanych OMV (ang. *Outer Membrane Vesicles*) i EMV (ang. *Explosive Membrane Vesicles*) wykazano również obecność toksyn i innych czynników wirulencji związanych z błoną pęcherzyków lub obecnych w ich wnętrzu.

lipopolisacharyd – LPS

Polimer ten jest zakotwiczony w błonie zewnętrznej bakterii i stanowi przykład endotoksyny (substancji toksycznej, która jest uwalniana z komórek po lizie). Zbudowany jest z trzech regionów: lipidu A (zakotwiczony w błonie zewnętrznej), rdzenia i antygeny O. Częsteczka lipidu A zbudowana jest z dwóch cząsteczek D-glukozaminy połączonych wiązaniem β -1,6-glikozydowym, które są dodatkowo hekso- lub penta-acylowane. Polisacharydowy rdzeń składa się z dwóch cząsteczek kwasu 3-deoksy-D-manno-oktulozonowego (Kdo₁ i Kdo₂), oraz dwóch reszt L-glicerolo-D-manno-heptozy (Hep₁ i Hep₂). Reszty heptozy są często fosforylowane: Hep₁ – pozycje 2 i 4; Hep₂ – pozycja 6. Łańcuch antygeny O podzielony jest na dwa regiony: A i B. Region A (wewnętrzny) stanowi wspólny antygen dla większości szczepów *P. aeruginosa* i zbudowany jest z nienaładowanych elektrostatycznie reszt α -D-ramnozy. Region B (zewnętrzny) stanowi swoistą część antygeny charakterystyczną dla określonego szczepu, składa się z powtarzalnych bloków di- i penta-sacharydowych zbudowanych z różnych cukrów prostych i obdarzony jest ładunkiem ujemnym (Pier 2007). Za aktywność toksyczną LPS odpowiada lipid A, który jest wykrywany przez komórki układu immunologicznego. Część ta jest uwalniana z błon MVs po ich lizie, następnie wiąże się do białka LBP, które transportuje je na receptor CD14 ulokowany w błonie komórek odpowiedzi wrodzonej/nieswoistej. CD14 przy udziale białka MD2 transportuje LPS na receptor TLR4. Dwa receptory TLR4 związane z LPS ulegają dimeryzacji i poprzez domenę TIR uruchamiają kaskadę transdukcji sygnału odpowiedzi komórki. Reakcja ta skutkuje aktywacją genów kodujących czynniki bakteriobójcze (np. defensyny z grupy β) i cytokiny (IL-1, IL-6, CDCL8, TNF- α). W tym przypadku toksyczna aktywność samego lipidu A związana jest z jego obfitością w infekowanej tkance po rozpadzie komórek bakterii i/lub MV i silnej indukcji stanu zapalnego. Nasilenie aktywności układu immunologicznego powoduje uszkodzenie tkanek gospodarza przez stres oksydacyjny, enzymy proteolityczne i lipolityczne według modelu „przypadkowego obserwatora” (uszkodzenie komórek niebiorących bezpośredniego udziału w odpowiedzi, ale znajdujących się w okolicy).

fosfolipaza C – PlcB

Zależne od cynku fosfolipazy C (PLC) odnajdywane są niemal we wszystkich organizmach prokariotycznych i eukariotycznych. Enzym PlcB hydrolizuje fosfatydyloetanolaminę i jest wykrywany w OMVs i OIMVs (w komórce wydzielany jest do peryplazmy na drodze Sec-zależnej) (Barker i in. 2004).

fosfolipaza hemolityczna – PlcH

Enzym ten z klasy fosfolipaz C rozkłada fosfatydylocholinę w obrębie wiązania estrowego między choliną i resztą kwasu fosforanowego, oraz hydrolizuje sfingomielinę. Wykazano, że oddziałuje na neutrofile wpływając na aktywność komórek odpornościowych, zmniejsza intensywność „wybuchu tlenowego” i ich degranulację (Terada i in. 1999).

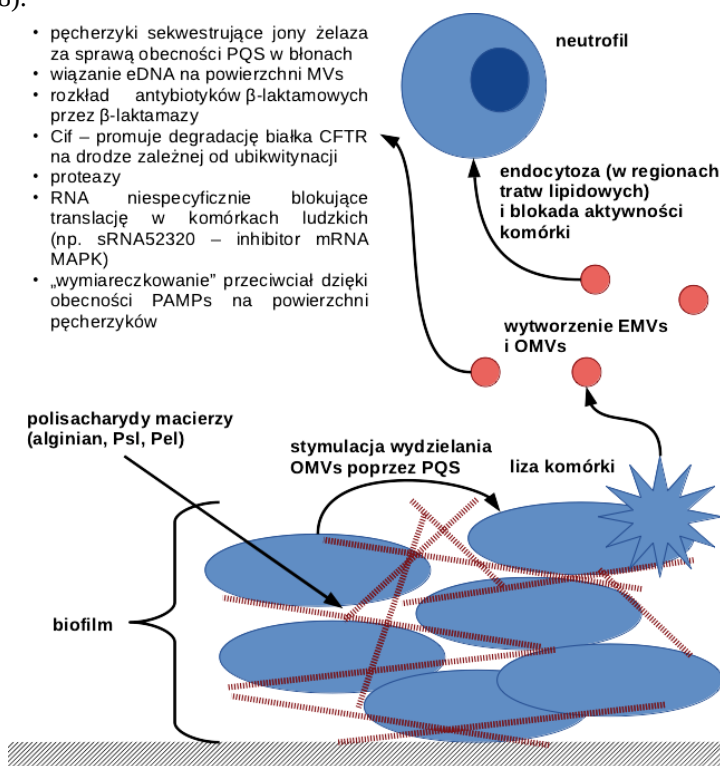
czynnik Cif

Białko jest wydzielane przez komórki do otoczenia zarówno w formie wolnej jak i związanej z MV (MacEachran i in. 2007). Wykazano, że modyfikuje stabilność w błonie transporterów takich jak CFTR i glikoproteina P. Białko to wykazuje enzymatyczne cechy hydrolazy epoksydowej (EH) i stanowi pierwszy przykład EH pełniący rolę czynnika wirulencji. Analizy strukturalne wykazały, że w centrum aktywnym Cif znajduje się triada katalityczna: Asp129, Glu153 i His297. Zaburza procesy deubikwitynacji w komórkach gospodarza poprzez tworzenie kompleksu między białkami USP10 i G3BP1. Uniemożliwia w ten sposób deubikwitynację transportera CFTR i zwiększa intensywność jego degradacji w komórce. Ponadto dzięki aktywności EH hydrolizuje wydzielany przez komórki nabłonka eikozanoid 14,15-EET (pełniący funkcje czynnika parakrynnego indukującego w neutrofilach syntezę 15-epi LXA₄) do nieaktywnego 14,15-DHET. Zaburzenie syntezy 15-epi LXA₄ wywołuje nadmierną produkcję IL-8 w płucach i powoduje ciągłe gromadzenie się granulocytów zwiększając intensywność stanu zapalnego do poziomu zagrażającego komórkom gospodarza i stabilności infekowanej tkanki. Niekontrolowany stres oksydacyjny i degranulacja

neutrofili uszkodzają komórki i elementy macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM – ang. *Extracellular Matrix*) (Flitter i in. 2017).

aminopeptydaza PaAP

Białko to jest obecne na powierzchni MVs i warunkuje ich internalizację przez komórki gospodarza (Bauman i Kuehn 2009). W obrębie komórki następnie dochodzi do aktywacji białka NOD1 rozpoznającego resztki bakteryjnego peptydoglikanu. Dodatkowo enzym ten wpływa na struktury biofilmu *P. aeruginosa*, umożliwia jego utrzymanie i zwiększa przeżywalność bakterii (Zhao i in. 2018).



Rys. 3. Udział pęcherzyków błonowych wydzielanych przez komórki *P. aeruginosa* w procesie patogenezy. Bakteria ta charakteryzuje się tworzeniem złożonych biofilmów na błonach śluzowych układu oddechowego (zwłaszcza u osób chorych na mukowiscydozę). W biofilmach tych dzięki zagęszczeniu komórek dochodzi do wzmożonego wydzielania OMVs poprzez mechanizm zależny od PQS. Dodatkowo lokalne niedotlenienie i niedobór składników odżywczych, które mają miejsce w przypadku biofilmów wielowarstwowych, powoduje lizę komórek bakterii i wytwarzanie EMVs. Pęcherzyki obu rodzajów uwalniane są do płynów tkankowych gospodarza, w których oddziałują z wieloma komórkami i mechanizmami obronnymi.

2.2 Salmonella enterica

S. enterica sv. Typhimurium jest przykładem patogenu wewnątrzkomórkowego, często infekującego drób i bydło – u człowieka wywołuje infekcje pokarmowe. Wysoka liczba komórek, których wprowadzenie drogą pokarmową jest niezbędne do wywołania objawów chorobowych (10^7 - 10^9), wynika z konieczności konkurencji patogenu z naturalną florą bakteryjną. Po dotarciu do nabłonka jelita bakterie te korzystając z fimbrii i adhezyn (np. SiiE – adhezyna niefibrylarna) ściśle przylegają do komórek gospodarza, mogą też tworzyć biofilmy (BapA – białko powierzchniowe niezbędne do budowy biofilmu, może również wspomagać inwazję komórek (Lataś i in. 2005)). W badaniach *in vitro* wykazano, że *S. enterica* może oddziaływać z komórkami *Escherichia coli* (bakterii komensalnej występującej licznie w ludzkim jelicie) tworząc wspólne, wielowarstwowe

biofilmy, w których *E. coli* stanowi pierwszy „punkt zaczepienia” do infekowanej tkanki (Esteves i in. 2005). Następnie dochodzi do internalizacji bakterii przez enterocyty i wytworzenia SCVs (ang. *Salmonella Containing Vacuoles*), w obrębie których komórki patogenu namnażają się (Steele-Mortimer 2008). U pacjentów o obniżonym poziomie odporności dochodzi do przekroczenia bariery krew-jelito i zakażeniu komórek żernych, w których bakterie mają możliwość rozprzestrzenienia się po organizmie. Do toksyn wydzielanych w formie związanej z OMV przez *S. enterica* sv. Typhimurium zalicza się:

PagK

Białko to jest transportowane do peryplazmy w systemie Sec-zależnym i stanowi klasyczny przykład „wzbogacenia” pęcherzyka błonowego. Transport poprzez MV umożliwia dostarczenie białka do cytoplazmy komórki gospodarza, która to stanowi miejsce jego aktywności w roli czynnika wirulencji (Yoon i in. 2011).

cytotoksyna ClyA

Cytotoksyna/cytolizyna ClyA jest białkiem tworzącym oligomeryczne pory w błonach komórkowych. Homologi genu *clyA* odnajdywane są w genomach innych patogenów np. *E. coli*. Lokalne przerwanie ciągłości błony prowadzi do wypływu ATP, zaburzeniu równowagi jonowej i wodnej, oraz skutkuje indukcją apoptozy.

2.3 *Vibrio cholerae*

V. cholerae jest gramujemną bakterią, której dwa serotypy (O1 – biotypy: klasyczny i El Tor, O139) stanowią czynnik etiologiczny choroby układu pokarmowego – cholery. W krótkiej historii swojej epidemiologii (około 200 lat) bakteria ta wywołała 7 wielkich pandemii, z których ostatnia rozprzestrzeniła się w 1961 roku i trwała do lat 70. Po dziś dzień *V. cholera* wywołuje lokalne wybuchy epidemii w krajach rozwijających się. Do szczególnych czynników zagrażających kolejnymi epidemiami należy brak dostępu do czystej wody – woda zanieczyszczona fekaliami stanowi główną drogę zakażenia. Ponadto, za sprawą adhezyny GbpA bakteria ta rezyduje na chitynie zwierząt morskich takich jak skorupiaki. Do klasycznych objawów choroby należy wodnista biegunka, która może trwać nawet kilka dni. Tak obfita utrata płynów doprowadza skrajnego odwodnienia i zaburzenia równowagi elektrolitycznej we krwi i płynach tkankowych.

Komórki *V. cholerae* zarówno w jelicie ludzkim jak i w środowisku naturalnym tworzą biofilmy, których konstrukcja indukowana jest osiągnięciem przez populację bakterii określonego zagęszczenia. Kaskada reakcji związanych z transdukcją odebranego sygnału ostatecznie doprowadza do aktywacji białek z grupy DGC, które syntetyzują c-di-GMP (czynnika indukującego zmianę fizjologii komórki z planktonicznej na osiadłą). W jelicie na skutek działania soli kwasów żółciowych bakterie migrują do warstwy śluzu pokrywającego nabłonek. W takich warunkach dochodzi do wytwarzania przez komórki mikrokolonii, ścisłego oddziaływania z enterocytami i wydzielania toksyn, które zwiększają przepuszczalność bariery nabłonka i wypływ jonów z komórek (a wraz z nimi wody). W środowisku naturalnym, na przykładzie wody morskiej, bakterie osadzają się na powierzchni zwierząt bezkręgowych i roślin. Wydzielana przez makroglony poliamina $H_2N-(CH_2)_3-NH-(CH_2)_3-NH_2$ po znalezieniu się w peryplazmie oddziałuje z receptorem NspS, który następnie aktywuje białko MbaA ulokowane w błonie zewnętrznej. Cały ten proces stanowi jedną z dróg aktywacji ekspresji genów związanych z adsorpcją bakterii do podłoża. Jak wcześniej wspomniano, *V. cholerae* intensywnie wytwarza MV (zarówno w postaci planktonowej jak i biofilmu), w których zidentyfikowano:

toksynę cholery – CTx

Kodowana jest w obrębie profaga CTX ϕ i stanowi przykład toksyny z grupy AB₅ – oligomeryczny kompleks zbudowany jest z dwóch typów podjednostek funkcjonalnych: A (dwie domeny A₁ i A₂ – odpowiada za właściwości toksyczne) i B (warunkują wiązanie toksyny z receptorem na komórce docelowej – gangliozydami GM1). Należy do typu tzw. „toksyn termowrażliwych” – wrażliwych na wysoką temperaturę. Po związaniu toksyny z gangliozydami GM1 następuje jej endocytoza i transfer do wnętrza ER. Tam, przy udziale białka Ero1, dochodzi do

redukcji wiązania –SS– łączącego domeny A₁ i A₂. Domena A₁, która ma aktywność ADP-rybozylazy, zostaje uwolniona i przetransportowana do cytoplazmy kanałem Sec61, gdzie dochodzi do aktywacji domeny przez związanie z białkiem Arf1 i odsłonięcia miejsca aktywnego. Molekularnym celem toksyny są białka Gα_s. Dezaktywacja tych białek przez ADP-rybozylację doprowadza do nadaktywności cykazy adenylanowej i nadprodukcji cAMP w komórkach nabłonka jelita i aktywacji kinaz białkowym A (PKA – ang. *Protein Kinase A*), które fosforylują transporter CFTR blokując go w formie otwartej. Niekontrolowany wypływ jonów Cl⁻ pociąga za sobą wypływ wody (do 2 litrów na godzinę) i innych elektrolitów (Na⁺, K⁺, HCO₃⁻). Ponadto CTx jest silnym adiuwantem odpowiedzi immunologicznej. Podobne efekty wywołuje sama podjednostka B. Stwierdzono, że uczestniczy również w inhibicji odpowiedzi immunologicznej na drodze zwiększania aktywności fosfatazy-1 MAPK (MKP1), co znacząco zmniejsza aktywność kinazy Janusa i białka p38. Ostatecznie zmniejszeniu ulega produkcja kluczowych cytokin prozapalnych (TNFα i IL-6) przez makrofagi. Ta cecha podjednostki B znalazła zastosowanie w terapii chorób autoimmunologicznych. W badaniach wykorzystujących zwierzęce modele chorób wykazano, że podjednostka B skoniugowana z podstawowymi białkami mieliny zapobiega eksperymentalnemu zapaleniu mózgu i rdzenia kręgowego (Bharati i Ganguly 2011). Koniugat z insuliną opóźniał wystąpienie objawów cukrzycy typu I (Bergerot i in. 1997).

cytolizynę VCC

VCC jest znajdowana w peryplazmie komórek *V. cholerae* i świetle wydzielanych OMV. Egzotoksyna ta tworzy pory w błonie komórek docelowych za sprawą obecności domen o budowie β-baryłki. W stężeniach zbyt niskich by doprowadzić do pełnej lizy komórki indukuje apoptozę zarówno komórek nabłonkowych jak i leukocytów (Olson i Gouaux 2003). Badania *in vitro* wykazały, że ochronna bariera pęcherzyka jest niezbędna do zachowania aktywności VCC. Toksyna ta w formie wolnej szybko ulegała oligomeryzacji poprzez domeny hydrofobowe i tworzyła nieaktywne złogi (Elluri i in. 2014).

2.4 *Helicobacter pylori*

H. pylori jest gramujemną, mikroaerofilną pałeczką z klasy ε-Proteobacteria o spiralnym kształcie. Pierwotnie nazwano ją *Campylobacter pylori*. Wykryta po raz pierwszy przez włoskiego badacza Gulio Bizzozero w biopsji z psiego żołądka w 1899 roku. Dokładnie scharakteryzowana w 1982 roku przez australijskich badaczy: Robina Warrena i Barry'ego Marshalla, którzy za swoje badania otrzymali w 2005 roku Nagrodę Nobla. Badany przez nich szczep pochodził z próbki od pacjenta z silnym zapaleniem i owrzodzeniem błony śluzowej żołądka. Do czynników wirulencji *H. pylori* należą: lofotrychalny pęk rzęsek pozwalających na sprawną motorykę w śluzie, ureaza, różnorodne adhezyny i toksyny (CagA, VacA i NapA). Zdolności do chemotaksji pozwalają bakterii na migrację przez warstwę gęstego śluzu, do środowiska mniej kwasowego, kontaktującego się bezpośrednio z powierzchnią nabłonka żołądka. Ureaza jest enzymem rozkładającym mocznik z wydzieleniem alkalizującego środowisko amoniaku, który dodatkowo oddziałuje na mucyny rozluźniając strukturę śluzu. Śluz ten w środowisku kwasowym zachowuje strukturę gęstego żelu, który utrudnia dostęp bakterii do nabłonka. Alkalizacja powoduje przejście mieszaniny w roztwór bardziej płynny.

Zbadano, że patogen ten wytwarza OMV na drodze kilku mechanizmów: (a) lokalnej degradacji peptydoglikanu, co powoduje gromadzenie się monomerów, które naciskają na OM powodując jej wybrzuszenie, (b) zwiększonej syntezy lipidów błonowych, co powoduje nadmiar powierzchni OM, która ulega wygięciu. Ponadto, w wytwarzanych przez *H. pylori* biofilmach wykazano możliwość powstawania EMV, które wiążą znaczne ilości eDNA (egzo-DNA, pozakomórkowy DNA). Dzięki pochodzeniu przez warstwę nabłonka MV tej bakterii mają możliwość szerokiej regulacji odpowiedzi immunologicznej. Analiza proteomiczna składu pęcherzyków wykazała obecność licznych czynników wirulencji, w tym specyficznych dla *H. pylori* toksyn:

toksyny wakuolizującej – VacA

Białko zbudowane z dwóch domen: p55 i p33. Jedną z głównych toksyn produkowanych przez *H. pylori*, przyczynia się do wywoływania owrzodzenia błony śluzowej żołądka i zmian nowotworowych np. gruczolakoraka. Ze względu na swój wpływ na fenotyp komórek gospodarza nazywana jest toksyną wakuolizującą. Wywołuje również zmiany w obrębie cytoszkieletu. Nie wykazano, aby białko to miało aktywność enzymatyczną, jednak wiążąc się z błoną poprzez hydrofobowe regiony domeny p33 tworzy kanały dla cząstek anionowych: Cl^- , HCO_3^- i małych cząstek organicznych. VacA działa w formie oligomeru, których utworzenie blokowane jest w środowisku kwasowym i zasadowym, dopiero po kontakcie z błoną oligomery ulegają stabilizacji i możliwe jest utworzenie kanału. Wielkoskalowe badania epidemiologiczne wykazały wyraźną korelację między infekcją *H. pylori* noszącą konkretny rodzaj allelu genu *vacA*, a zwiększonym ryzykiem choroby wrzodowej żołądka i dwunastnicy. Pacjenci zakażeni szczepami zawierającymi typy allelu S1, I1 i M1 są obciążeni wyższym ryzykiem choroby wrzodowej niż ci zainfekowani typami S2, I2 i M2. Prócz indukcji zmian apoptycznych toksyna ta wpływa też na aktywność układu immunologicznego. Po przekroczeniu przez OMVs bariery nabłonka oddziałuje na limfocyty T aktywując p38, co skutkuje wzrostem aktywności cyklooksygenazy 2 (COX-2) i produkcji prostaglandyny E_2 (PGE2) – bezpośredniego czynnika odpowiadającego za rozkurcz mięśni gładkich i rozszerzenie naczyń krwionośnych. Dodatkowo VacA wpływa na: pozytywną regulację syntezy VEGF, aktywację kinazy MAP, zwiększenie przepuszczalności nabłonka (Papini i in. 1998), uwolnienie cytochromu c z błon mitochondrialnych (Galmiche i in. 2000). Zmiany te wpływają na zwiększanie stanu zapalnego w obrębie infekowanej tkanki, uszkodzenia komórek gospodarza i indukcję karcynogenezy.

CagA

Toksyna CagA stanowi pierwszą zidentyfikowaną bakteryjną onkoproteinę, kodowaną w obrębie wyspy patogenności *cag-PAI*. Po wprowadzeniu do komórek gospodarza białko to ulega oligomeryzacji i fosforylacji w powtórzonym motywie EPIYA, poprzez kinazy gospodarza SFK i c-Abl. Przed fosforylacją toksyna oddziałuje z białkami: białkami c-Met, Grb2, Crk, PAR1b/MARK i E-kadherynami. Ufosforylowane białko CagA wpływa na aktywność: kinazy Csk i fosfatazy SHP-2. Różnorodność strukturalna toksyny w obrębie regionów EPIYA jest skorelowana z różną aktywnością szczepów w wywoływaniu zmian nowotworowych. Toksyna posiada w regionie centralnym motyw K-Xn-R-X-R wymagany do wiązania CagA z błonowym fosfolipidem – fosfatydyloseryną. Do efektów działania toksyny należą: degradacja oddziaływań międzykomórkowych zależnych od E-kadheryny, zaburzenie regulacji cyklu komórkowego, przegrupowanie cytoszkieletu aktynowego i mikrotubulinowego, zwiększenie przepuszczalności nabłonka i odrywanie się komórek od błony podstawnej (zaburzenie struktury połączeń międzykomórkowych i właściwa polaryzacja komórek).

BabA

Białko powierzchniowe ułożone w komórkach w obrębie OM i w błonie OMVs. Ścisłe związane z zasiedlaniem przez bakterie błon śluzowych, ułatwia kontakt OMVs z błonami komórek gospodarza i zmniejsza wymywanie bakterii z nabłonka przez treści żołądkowe i skurcze mięśniówki. Wiązanie się do śluzu jest możliwe dzięki oddziaływaniom adhezyny z mucynami: MUC1, MUC2 i MUC5AC. Wśród ligandów nabłonkowych zidentyfikowano: antygeny H1, A i B, antygen grupowy Lewis-B.

SabA

Adhezyna wiążąca kwas sialowy, wykazuje powinowactwo do gangliozydów apikalnych takich jak: Neu5Ac α 3-neolaktotetraosylceramid i Neu5Ac α 3-neolaktotetraosylceramid (Benktander i in. 2018).

HP-NAP

Czynnik silnie aktywujący ludzkie neutrofile, działa chemotaktycznie na leukocyty (np. monocyty) i aktywuje oksygenazę NADPH doprowadzając do nadprodukcji anionorodnika

ponadtlenkowego ($O_2^{\cdot -}$), który ulega dalszym przekształceniom do toksycznych form tlenu takich jak: $\cdot OH_2$, H_2O_2 , $\cdot OH$, $HOCl$. Białko to nie jest typową toksyną, ale poprzez zwiększanie intensywności odpowiedzi organizmu na patogen zwiększa przypadkowe uszkodzenia tkanek.

HtrA_{Hp}

Proteaza doprowadzająca do rozkładu połączeń międzykomórkowych odpowiedzialnych za utrzymanie ścisłości i szczelności nabłonka. W komórce pełni rolę odpowiedzi na stres środowiskowy (niskie pH, stres oksydacyjny) poprzez degradowanie złogów nieprawidłowo sfałdowanych białek. Charakteryzuje się bardzo wysoką stabilnością, w tym termiczną ($T_m > 85^\circ C$) i odzyskuje strukturę natywną po potraktowaniu warunkami denaturującymi (Zarzecka i in. 2019).

3. Podsumowanie

Poznanie molekularnych czynników wirulencji bakterii stanowi ważne wyzwanie dla mikrobiologów. Nowoczesne techniki pozwalają na odkrywanie kolejnych mechanizmów, które niekiedy zaskakują powszechnością występowania. Pęcherzyki błonowe wciąż stanowią otwarty temat badań. Z każdym rokiem badania te przynoszą nowe dane wzbogacające naszą wiedzę o oddziaływaniach bakterii z komórkami innych organizmów. Duża różnorodność struktury i funkcji, działanie na odległość oraz stabilność w ustroju gospodarza sprawiają, że pęcherzyki błonowe stanowią „broń nuklearną” w bogatym arsenale bakterii patogennych.

4. Literatura

- Barker AP, Vasil AI, Filloux A et al. (2004) A novel extracellular phospholipase C of *Pseudomonas aeruginosa* is required for phospholipid chemotaxis. *Molecular Microbiology* 53(4): 1089–1098.
- Bauman SJ, Kuehn MJ (2009) *Pseudomonas aeruginosa* vesicles associate with and are internalized by human lung epithelial cells. *BMC Microbiology* 9: 26.
- Benktander J, Barone A, Johansson MM et al. (2018) *Helicobacter pylori* SabA binding gangliosides of human stomach. *Virulence* 9(1): 738–751.
- Bergerot I, Ploix C, Petersen J et al. (1997) A cholera toxoid-insulin conjugate as an oral vaccine against spontaneous autoimmune diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(9): 4610–4614.
- Bharati K, Ganguly NK (2011) Cholera toxin: a paradigm of a multifunctional protein. *The Indian Journal of Medical Research* 133(2): 179–187.
- Elluri S, Enow C, Vdovikova S et al. (2014) Outer membrane vesicles mediate transport of biologically active *Vibrio cholerae* cytolysin (VCC) from *V. cholerae* strains. *PloS One* 9(9): e106731–e106731.
- Esteves CLC, Jones BD, Clegg S (2005) Biofilm formation by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Escherichia coli* on epithelial cells following mixed inoculations. *Infection and Immunity* 73(8): 5198–5203.
- Flitter BA, Hvorecny KL, Ono E et al. (2017) *Pseudomonas aeruginosa* sabotages the generation of host proresolving lipid mediators. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114(1): 136–141.
- Galmiche A, Rassow J, Doye A et al. (2000) The N-terminal 34 kDa fragment of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin targets mitochondria and induces cytochrome c release. *The EMBO Journal* 19(23): 6361–6370.
- Latasa C, Roux A, Toledo-Arana A et al. (2005) BapA, a large secreted protein required for biofilm formation and host colonization of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Molecular Microbiology* 58(5): 1322–1339.
- MacEachran DP, Ye S, Bomberger JM et al. (2007) The *Pseudomonas aeruginosa* secreted protein PA2934 decreases apical membrane expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Infection and Immunity* 75(8): 3902–3912.

- Olson R, Gouaux E (2003) *Vibrio cholerae* cytolysin is composed of an alpha-hemolysin-like core. *Protein Science: A Publication of the Protein Society* 12(2): 379–383.
- Papini E, Satin B, Norais N et al. (1998) Selective increase of the permeability of polarized epithelial cell monolayers by *Helicobacter pylori* vacuolating toxin. *The Journal of Clinical Investigation* 102(4): 813–820.
- Pier GB (2007) *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide: a major virulence factor, initiator of inflammation and target for effective immunity. *International Journal of Medical Microbiology: IJMM* 297(5): 277–295.
- Steele-Mortimer O (2008) The Salmonella-containing vacuole: moving with the times. *Current Opinion in Microbiology* 11(1): 38–45.
- Terada LS, Johansen KA, Nowbar S et al. (1999) *Pseudomonas aeruginosa* hemolytic phospholipase C suppresses neutrophil respiratory burst activity. *Infection and Immunity* 67(5): 2371–2376.
- Yoon H, Ansong C, Adkins JN et al. (2011) Discovery of *Salmonella* virulence factors translocated via outer membrane vesicles to murine macrophages. *Infection and Immunity* 79(6): 2182–2192.
- Zarzecka U, Modrak-Wójcik A, Figaj D et al. (2019) Properties of the HtrA protease from bacterium *Helicobacter pylori* whose activity is indispensable for growth under stress conditions. *Frontiers in Microbiology* 10: 961.
- Zhao T, Zhang Y, Wu H et al. (2018) Extracellular aminopeptidase modulates biofilm development of *Pseudomonas aeruginosa* by affecting matrix exopolysaccharide and bacterial cell death. *Environmental Microbiology Reports* 10(5): 583–593.

16. Techniki spektroskopowe wykorzystywane w analizie strukturalnej białek – przegląd literaturowy

Spectroscopic techniques used in the structural analysis of proteins - literature review

Anna Ploch-Jankowska, Danuta Pentak

Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, Jedności 8, 41-200 Sosnowiec

Opiekun naukowy: dr hab. n. farm. Danuta Pentak

Anna Ploch-Jankowska: aniaploch@op.pl

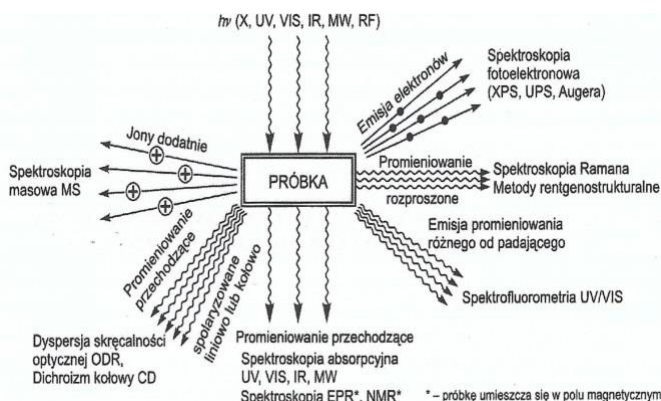
Słowa kluczowe: spektroskopia UV/VIS, spektroskopia w podczerwieni, spektroskopia Ramana, spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego

Streszczenie

Spektroskopia jest to nauka zajmująca się oddziaływaniem promieniowania elektromagnetycznego z materią. W analizie spektroskopowej wykorzystuje się głównie natężenie promieniowania absorbowanego lub emitowanego przez badany układ (cząsteczki, atomy). Do metod instrumentalnych, które mogą być z powodzeniem wykorzystywane m.in. w biochemicznej analizie spektroskopowej należą spektroskopia absorpcyjna - spektroskopia UV/VIS, spektroskopia w podczerwieni i Ramana, spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego. Poza metodami absorpcyjnymi bardzo duże znaczenie odgrywa także spektroskopia fluorescencyjna (Pons i in. 2004).

1. Wstęp

Spektroskopia jest działem fizyki obejmującym zarówno badania budowy i właściwości jąder atomowych, atomów, cząsteczek oraz złożonych z nich układów makroskopowych, jak i badanie ich wzajemnych oddziaływań – na podstawie rozkładu natężenia (tzw. widma) promieniowania elektromagnetycznego pochłanianego, wysyłanego lub rozpraszanego przez te obiekty i rejestrowanego w zależności od długości fali lub częstotliwości promieniowania (<https://encyklopedia.pwn.pl/3978131.html>). Poddając głębszej analizie pojęcie spektroskopii stwierdzono, iż spektroskopia bada oraz wyjaśnia teoretyczne oddziaływania powstałe pomiędzy materią (zbiorowiskiem atomów i cząsteczek) a promieniowaniem elektromagnetycznym, będącym falowym zaburzeniem pola elektromagnetycznego polegające na pochłanianiu części energii (zjawisko absorpcji) przez materię bądź oddawaniu tej energii w postaci promieniowania (zjawisko emisji) (Zieliński i Rajca 2018). Efekty oddziaływań pomiędzy promieniowaniem a materią znajdującą się na jego drodze przedstawia Rys.1.



Rys. 1 Efekty oddziaływań pomiędzy promieniowaniem elektromagnetycznym a materią (Zieliński i Rajca 2018).

Dużą zaletą stosowania metod spektroskopowych jest to, iż są stosunkowo szybkie oraz umożliwiają badanie zarówno w warunkach *in vitro* jak i *in vivo*. Metody spektroskopowe mogą być także z powodzeniem wykorzystywane w diagnozowaniu stanów chorobowych nawet na wczesnych etapach rozwoju danej jednostki chorobowej. Duże molekuly takie jak białka, tłuszcze, cukry i kwasy nukleinowe dają charakterystyczne widma zawierające informacje o ich budowie chemicznej. Niejednokrotnie już w przypadku wystąpienia niewielkich zmian chorobowych następuje deformacja widma. Wówczas metody spektroskopowe wykorzystuje się w monitorowaniu leczenia z użyciem produktów leczniczych (Kęcki 1992).

2. Budowa białek

Białka są to cząsteczki zbudowane z α -aminokwasów, które tworzą liniowe łańcuchy polimerowe dzięki obecności wiązań peptydowych pomiędzy nimi. Na łańcuch główny białka składają się grupy amidowe, karbonylowe oraz atomy węgla α połączone z atomami wodoru. Pozostała część molekuly to tzw. łańcuchy boczne. Ze względu na złożoną budowę, masy cząsteczkowe białka mieszczą się w zakresie od 10 tysięcy do nawet kilku milionów Daltonów.

Białka przyjmują ściśle określoną konformację przestrzenną. Strukturę białka opisuje się na czterech poziomach, zwanych rzędowościami. Struktura pierwszorzędowa białka to prosty łańcuch poliptydowy ułożony w ściśle określonej sekwencji aminokwasów (od N-końca do C-końca). Struktura ta stabilizowana jest wyłącznie przez wiązania peptydowe. W przypadku wystąpienia różnego rodzaju oddziaływań pomiędzy aminokwasami, białko przyjmuje strukturę drugorzędową. Wyróżnia się dwa rodzaje struktur tworzonych przez łańcuchy białka. Pierwszy z nich to α -helisa (struktura prawoskrętna) oraz β -kartki (harmonijki). Drugorzędowa struktura białka stabilizowana jest przez wiązania wodorowe występujące pomiędzy aminokwasami. Struktura trzeciorzędowa białka to ułożenie elementów struktury drugorzędowej w przestrzeni trójwymiarowej. Dochodzi wówczas do wystąpienia zjawiska przyciągania pomiędzy łańcuchami bocznymi aminokwasów, a następnie skręcenia oraz wygięcia struktury drugorzędowej. W wyniku wygięcia łańcucha głównego, aminokwasy, które z punktu widzenia struktury pierwszorzędowej znajdowały się w dużej odległości, w strukturze trzeciorzędowej mogą leżeć bardzo blisko siebie. Zaś struktura jest stabilizowana przez wiązania wodorowe oraz tworzące się mostki dwusiarczkowe (pomiędzy aminokwasem siarkowym a cysteiną). Struktura czwartorzędowa białka powstaje na skutek połączenia się dwóch lub więcej łańcuchów białkowych o konformacji przestrzennej – trzeciorzędowej (Żebro 2018).

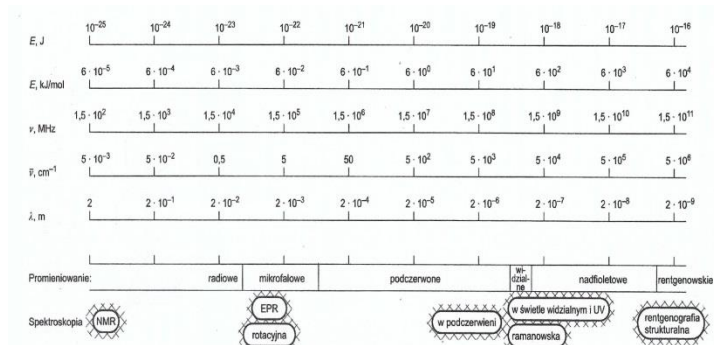
3. Podział spektroskopii

Metody spektroskopowe dzieli się na metody emisyjne oraz absorpcyjne. Metody emisyjne polegają na analizie emitowanego przez badaną próbkę promieniowania. Natomiast w metodach absorpcyjnych poddaje się analizie promieniowanie przechodzące przez próbkę. Wśród metod absorpcyjnych wyróżnia się spektroskopię UV/VIS (w zakresie ultrafioletu i światła widzialnego), spektroskopię w podczerwieni IR oraz spektroskopię mikrofalową. Ponadto, wyróżnia się również metody rezonansu magnetycznego, do którego zalicza się spektroskopię magnetycznego rezonansu jądrowego NMR oraz elektronowego rezonansu paramagnetycznego EPR. W ich przypadku analizowaną próbkę dodatkowo umieszcza się w polu magnetycznym. Podział metod absorpcyjnych wynika przede wszystkim z zastosowanego zakresu promieniowania elektromagnetycznego (Rys.2).

W pozostałych metodach spektroskopowych wykorzystuje się inne efekty powstałe podczas oddziaływań pomiędzy promieniowaniem a materią. W przypadku spektroskopii Ramanowskiej bada się promieniowanie rozproszone, a dokładnie zmiany energii promieniowania rozproszonego. Analizę promieniowania emitowanego przez cząsteczki po absorpcji promieniowania padającego o innej energii zajmują się spektrofluorymetria. Metoda dyspersji skręcalności optycznej polega na przepuszczeniu przez warstwę materii zawierającą cząsteczki chiralne promieniowania elektromagnetycznego spolaryzowanego liniowo w wyniku, czego następuje skręcenie płaszczyzny polaryzacji światła o pewien kąt. Wartość kąta daje informacje o asymetrii cząsteczek analizowanej materii. W przypadku spektroskopii fotoelektronowej poddaje się analizie energię elektronów

wybitych z orbitali atomowych/cząsteczkowych w wyniku zjawiska absorpcji promieniowania elektromagnetycznego o określonej energii. Spektrometria masowa oraz rentgenografia strukturalna, pomimo, iż nie należą do metod spektroskopowych to z punktu widzenia analizy identyfikacji i badania struktury związków organicznych stanowią jedne z ważniejszych i efektywnych metod (Zieliński i Rajca 2018).

Do badań strukturalnych związków organicznych najczęściej wykorzystuje się metody absorpcyjne, ponieważ w normalnych warunkach temperaturowych związki organiczne nie emitują promieniowania. Natomiast do analizy oddziaływań związków chemicznych m.in. pomiędzy białkiem a lekiem wykorzystuje się zarówno metody spektroskopowe absorpcyjne jak i emisyjne. Wśród najczęściej stosowanych wyróżnia się m.in. spektroskopię UV/VIS, IR, NMR, spektroskopię Ramanowską, spektrofotometrię oraz spektroskopię dichroizmu kołowego.



Rys. 2. Rodzaje spektroskopii i ich zakresy promieniowania elektromagnetycznego (Zieliński i Rajca 2018).

4. Spektroskopia UV/VIS

Spektroskopia UV/VIS jest jedną z klasycznych metod spektroskopii absorpcyjnej. Zakres promieniowania elektromagnetycznego mieści się w przedziale 200-800 nm. Analiza z użyciem spektrofotometru UV/VIS oraz innych metod absorpcyjnych (NMR, EPR, IR) polega na porównaniu intensywności wiązki promieniowania przechodzącego przez próbkę I do intensywności światła padającego na próbkę I_0 .

$$A = \log \frac{I_0}{I}$$

Do scharakteryzowania intensywności zjawiska absorpcji wykorzystuje się wielkość zwaną absorbancją (A) oraz transmitancją/przepuszczalnością (T). Zależność pomiędzy tymi wielkościami można wyrazić wzorem.

$$A = \log \frac{1}{T}$$

Wartości absorbancji i/lub transmitancji wyznacza się z użyciem spektrofotometru. Podstawowymi składowymi spektrofotometru jest źródło promieniowania, monochromator, miejsce (uchwyt) na próbkę, detektor oraz rejestrator.

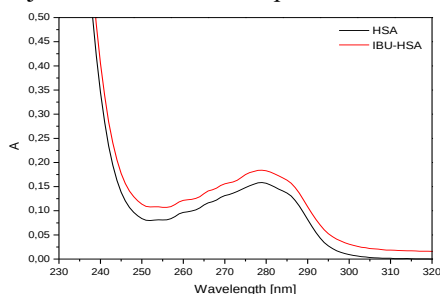
W wyniku absorbancji wiązki promieniowania monochromatycznego przez badaną próbkę następuje przejście elektronów walencyjnych związku organicznego z poziomu o niższej energii (orbital π i n) na wyższy poziom energetyczny (orbital antywiązący π^*).



Warunkiem przejścia elektronowego ze stanu podstawowego do stanu wzbudzonego jest obecność chromoforów w budowie analizowanego związku organicznego. Chromofory to najczęściej układy aromatyczne lub ugrupowania z wiązaniami wielokrotnymi. Prócz chromoforów w cząsteczce związku organicznego mogą występować m.in. grupy aminowe lub hydroksylowe zwane auksochromami. Ugrupowania te nie absorbują wiązki promieniowania elektromagnetycznego, ale wpływają na wartość energii obecnego w cząsteczce chromoforu. Ich obecność przyczynia się do

przesunięcia pasma absorpcji związku w kierunku fal krótszych (przesunięcie hipsochromowe) lub w kierunku fal dłuższych (przesunięcie batochromowe).

Białka m.in. albumina surowicy krwi ludzkiej ze względu na swoją złożoną budowę zawiera zarówno ugrupowania aromatyczne jak również wiązania wielokrotne. Dzięki temu może być z powodzeniem poddana analizie spektrofotometrycznej UV/VIS. Z użyciem tej metody można analizować oddziaływania pomiędzy białkiem a lekiem, co jest bardzo pomocne w trakcie monitorowania przebiegu leczenia wielu chorób. Rys. 3 przedstawia przykładowe widmo UV/VIS albuminy surowicy krwi ludzkiej bez i w obecności ibuprofenu.



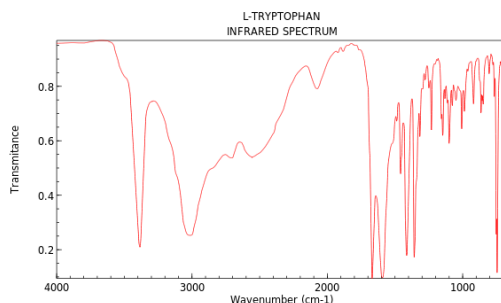
Rys. 3 Widmo UV/VIS albuminy surowicy krwi ludzkiej bez i w obecności ibuprofenu.

5. Spektroskopia IR

Spektroskopia w podczerwieni mieści się w zakresie promieniowania elektromagnetycznego 1430cm^{-1} (obszar widzialny) a 600 cm^{-1} (obszar mikrofalowy). Największe znaczenie z punktu widzenia analizy struktury związków organicznych wykazuje obszar podczerwieni właściwej ($4000 - 700\text{cm}^{-1}$) odpowiadający za przejścia oscylacyjno-rotacyjne. Mniejsze znaczenie natomiast odgrywa podczerwień daleka ($700 - 200\text{cm}^{-1}$) i bliska ($1430 - 4000\text{cm}^{-1}$). W spektroskopii oscylacyjnej w podczerwieni w wyniku absorpcji promieniowania następują zmiany energii oscylacyjnej cząsteczki. Ruch drgający analizowanej cząsteczki opisuje się jako zespół drgań prostszych. Drgania te zwane są drganiami normalnymi, podczas których wszystkie zrzęby atomowe cząsteczki drgają w jednej fazie oraz z jednakową częstością. Różnice pomiędzy różnymi zrzębami atomów występują jedynie w amplitudzie wychYLENIA. Dlatego jeśli w trakcie drgania normalnego, amplituda wychYLENIA zrzębów atomowych określonej grupy funkcyjnej jest większa niż pozostałych to takie drganie jest charakterystyczne dla tej grupy funkcyjnej, pierścieni aromatycznych lub łańcuchów alifatycznych. Energia charakterystycznych drgań normalnych jest skwantowana w wyniku, czego każdemu drganiu odpowiada specyficzny układ oscylacyjny poziomów energetycznych (Nykiel 2013).

Spektroskopia w podczerwieni jest jedną z podstawowych technik instrumentalnych powszechnie stosowanych w analizie struktury i oddziaływań związków chemicznych. Dostarcza szczegółowych informacji dotyczących obecności określonych grup funkcyjnych oraz innych znaczących elementów struktury związku m.in. obecności wiązań pojedynczych, podwójnych lub potrójnych pomiędzy atomami węgla w cząsteczce. Grupy funkcyjne wykazują zdolność do absorbowania w dość wąskim zakresie częstości promieniowania podczerwonego niezależnie od budowy całej cząsteczki. Dzięki temu z użyciem metody IR można zidentyfikować takie ugrupowania atomów jak: $-\text{OH}$, $-\text{NH}_2$, NHR , C=O . Za pomocą spektroskopii w podczerwieni możliwa jest obserwacja pasm związanych z drganiami rozciągającymi (rozciąganie wiązań) oraz wiązaniami deformacyjnymi (deformacja kątów pomiędzy wiązaniami). Dzięki temu uzyskuje się szczegółowe informacje o analizowanej próbce. Poddając analizie obszar podczerwieni właściwej można wyróżnić cztery podobszary. Pierwszy z nich (obszar I) mieści się w zakresie $4000 - 2500\text{cm}^{-1}$. Obszar ten odpowiada drganiom rozciągającym oraz charakteryzuje obecność grup $-\text{NH}$, $-\text{CH}$ i $-\text{OH}$. Kolejny zakres liczb falowych $2500 - 2000\text{cm}^{-1}$ (obszar II) obrazuje obecność lub brak wiązań potrójnych w cząsteczce. Obszar $2000 - 1500\text{ cm}^{-1}$ (obszar III) obrazuje drgania rozciągające wiązania podwójnych pomiędzy dwoma atomami węgla (C=C) i pomiędzy atomem węgla i tlenu (C=O). Ponadto w tym zakresie analizuje się drgania deformacyjne wiązań N-H . Ostatni obszar, poniżej 1500cm^{-1} (obszar IV) - obszar daktyloskopowy (fingerprint) ze względu na złożoność widma w tym zakresie służy do

identyfikacji badanej substancji poprzez porównanie jej widma z widmem substancji wzorcowej. Związek organiczny w tym obszarze liczby falowej posiada układ pasm, który jest dla niej charakterystyczny, tzw. „odcisk palca”, który określa czy badany związek jest identyczny z wzorcem (Rys. 4).



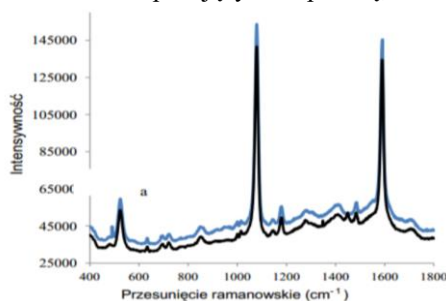
Rys. 4. Widmo IR L-tryptofanu (<https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C73223>).

6. Spektroskopia Ramanna

Spektroskopia Ramana należy do metod spektroskopowych, które z powodzeniem mogą być wykorzystywane w analizie jakościowej i ilościowej ciał stałych, cieczy oraz gazów. Jest metodą komplementarną ze spektroskopią w podczerwieni IR. W przypadku, gdy w cząsteczce występuje środek symetrii mogą istnieć drgania, które są aktywne w widmie IR, a niewidoczne w widmie Ramana (i odwrotnie). Częściej jednak zdarza się, iż zarówno na widmie Ramanowskim oraz widmie IR można zarejestrować pasma tych samych grup funkcyjnych. Różnią się one pomiędzy sobą wyłącznie intensywnością.

Spektroskopia Ramana wykorzystuje zjawisko rozproszenia promieniowania elektromagnetycznego, które jest związane ze zmianą energii rozpraszanych fotonów. Źródłem promieniowania są lasery pracujące w zakresie od ultrafioletu do podczerwieni (Nykiel 2013). Próbkę naświetla się promieniowaniem monochromatycznym i obserwuje się widmo promieniowania rozproszonego przez próbkę (Zieliński i Rajca 2018). Widma Ramanowskie podobnie jak widma w podczerwieni zawierają pasma oscylacyjne drgań normalnych cząsteczek, dzięki czemu mogą być wykorzystywane w analizie chemicznej związków organicznych. Jednak aktywne są tylko te drgania, w których nastąpiła zmiana polaryzowalności wiązania, a więc pasma drgań niepolarnych i homojądrowych takich jak C=C, N-N, czy też S-S (Nykiel 2013).

Widmo Ramana określa się jako zależność intensywności sygnału liczby falowej (częstości), która jest różnicą pomiędzy promieniowaniem padającym na próbkę, a rozpraszonym (Rys.5).



Rys. 5. Przykładowe widmo Ramana (Michota-Kamińska 2016).

Widmo Ramanowskie można otrzymać za pomocą dwóch technik różniących się długością promieniowania elektromagnetycznego padającego na próbkę oraz sposobem jego detekcji (Das i Agrawal 2011). Wyróżniamy technikę dyspersyjną oraz technikę z transformacją Fouriera (FT). W spektrometrach dyspersyjnych do wzbudzenia próbki wykorzystuje się lasery pracujące w zakresie światła widzialnego, promieniowanie rozproszone przez próbkę jest analizowane przez klasyczny monochromator. Natomiast do detekcji wykorzystywane są detektory matrycowe lub fotopowielacze.

Spektrometry z transformacją Fouriera (spektrometry fourierowskie) do wzbudzenia próbki wykorzystują lasery z zakresu bliskiej podczerwieni. Po wzbudzeniu sygnał próbki zostaje przekształcony z użyciem interferometru w sygnał interferencyjny, który następnie po detekcji daje interferogram zawierający w sobie informacje o całym widmie oscylacyjnym (Nykiel 2013).

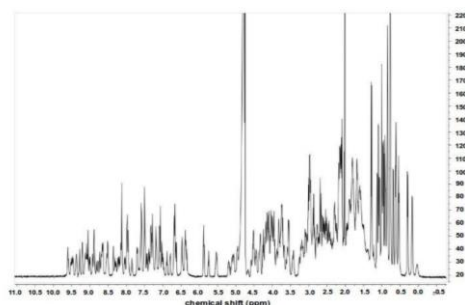
Ogromna zaletą spektroskopii Ramana jest jej czułość na niewielkie zmiany strukturalne analizowanej próbki. Widma ramanowskie dostarczają szczegółowe informacje o składzie chemicznym próbki, możliwa jest identyfikacja nawet dużych molekuł takich jak białka, kwasy nukleinowe lub lipidy. Ze względu na liczne zalety, metoda znalazła zastosowanie nie tylko w medycynie, ale przede wszystkim w farmacji m.in. w analizie procesów uwalniania substancji leczniczych z leków, a następnie badania penetracji tkanek przez uwolnione związki (Wartewig i Neubert 2005).

7. Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego

Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) obok krystalografii jest podstawową techniką spektroskopową wykorzystywaną do badań strukturalnych związków organicznych m.in. białek, kwasów nukleinowych, cukrów, czy też peptydów (Wuthrich 1995). Technika NMR umożliwia badanie właściwości oddziaływań związków chemicznych w stanie skupienia ciekłym oraz stałym. Jak zostało wspomniane wcześniej technika ta wykazuje zdolność do analizowania zarówno małych cząsteczek nieorganicznych i organicznych aż po duże cząsteczki polimerów naturalnych oraz syntetycznych. Już na etapie projektowania i syntezy nowych związków nieorganicznych i organicznych, a następnie na finalnym etapie w czasie kontroli jakości uzyskanych produktów technika ta zyskała ogromne znaczenie. Prócz przemysłu chemicznego, spektroskopia NMR znalazła szerokie zastosowanie m.in. w przemyśle spożywczym, ale także w farmacji, czy też biologii strukturalnej. Z użyciem magnetycznego rezonansu jądrowego możliwe jest nie tylko wyznaczenie lub potwierdzenie przestrzennej struktury analizowanych związków, ale przede wszystkim określenie wewnętrznej dynamiki badanej cząsteczki oraz wzajemnych oddziaływań pomiędzy cząsteczkami (Żebro 2018).

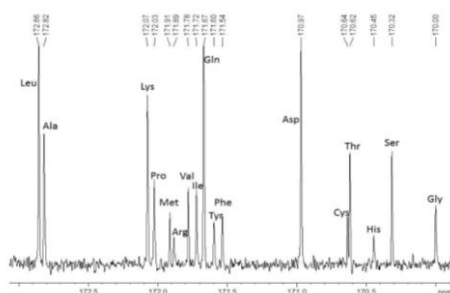
Warunkiem wystąpienia zjawiska magnetycznego rezonansu jądrowego jest posiadanie przez jądro analizowanego izotopu niezerowej wartości spinowej liczby kwantowej I . Widma NMR, których wartości spinu jądrowego wynosi $\frac{1}{2}$ (np. ^1H , ^{13}C) mogą być z powodzeniem rejestrowane ze względu na to, iż ich jądra charakteryzują się sferycznym rozkładem ładunku (Oleszczuk 2006; Silverstein i in. 2012). Następnie próbkę umieszcza się w zewnętrznym polu magnetycznym. Sygnały NMR powstają w wyniku wzbudzenia próbki przy pomocy fal radiowych, które następnie są rejestrowane przez odpowiednie odbiorniki radiowe. W wyniku zmiany częstotliwości rezonansowej pola magnetycznego wokół jąder atomowych w cząsteczce uzyskuje się informacje o strukturze elektronowej cząsteczki oraz obecności określonych grup funkcyjnych. Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego jest bardzo czułą metodą, szczególnie przydatną nie tylko do identyfikacji związków organicznych, ale również białek i innych złożonych cząsteczek.

Ważnym aspektem pracy jest przedstawienie przydatności oraz określenie unikalności spektroskopii NMR w analizie strukturalnej białek. Poza wyznaczeniem struktury przestrzennej białek z użyciem widma NMR możliwe jest także (jak już zostało wcześniej wspomniane) określenie dynamiki i oddziaływań makromolekuły z innymi indywiduami chemicznymi (Kovermann i in. 2016; Żebro 2018). Wśród indywiduów chemicznych wyróżniamy m.in. jony metali, cząsteczki organiczne o niewielkiej masie cząsteczkowej, kwasy nukleinowe oraz inne białka (Żebro 2018). Ponadto z użyciem spektroskopii NMR możliwe jest przeprowadzenie analizy białek w roztworze, których krystalizacja stanowi duży problem, możliwa jest również analiza molekuł, które wykazują nieuporządkowany charakter. Wykorzystanie innych metod spektroskopowych w tych przypadkach jest niemożliwe (Żebro 2018). Jednak w trakcie analizy białek z użyciem spektroskopii NMR można napotkać problemy związane z nakładaniem się sygnałów na widmach białek. Interpretacja widm jednowymiarowych w celu uzyskania szczegółowych informacji z rozdzielczością atomową jest utrudniona, a czasami niemożliwa nawet w przypadku niewielkich cząsteczek białka. Na rys. 6 przedstawiono przykładowe widmo białka, na którym możliwe jest dostrzeżenie wyłącznie grup sygnałów.



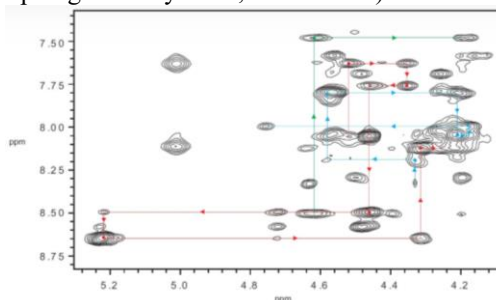
Rys. 6. Widmo ^1H NMR rubredoksyny (Valafar i Jiménez Irausquin 2012).

Wraz ze wzrostem masy cząsteczkowej i rozmiarów białka wzrasta problem nakładania się sygnałów na siebie. Podobnie dzieje się w przypadku widma węglowego białka (Rys. 7) (Hamilton i in. 1984).

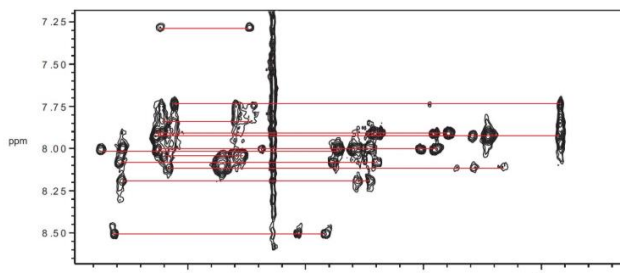


Rys. 7. Przykładowe widmo ^{13}C NMR aminokwasu (Hafer 2019).

Istnieje jednak rozwiązanie, które pozwala na wykorzystanie spektroskopii NMR w analizie białek nawet o dużych masach cząsteczkowych. Jednoczesne zastosowanie dwóch komplementarnych koncepcji takich jak znaczenie izotopowe białka oraz korelacyjne widma wielowymiarowe (Rys. 8 i 9) pozwalają na wyznaczenie struktury białka o masie cząsteczkowej nieprzekraczającej 80 kDa oraz przypisanie odpowiednich sygnałów na widmie białka o masie nawet 200 kDa (Gelis i in. 2007; Sprangers i Kay 2007; Żebro 2018).



Rys. 8. Widmo NOESY 18-aminokwasowego peptydu (Brzozowski 2015).



Rys. 9. Widmo TOCSY 18-aminokwasowego peptydu (Brzozowski 2015).

8. Wnioski

Techniki spektroskopowe przedstawione w niniejszej pracy zyskują coraz większe znaczenie w analizie strukturalnej białek. Kompleksowe zastosowanie spektrofotometrii UV/VIS, spektroskopii w podczerwieni, spektroskopii Ramana oraz spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego umożliwia m.in. określenie zdolności, rodzaju, miejsca, siły wiązania leków z białkami. Dobór odpowiednich technik w dużej mierze zależy od rodzaju badanej próbki i informacji jaką chcemy uzyskać w drodze analizy. Komplementarność opisanych metod badawczych niesie ogrom informacji potrzebnych do dokładnej analizy.

Praca zrealizowana w ramach umowy o realizację pracy naukowo-badawczej przez doktoranta nr KNW-2-040/D/8/N.

9. Literatura

- Brzozowski K (2015) Magnetyczny Rezonans Jądrowy w badaniu struktur biopolimerów. *Laborant* 11: 18–27.
- Das RS, Agrawal YK (2011) Raman spectroscopy: recent advancements, techniques and applications. *Vibrational Spectroscopy* 57: 163–176.
- Gelis I, Bonvin AM, Keramisanou D, Koukaki M, Gouridis G, Karamanou S, Economou A, Kalodimos CG (2007) Structural Basis for Signal-Sequence Recognition by the Translocase Motor SecA as Determined by NMR. *Cell* 131: 756–769.
- Hafer E (2019) ¹³C NMR analysis of peptides and amino acids. Spectral service: <https://www.spectralservice.de/13c-nmr-analysis-of-peptides-and-amino-acids>, 10.05.2020.
- Hamilton JA, Cistola DP, Morrisett JD, Sparrow JT, Small DM (1984) Interactions of myristic acid with bovine serum albumin: a ¹³C NMR study. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81(12): 3718–3722.
- Kęcki Z (1992) Podstawy spektroskopii molekularnej, PWN, Warszawa.
- Kovermann M, Rogne P, Wolf-Watz M (2016) Protein dynamics and function from solution state NMR spectroscopy. *Quarterly Reviews of Biophysics* 49: e6.
- L-Tryptophan w: National Institute of Standards and Technology, Chemistry WebBook, <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C73223>, 10.05.2020.
- Michota-Kamińska A (2016) Modyfikowane nanostruktury plazmoneczne do analiz spektroskopowych wybranych związków i układów biologicznych istotnych w diagnostyce medycznej. Autoreferat, Instytut Chemii Fizycznej, Polska Akademia Nauk, Warszawa
- Nykiel P (2013) Spektroskopia Ramana: nowoczesna technika w diagnostyce medycznej i analizie biochemicznej. *Biuletyn Wydziału Farmaceutycznego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego* 4: 27–36.
- Oleszczuk M (2006) Magnetyczny rezonans jądrowy w badaniach strukturalnych biomolekuł na przykładzie badania modelowych układów helikalnych. *Biuletyn Wydziału Farmaceutycznego Akademii Medycznej w Warszawie* 1: 1–16.
- Pons M, Le Bonté S, Potier O (2004) Spectral analysis and fingerprinting for biomedica characterization. *Journal of Biotechnology* 113: 211–230.
- Silverstein RM, Webster FX, Kiemle DJ (2012) Spektroskopowe metody identyfikacji związków organicznych. Wydawnictwo Naukowe PWN.
- Spektroskopia w: Encyklopedia Powszechna PWN, <https://encyklopedia.pwn.pl/3978131.html>, 10.05.2020.
- Sprangers R, Kay LE (2007) Quantitative dynamics and binding studies of the 20S proteasome by NMR. *Nature* 445: 618–622.
- Wartewig S, Neubert RRH (2005) Pharmaceutical applications of Mid-IR and Raman spectroscopy. *Advanced Drug Delivery Reviews* 57: 1144–1170.
- Wüthrich K (1995) NMR: This other method for protein and nucleic acid structure determination. *Acta Crystallographica Section D* 51: 249–270.

- Valafar H, Jiménez Irausquin S (2012) Structure and Dynamics of Proteins from Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. Chapter: 43–38.
- Zieliński W, Rajca A (red.) (2018) Metody spektroskopowe i spektrometria mas w zastosowaniu do identyfikacji związków organicznych. Wydawnictwo Politechniki Śląskiej, Gliwice.
- Żebro S (2018) Wysokowymiarowe metody spektroskopii NMR dedykowane do badań białek nieustrukturyzowanych. Praca doktorska. Uniwersytet Warszawski, Wydział Chemii.

17. Wybrane biosurfaktanty drożdżowe

Selected yeast biosurfactants

Rekiel Edyta

Katedra Zjawisk Międzyfazowych, Instytut Nauk Chemicznych, Wydział Chemii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin

Opiekun naukowy: prof. dr hab. Anna Zdziennicka

Rekiel Edyta: edyta.rekiel@poczta.umcs.lublin.pl

Słowa kluczowe: biosurfaktanty, drożdże, GRAS

Streszczenie

Związki powierzchniowo czynne to substancje o budowie amfifilowej. Oznacza to, że zawierają część hydrofilową i hydrofobową. Wykorzystuje się je niemal wszędzie, a towarzyszą człowiekowi w codziennych czynnościach, pracy czy sklepie. Surfaktanty potrafią zmniejszać napięcie powierzchniowe i międzyfazowe, stabilizują emulsje, a także zwiększają rozpuszczalność różnych substancji. Szacuje się, że rocznie produkowane jest niemal 10 mln ton surfaktantów, a zapotrzebowanie na nie stale rośnie. Tym samym, syntetyczne surfaktanty stają się substancjami, które co raz częściej pojawiają się w środowisku, stanowiąc zagrożenie dla fauny i flory oraz wód powierzchniowych, a u człowieka wywołując reakcje alergiczne. Producenci chętnie sięgają po bardziej ekologiczne rozwiązania, a szczególnym zainteresowaniem cieszą się biosurfaktanty – substancje, które można pozyskiwać od mikroorganizmów. Biosurfaktanty są nazywane naturalnymi związkami powierzchniowo czynnymi i posiadają takie same, a często lepsze właściwości fizykochemiczne od surfaktantów syntetycznych. Chociaż głównym producentem biosurfaktantów pozostają bakterie, ze względu na ich patogeniczny charakter, zarówno naukowcy jak i producenci zwracają się w kierunku związków powierzchniowo czynnych produkowanych przez inne mikroorganizmy, np. drożdże.

1. Wstęp

Większość biosurfaktantów pozyskiwanych z mikroorganizmów opisywanych w literaturze ma pochodzenie bakteryjne. Wiele ze wspomnianych szczepów, np. *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Arthrobacter* to patogeny powodujące choroby i tym samym zastosowanie ich do produkcji biosurfaktantów jest ograniczone, między innymi w wykorzystaniu ich w przemyśle spożywczym. Badania nad produkcją biosurfaktantów drożdżowych stają się coraz ważniejsze. Głównymi producentami są szczepy *Candida*, *Pseudozyma* i *Yarrowia*. Ogromną zaletą stosowania drożdży w produkcji biosurfaktantów jest ich status GRAS. Organizmy GRAS nie są toksyczne ani patogenne, co pozwala na stosowanie tych produktów w przemyśle spożywczym i farmaceutycznym (Sen 2010). Biosurfaktanty drożdżowe zazwyczaj składają się z aminokwasów lub białek oraz mono-, di- lub polisacharydów jako części hydrofilowej oraz nienasyconych lub nasyconych kwasów tłuszczowych jako części hydrofobowej (Katemai 2011). Drożdże są znane również z tego, że produkują biosurfaktanty w wyższych stężeniach niż bakterie, co jest dużą zaletą tych mikroorganizmów. Jednakże, wykorzystanie ich w przemyśle nie jest zbyt szerokie ze względu na wysokie koszty otrzymywania, co powoduje, że biosurfaktanty drożdżowe są ekonomicznie niepraktyczne do produkcji przemysłowej na wysoką skalę. Jedną z możliwych strategii dla zmniejszenia kosztów produkcji jest użycie substancji takich jak odpady przemysłowe czy pozostałości w przemyśle spożywczym, które zawierają wysokie stężenia wodorowęglanów i lipidów. Oba te składniki są ważne w produkcji biosurfaktantów. Poza tym, do produkcji wykorzystuje się również różne rodzaje wstępnie zużytych olejów, mydeł, odpady z przetwarzania warzyw takich jak ziemniaki czy maniok, melasę z trzciny cukrowej, a ostatnio również glicerol, który jest pozostałością po produkcji paliwa dla biodiesla (Accorsini i in 2012).

Najlepiej poznanymi biosurfaktantami produkowanymi przez drożdże są glikolipidy: mannosylerytrytole (rodzaj *Pseudozyma*), soforolipidy (rodzaj *Candida* oraz *Starmerella*) oraz lipidy

celobiozy (rodzaje *Pseudozyma* i *Cryptococcus*). Dodatkowo, różne gatunki drożdży wytwarzają również złożone polimerowe biosurfaktanty o charakterze węglowodanowo-białkowo-lipidowym i węglowodano-białkowym (Ianiewa 2019). Przykładowo, *Candida bombicola*, *Candida petrophilum* i *Candida bogoriensis* są znanymi producentami soforolipidów. *Candida antarctica* jest głównym producentem lipidów mannosylerytrytolowych, a *Candida tropicalis* i *Candida lipolytica* IA 1055 produkują złożone biosurfaktanty węglowodanowo-białkowo-lipidowe. Drożdże z gatunku *Candida ingens*, *Candida utilis*, *Candida valida* i *Candida boleticola* są producentami biosurfaktantów, które jeszcze nie zostały sklasyfikowane (Accorsini i in. 2012).

2. Opis zagadnienia

Biosynteza glikolipidów zewnątrzkomórkowych przez różne gatunki drożdży ma ze sobą wiele wspólnego. Po pierwsze następuje sekwencyjne przenoszenie reszt węglowodanowych do reszty kwasu tłuszczowego przez glikozylotransferazy, a na ostatnim etapie przyłączanie O-podstawników, grup octanowych (przez acetylotransferazy) i krótkołańcuchowych reszt kwasów tłuszczowych (przez acylotransferazy). Specjalne enzymy są odpowiedzialne za biosyntezę określonych krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (Kulakovskaya i Kulakovskaya 2014).

Biosynteza lipidów mannosylerytrytolów, chociaż obejmuje także glikozylotransferazy, acylotransferazy i acetylotransferazy, jest wykonywana przez ich własny, specyficzny zestaw enzymów (Kulakovskaya i Kulakovskaya 2014).

W przypadku lipidów celobiozy, gatunek *Ustilago maydis* wydziela szereg metabolitów wtórnych, a wydzielanie zachodzi przy niedoborze azotu. Ich biosynteza rozpoczyna się hydroksylacją kwasu palmitynowego w pozycji 16 poprzez enzym monooksygenazy cytochromu P450 Cyp1, a następnie hydroksylacji w pozycji 15 przez monooksygenazę P450 Cyp2. Następnie glikozylotransferazy zależne od difosforanu urydyny (UDP) Ugt1/Fgt1 przenoszą reszty glukozowe jedną po drugiej, aż do powstania najprostszego lipidu celobiozowego bez żadnych O-podstawników. Kolejne reakcje katalizowane są przez acetylo- i acylotransferazy (Kulakovskaya i Kulakovskaya 2014).

Produkcja soforolipidów jest optymalna jeśli podłoże zawiera jednocześnie hydrofilowe i hydrofobowe źródła węgla, np. glukozę i kwasy tłuszczowe. Biosynteza rozpoczyna się od hydroksylacji kwasów tłuszczowych. Jeśli podłoże zawiera trójglicerydy, lipaza zewnątrzkomórkowa hydrolizuje je do kwasów tłuszczowych, które są wchłaniane przez komórki. Soforolipidy mają reszty kwasów tłuszczowych o 16 lub 18 atomach węgla. Te modyfikacje, podobnie jak pojawienie się podwójnego wiązania przy reszcie kwasowej, nie wymagają jakichś specyficznych enzymów do biosyntezy, ale wykonywane są przez wspólne enzymy biosyntezy kwasu tłuszczowego (Kulakovskaya i Kulakovskaya 2014).

Geny, które kodują biosyntezę lipidów mannosylerytrytolu, lipidów celobiozy i soforolipidów to geny chromosomalne, które występują w skupiskach o wspólnej regulacji (Kulakovskaya i Kulakovskaya 2014).

Lipidy mannosylerytrytolu (MELs) to rodzaj biosurfaktantów lipidowych wytwarzanych przez różne odmiany drożdży i grzybów, które wykazują doskonałe właściwości międzyfazowe i biochemiczne. Mannosylerytrytole składają się z kwasów tłuszczowych oraz 4-O- β -D-mannopiranozyloerytrytolu lub 1-O- β -D-mannopiranozyloerytrytolu. Związki te funkcjonują jako glikolipidy i produkowane są niemal wyłącznie przez rodzaj *Pseudozyma* (Morita i in. 2015). Ten amorficzny rodzaj podstawnokomórkowy należy do klasy *Ustilaginomycetes* i obejmuje 16 gatunków. Są to najczęściej pospolite drożdże środowiskowe, na ogół izolowane z liści roślin, kwiatów lub gleby (Herb i in. 2015). Pierwszy znany producent mannosylerytrytolów, *Pseudozyma antarctica* T-34 został po raz pierwszy zidentyfikowany ponad dwie dekady temu. Produkuje on głównie MEL-A, wraz z mniejszymi ilościami MEL-B i MEL-C. Do zidentyfikowanych drożdży, które wytwarzają mannosylerytrytole należą: *Pseudozyma rugulosa*, *Pseudozyma aphidis*, *Pseudozyma parantarctica*, *Pseudozyma tsukubaensis*, *Pseudozyma fusiformata*, *Pseudozyma graminicola*, *Pseudozyma shanxiensis*, *Pseudozyma siamensis* i *Pseudozyma crassa*. Co więcej, grzyb *Ustilago cynodontis* produkuje głównie MEL-C, jeśli jest hodowany w obecności oleju roślinnego (Morita i in. 2015). Rodzaj wytwarzanego mannosylerytrytolu różni się w zależności od szczepów

i gatunku *Pseudozyma*. Stąd jego produkcja może być wykorzystana jako ważny indeks taksonomiczny dla identyfikacji tego typu drożdży (Arutchevi i in. 2008). Mannosylerytrytole mają świetne właściwości międzyfazowe, potrafią również indukować różnicowanie komórek ssaków i wiązanie immunoglobulin. Podobnie jak w przypadku wielu lipidów, różnice w strukturach mannosylerytrytolu będą wpływać na jego aktywność biologiczną. Przykładem może być MEL-A czyli diacetylowany lipid mannosylerytrytolu, który silnie zwiększa wydajność transfekcji genów za pomocą kationowych liposomów. Ponadto, niektóre mannosylerytrytole wykazują dobre właściwości przeciwwzapalne, np. poprzez hamowanie wydzielania mediatorów zapalnych komórek tłuszcznych (mastocytów). W połączeniu z wysoką biodegradowalnością i względną łatwością w produkcji, związki te stanowią nadzieję dla zastosowań przemysłowych, przede wszystkim żywności, kosmetyków i farmaceutyków. Mannosylerytrytole wykazują aktywność nawilżającą podobną do ceramidu-3 ze względu na podobną budowę i zdolność tworzenia liotropowych ciekłych kryształów zawierających fazę lamellarną. Dodatkowo mannosylerytrytole zwiększyły ogólną wytrzymałość włosów, a także utrzymywały ich średni współczynnik tarcia (Morita i in. 2015). Rosnące zainteresowanie mannosylerytrytolami można przypisać ich zastosowaniom farmaceutycznym, wszechstronnym funkcjom biochemicznym, w tym przeciwnowotworowym i indukowaniu różnicowania ludzkich komórek białaczki. Biosurfaktanty te można stosować w leczeniu schizofrenii lub chorób spowodowanych zaburzeniami metabolizmu dopaminy i zakażenia drobnoustrojami. Mannosylerytrytole są używane w oczyszczaniu lektyn (immunoglobuliny G) oraz w przygotowaniu zawiesiny lodowej jako czynnika przeciwdziałającego aglomeracji. Właściwość tych biosurfaktantów do samoorganizacji staje się przedmiotem zainteresowania ze względu na możliwe wykorzystanie jej w transfekcji genów i dostarczania leków. Ze względu na zmienną hydrofilowość, mannosylerytrytole wykazują różne zdolności do samoorganizacji, w tym tworzenia liposomów, monowarstw, faz lamellarnych, faz gąbczastych, ciekłych kryształów liotropowych i dwuciągłych faz sześciennych (Arutchevi i in. 2008).

Soforolipidy wytwarzane są przez niepatogenne drożdże *Candida bombicola*. Jest to gatunek najbardziej znany jako producent naturalnie dużych ilości biosurfaktantów. Drożdże te są w stanie wytwarzać cząsteczki soforolipidów ze źródeł odnawialnych, a nawet strumieni odpadowych. Faza wzrostu i faza produkcji są od siebie wyraźnie oddzielone wykładniczym generowaniem biomasy i produkcją soforolipidów w fazie stacjonarnej. Dużo wysiłku włożono w optymalizację procesu fermentacji doprowadzając go do możliwości wytworzenia 400 g L⁻¹ soforolipidów (Roelants i in. 2013). Te glikolipidowe biosurfaktanty posiadają struktury określane jako mieszanina laktonowych i kwasowych sofosfosydów kwasu 17-L-hydroksydekanowego. W uproszczeniu, soforolipidy to połączenie kwasu tłuszczowego o 16 lub 18 atomach węgla z soforozą czyli disacharydem o dwóch jednostkach glukozy połączonych ze sobą wiązaniem β -1,2-glikozydowym. Podobne wiązanie (β -glikozydowe) łączy grupę hydroksylową kwasu tłuszczowego z samą soforozą. Jeśli grupa karboksylowa jest wolna, tworzy formę kwasową lub otwartą, jeśli jest zestyfikowana w pozycji 4'' (rzadko 6' lub 6'') tworzy formę laktonową. Różne klasy strukturalne tych biosurfaktantów sprawiają, że soforolipidy posiadają dużą zmienność właściwości fizykochemicznych. Tym samym, przykładowo, właściwości antybakteryjne i zdolność do tworzenia piany czy równowaga hydrofilowo-lipofilowa są pod silnym wpływem form laktonowych. Te również najbardziej obniżają napięcie powierzchniowe i są najbardziej antybakteryjne. Formy kwasowe soforolipidów mają lepszą zdolność pianotwórczą i rozpuszczalność. Obecność grupy acetylowej powoduje obniżenie hydrofilowości i pobudza działanie antywirusowe. Kwasowość soforolipidów stymuluje również cytokiny czyli białka odpowiedzialne za odpowiadz odpornościową organizmu (Shah i in. 2005). Przeprowadzono szeroko zakrojone badania warunków hodowli szczepu *Candida* z zastosowaniem różnych substratów, takich jak: węglowodany, oleje roślinne, tłuszcze zwierzęce, serwatka, melasa sojowa i pozostałości oleju posmażalniczego. Co więcej, opisano różne nowe właściwości soforolipidów, między innymi zjadliwą aktywność przeciw wirusowi HIV, przeciwbakteryjność, właściwości antynowotworowe i indukowanie apoptozy (Hirata i in. 2009). Za ich pomocą próbuje się rozwiązać problem odporności bakterii na antybiotyki, ale ich działanie przeciwdrobnoustrojowe nie jest ograniczone jedynie do bakterii, ponieważ soforolipidy wykazują właściwości przeciwwgrzybicze i przeciwwirusowe. Podczas dalszej modyfikacji, soforolipidy można

zorganizować w liposomy, które mogłyby być wykorzystane w układach dostarczających leki. Ze względu na strukturalnie podobną podwójną warstwę lipidową błony komórkowej, soforolipidy po podaniu z lekiem mogą się rozciągać i dostarczać cząsteczki leku bezpośrednio do wnętrza komórki (Joshi-Navare i Prabhune 2013).

Różnorodność produkowanych metabolitów wtórnych jest jedną z charakterystycznych cech królestwa grzybów. Związki te, nie są ważnymi związkami dla metabolizmu grzybów, aczkolwiek nadają produkującym je organizmom zdolność, np. do przetrwania w niekorzystnych warunkach i w walce o nisze ekologiczne. Wiele takich metabolitów ma właściwości antybiotyczne, wykazując działanie grzybobójcze wobec różnych gatunków drożdży i grzybów z innych taksonomów, w tym patogennych dla ludzi, zwierząt i roślin. (Kulakovskaya i Mironov, 2016). Obecnie, *lipidy celobiozy* nie są uznawane za potencjalnie znaczące ekonomicznie środki powierzchniowo czynne. Ich produkcja przez drożdże jest niższa, nawet w zoptymalizowanych wariantach uprawy, przyrównując ją do soforolipidów i lipidów mannosylerytrytolu (Kulakovskaya i Kulakovskaya 2014). Lipidy celobiozy są funkcjonalnymi glikolipidami składającymi się z celobiozy – dwucukru zbudowanego z dwóch cząsteczek glukozy, połączonych wiązaniem β -1,4-glikozydowym – jako części hydrofilowej oraz grup acetylowych i kwasów tłuszczowych jako części hydrofobowych. Wytwarzane są przez grzyby typu śnieć gatunku *Ustilago maydis* i dwa rodzaje drożdży ze szczepu *Pseudozyma*: *Pseudozyma fusiformata* i *Pseudozyma graminicola*. Lipidy celobiozy wykazują bardzo dobre właściwości grzybobójcze przeciwko różnym drożdżom, również przeciwko gatunkom chorobotwórczym (Morita i in. 2012). Z punktu widzenia nauk zajmujących się zjawiskami międzyfazowymi, lipidy celobiozy produkowane przez *Cryptococcus humicola* są bardzo interesujące ze względu na swoją asymetryczność nazywaną „bolaformą” lub „bolaamfifilową”, która charakteryzuje się posiadaniem dwóch różnych głów polarnych na dwóch końcach hydrofobowej podstawy. Niestety, niewiele wiadomo o tym konkretnym typie biosurfaktantu ze względu na niską wydajność jego produkcji (Morita i in. 2011). Wysoka aktywność przeciwgrzybicza jest utrzymywana nawet przy niskich wartościach pH. To szerokie spektrum obejmuje patogeny kryptokokozę i kandydozę, a także grzyby fitopatogenne. Stabilność termiczna tych lipidów oraz stabilność w ich przechowywaniu sprawiają, że są one obiecującymi związkami w opracowaniu nowych fungicydów. Niestety, w przypadku zastosowaniu tych lipidów jako leków dla ludzi i zwierząt, problemem jest brak aktywności w neutralnych wartościach pH. Mogą być one jednak dość interesującymi substancjami w leczeniu grzybicy skóry oraz jako składniki kremów czy szamponów. Korzystne byłoby również zastosowanie lipidów celobiozy w rolnictwie, przede wszystkim do zwalczania chorób roślin, wywoływanych przez fitopatogeny, np. biała zgnilizna, czy mączniak prawdziwy. Przewiduje się również ochronę zebranych owoców i warzyw przed gniciem. W takim przypadku może okazać się, że możliwa będzie kolonizacja roślin przez hodowle potrzebne producentom (Kulakovskaya i Kulakovskaya 2014). Co więcej, lipidy celobiozy mogą być detergentami o biologicznej aktywności pozwalającym im na uszkodzenia membran komórkowych (Kulakovskaya i Mironov 2016).

3. Podsumowanie

Wytwarzanie biosurfaktantów przez bakterie, drożdże i grzyby jest bardzo ważną częścią proekologicznego i zrównoważonego przemysłu. Badania nad surfaktantami naturalnymi wzrosły ze względu na ich doskonałe właściwości, a w tym biodegradowalność, niską toksyczność, różnorodność zastosowań, a także funkcjonalność nawet w ekstremalnych warunkach (Sen 2010). Wykazano, że biosurfaktanty wytwarzane przez drożdże wykazują działanie przeciwbakteryjne, modulujące odporność i przeciwnowotworowe. Stwierdzono, że biosurfaktant wytwarzany przez szczep *Candida lipolytica* jest skuteczny przeciwko szerokiemu spektrum bakterii Gram-dodatnich i słabo hamuje niektóre bakterie Gram-ujemne i drożdże. Poszukiwanie nowych producentów biosurfaktantów pochodzenia drożdżowego ciągle trwa w niszach ekologicznych (Ianieva 2019). Substancje te mają niską toksyczność, szerokie i różnorodne działanie biologiczne, są biodegradowalne i można zastosować je w produkcjach mikrobiologicznych przy użyciu gatunków niepatogennych. Tym samym, glikolipidy wydają się być obiecujące jako środki emulgujące dla związków słabo rozpuszczalnych (np. fenantrenu) w układach biodegradacyjnych i bioczyznikach do wykrywania

i oznaczania ilościowego. Ogólnie, pozakomórkowe glikolipidy drożdży są obiecującymi produktami drobnoustrojowymi dla przemysłu, rolnictwa i medycyny. Ich zastosowanie można rozszerzyć dzięki opracowaniu niedrogich metod produkcji mikrobiologicznej z wykorzystaniem pożywek na bazie odpadów przemysłu spożywczego, odpadów rolniczych i produkcji biodiesla (Kulanovskaya i Kulanovskaya 2014).

4. Literatura

- Accorsini FB, Mutton MJR, Lemos EGM i in. (2012) Biosurfactants production by yeasts using soybean oil and glycerol as low cost substrate. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43: 116-125.
- Arutchelvi JI, Bhaduri S, Uppara PV i in. (2008) Monnosylerythritol lipids: a review. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 35: 1559-1570.
- Herb A, Sabou M, Delhorme J-B i in. (2015) *Pseudozyma aphidis* fungemia after abdominal surgery: First adult case. *Medical Mycology Case Reports* 8: 37-39.
- Hirata Y, Ryu M, Oda Y i in. (2009) Novel characteristics of sophorolipids, yeast glycolipid biosurfactants, asbiodegradable low-foaming surfactants. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 108 (2): 142-146.
- Ianieva OD (2019) Characterization, stability and antimicrobial activity of biosurfactants produced by *Candida* yeasts isolated from flowering plants. *Мікробіол. Журн. Т. 81, № 2*.
- Joshi-Navare K, Prabhune A (2016) A Biosurfactant-Sophorolipid Acts in Synergy with Antibiotics to Enhance Their Efficiency, *BioMed Research International* 2013, Article ID 512495, 8 pages.
- Katamai W (2011) Biosurfactants from yeasts, *Walailak Journal of Science and Technology (WJST)* 9 (1): 1-8.
- Kulakovskaya E, Kulakovskaya T (2014) Extracellular Glycolipids of Yeasts. *Biodiversity, Biochemistry, and Prospects*. Academic Press 75-83.
- Kulakovskaya EV, Mironov AA (2016) Resistance to Cellobiose Lipids and Specific Features of Lipid Composition in Yeast. *Applied Biochemistry and Microbiology* 52 (6): 615-620.
- Morita T, Fukuoka T, Imura T i in. (2012) Identification of the microbial producer for functional glycolipids, cellobiose lipids. *New Biotechnology* 29 (Supplement), S215
- Morita T, Fukuoka T, Imura T i in. (2015) Mannosylerythritol Lipids: Production and Applications. *Journal of Oleo Science* 64: 133-141.
- Morita T, Ishibashi Y, Fukuoka T i in. (2011) Production of Glycolipid Biosurfactants, Cellobiose Lipids, by *Cryptococcus humicola* JCM 1461 and Their Interfacial Properties. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 75 (8): 1597-1599.
- Roelants SLKW, Saerens KMJ, Derycke T i in. (2013) *Candida bombicola* as a platform organism for the production of tailor-made biomolecules. *Biotechnology and Bioengineering* 110 (9): 2494-2503.
- Sen R i in. (2010) Biosurfactants. Springer Science+Business Media, LLC. Volume 672.
- Shah V, Doncel GF, Seyoum T i in. (2005) Sophorolipids, microbial glycolipids with anti-human immunodeficiency virus and sperm-immobilizing activities. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49: 4093-4100.

18. Biosurfaktanty w zastosowaniach kosmetycznych

Biosurfactants in cosmetic applications

Rekiel Edyta

Katedra Zjawisk Międzyfazowych, Instytut Nauk Chemicznych, Wydział Chemii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin

Opiekun naukowy: prof. dr hab. Anna Zdziennicka

Rekiel Edyta: edyta.rekiel@poczta.umcs.lublin.pl

Słowa kluczowe: biosurfaktanty, kosmetyki, formułacje kosmetyczne

Streszczenie

Surfaktanty to związki powierzchniowo czynne i jedno z najbardziej rozpowszechnionych związków w życiu codziennym człowieka. Posiadają one amfifilową budowę, tzn. zbudowane są z części hydrofobowej (ogon) i hydrofilowej (głowa). Ze względu na ich zdolność do obniżania napięcia powierzchniowego oraz międzyfazowego, wykorzystuje się je w różnego rodzaju gałęziach przemysłów i na szeroko zakrojonej skali. Żywność, farmaceutyki i leki, formułacje kosmetyczne produkują się z wykorzystaniem surfaktantów, które zapewniają odpowiednie właściwości emulgujące, zwilżalność, rozpuszczalność, dyspersyjność czy tworzenie piany. Niestety, większość tych substancji zagraża środowisku naturalnemu, powoduje alergie i prowadzi do erozji gleb. Z tego powodu producenci coraz częściej sięgają po substancje pochodzenia naturalnego – biosurfaktanty. Te naturalne środki powierzchniowo czynne stają się zamiennikami substancji syntetycznych, mając dobrą biodegradowalność, odporność na zmienne warunki pH i temperatury oraz podobną, jak nie lepszą zdolność do modyfikowania napięcia powierzchniowego.

1. Wstęp

Produkty kosmetyczne są właściwie niezbędnym elementem w życiu człowieka. Wykorzystuje się je nie tylko dla zachowania młodego wyglądu czy poprawienia kondycji skóry, ale również do pozbycia się uciążliwych dolegliwości takich jak wypadające włosy czy łupież. Ludzie wykorzystują ogromne ilości kosmetyków: zaczynając od pasty do zębów, szamponów, żelów pod prysznic, dezodorantów, kończąc na perfumach czy wyrafinowanych środkach przeciwzmarszczkowych. Przemysł kosmetyczny wpływa znacząco na gospodarkę oraz na społeczeństwo. Poszukiwane są nowe rozwiązania, wdrażane nowe techniki produkcji, stosuje się ograniczenia odpadów oraz emisji niebezpiecznych substancji. Dodatkowo, promuje się higienę osobistą, poprawia ogólny stan zdrowia publicznego oraz świadomość społeczną, a także zwiększa się ilość miejsc pracy (Vecino i in. 2017). Niektóre badania wykazują, że wykorzystanie naturalnie występujących substancji w produkcji formułacji kosmetycznych ma takie same lub lepsze korzyści w porównaniu do produktów opierających się na substancjach syntetycznych (Corazza i in. 2009). Ogólnie występującym trendem konsumenckim w obecnych czasach, jest wykorzystywanie jak największej ilości składników i substancji pochodzenia naturalnego w kosmetykach. Substancje te mają podobne lub lepsze właściwości oraz dodatkowe korzyści w porównaniu z syntetykami. Tym samym biosurfaktanty mają ogromny potencjał dla tworzenia formułacji kosmetycznych, nie tylko ze względu na swoją wysoką biodegradowalność i nietoksyczność, ale również ze względu na swój prebiotyczny charakter (Vecino i in. 2017).

2. Opis zagadnienia

Jednym z największych problemów wykorzystania syntetycznych surfaktantów w kosmetykach jest możliwość wywoływania przez nie podrażnień skóry oraz odpowiedzi alergicznych. Syntetyczne surfaktanty mogą wiązać się z białkami, usuwać lipidy znajdujące się na powierzchni naskórka, przyczyniać się do dezorganizacji struktur ciekłokrystalicznych w lipidach międzykomórkowych i oddziaływać z żywymi komórkami skóry. Procesy te mogą prowadzić do

podrażnień, a także osłabiać funkcje ochronne naskórka (Bujak i in. 2015). Potencjalnie, problemy te może neutralizować wykorzystanie biosurfaktantów. Biosurfaktanty klasyfikowane są głównie na podstawie budowy i osiąganej przez nie masy molekularnej (Rodrigues 2015). W ten sposób, najprostszy podział biosurfaktantów obejmuje glikolipidy, lipoproteiny, lipopeptydy, fosfolipidy, kwasy tłuszczowe oraz biosurfaktanty polimerowe. Aby jednak biosurfaktanty były wykorzystywane jako substancje w przemyśle kosmetycznym do produkcji odpowiednich formułacji muszą podlegać tym samym zasadom i restrykcjom, co ich syntetyczne odpowiedniki (Vecino i in. 2017).

Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1223/2009 (Rozporządzenie WE nr 1223/2009) reguluje wykorzystanie surfaktantów jako produktów kosmetycznych, ale nie wspomina o biosurfaktantach. Związki te, jako będące powierzchniowo-czynnymi podlegają jednak pod te same regulacje co syntetyczne surfaktanty jeśli mają mieć zastosowanie w kosmetykach.

Obecnie, konsumenci chętniej sięgają po produkty kosmetyczne, których składniki są pochodzenia naturalnego. Tym samym, przemysł kosmetyczny dostosowuje się poniekąd do potrzeb swoich odbiorców, szukając bardziej zrównoważonych ekologicznie substancji jak i tych niezagrożających zdrowiu. W przypadku, gdy chce się uzyskać etykietę ekologicznego lub naturalnego, kosmetyk musi zawierać 95% lub 50% składników roślinnych i 10% lub 5% ze wszystkich składników wchodzących w formułację kosmetyczną musi pochodzić z rolnictwa ekologicznego (Vecino i in. 2017).

Aby substancje nadawały się do użycia w przemyśle kosmetycznym powinny posiadać odpowiednie parametry. Biosurfaktanty muszą wykazywać odpowiednie krytyczne stężenie micelizacji (CMC), równowagę hydrofilowo-lipofilową (HLB) oraz wydajność jonową, ponieważ to one zadecydują jaki typ biosurfaktantu zostanie użyty z konkretną formułacją kosmetyczną. Krytyczne stężenie micelizacji jest najniższym stężeniem biosurfaktantu, który powoduje największe obniżenie napięcia powierzchniowego wody. Tym samym, wykorzystuje się go do pomiaru skuteczności działania biosurfaktantu. Z kolei, wartość HLB pozwala przewidzieć zdolność biosurfaktantu do emulgacji. W zależności od wartości HLB, naturalne surfaktanty mogą zachowywać się jak emulgatory, środki zwilżające lub środki przeciwdziałające tworzeniu się pian. Biosurfaktanty o charakterze lipofilowym mają niskie wartości HLB, a biosurfaktanty hydrofilowe osiągają wysokie wartości HLB. Tym samym substancje o wysokiej rozpuszczalności w wodzie będą lepszymi stabilizatorami emulsji oleju w wodzie (O/W), natomiast te o wysokiej rozpuszczalności w oleju będą lepiej stabilizowały emulsje wody w oleju (W/O). Niskie wartości HLB odnoszą się do bardziej lipofilowych emulgatorów z dobrą zdolnością do stabilizowania emulsji W/O. Jednocześnie, wysokie wartości HLB biosurfaktantów sprawiają, że są bardziej hydrofilowe i lepiej stabilizują emulsje O/W. Jonowe zachowanie biosurfaktantów jest ważnym elementem ich aplikacji przemysłowej. Ze względu na ładunek polarny głowy, syntetyczne surfaktanty można podzielić na anionowe, kationowe, niejonowe lub amfoteryczne. Niewiele jednak wiadomo o jonowej naturze biosurfaktantów (Vecino i in. 2017). Rincón-Fontán i współpracownicy (Rincón-Fontán i in. 2016) zbadali adsorpcję lipopeptydowego biosurfaktantu uzyskanego z likieru kukurydzianego, wykazując, że substancja ta była amfoteryczna i można było zatrzymać ją na powierzchni zarówno kationowych jak i anionowych żywic. Później, biosurfaktant ten był dodany do włosów w stężeniu zbliżonym do CMC i absorbował się z wydajnością 3679 µg/g.

Glikolipidy są jednymi z najlepiej poznanych biosurfaktantów. Z chemicznego punktu widzenia są połączeniem długiego łańcucha kwasów alifatycznych lub hydroksyalifatycznych z węglowodorami. Większość znanych glikolipidów jest wytwarzanych przez bakterie, tylko niektóre produkowane są przez drożdże lub grzyby. Przykładowymi glikolipidami są soforolipidy, rhamnolipidy oraz lipidy mannosylerytrytolu.

Soforolipidy składają się z dwucukru – soforozy połączonej z grupą hydroksylową łańcucha kwasu tłuszczowego za pomocą wiązania glikozydowego. Głównym producentem tego biosurfaktantu są drożdże ze szczepu *Candida bombicola*. Soforolipidy zachowują się jak surfaktanty niejonowe, wykazując właściwości emulgujące i właściwości czyszczące (Varvaressou i Iakovou 2015). W związku z wykazywaniem właściwości antybakteryjnych, soforolipidy stają się składnikami formułacji pozwalających na leczenie trądziku, łupieżu czy nieprzyjemnego zapachu potu. Są obecne w szminkach, pomadkach i kremach do ust, cieniach do powiek oraz skompresowanych kosmetykach

w proszku. Co więcej, metabolizm fibroblastów skórnych i neosynteza kolagenu, a także hamowanie elastazy i wolnych rodników mogą być stymulowane przez soforolipidy. Sugeruje się użycie soforolipidów w leczeniu cellulitu, ponieważ zmniejszają podskórne przeciążenie lipidami poprzez stymulowanie syntezy leptyny w adipocytach (Lourith i Kanlayavattanukul 2009). Grupy hydroksylowe ugrupowania cukrowego estru soforolipidowego można również podstawiać grupami hydroksyloalkilowymi. Takie estry wykorzystuje się w kredkach do ust, kremach i cieniach do powiek. Kompleksy (koniugaty) aminokwasów i soforolipidów to nowe kationowe, zwitterjonowe lub anionowe formy tego biosurfaktantu wykazujące zwiększoną rozpuszczalność w wodzie. Mogą stać się źródłem ω -hydroksykwasów tłuszczowych. ω -hydroksykwasy tłuszczowe można laktonizować w makrocycliczne estry, które mogą znaleźć zastosowanie w przemyśle perfumeryjnym i zapachowym (Varvaresou i Iakovou 2015). Z użyciem soforolipidów i w połączeniu z anionowym środkiem powierzchniowo czynnym przygotowano również łagodne preparaty odpowiadające formułom żelu pod prysznic i szamponów. Formuła patentowa składała się z 1-20% (wag./wag.) soforolipidu; 1-20% chemicznego anionowego środka powierzchniowo czynnego; 0-2% dodatkowego elektrolitu; 0-10% dodatków dla detergentów i 40-98% wody (Vecino i in. 2017). Stworzono również produkt zawierający jeden mol soforolipidów i 12 moli glikolu propylowego, który jak się okazało, miał specyficzną zgodność ze skórą i znalazł komercyjne zastosowanie jako środek nawilżający (Yamane 1987).

Rhamnolipidy to glikolipidy posiadające w swojej budowie jedną lub dwie cząsteczki ramnozy, które łączą się z maksymalnie trzema grupami hydroksykwasów tłuszczowych posiadających od 8 do 14 atomów węgla. Rhamnolipidy produkowane są przez rodzaj *Pseudomonas* (głównie *Pseudomonas aeruginosa*), głównie jako mieszanina mono i di-rhamnolipidu (Vecino i in. 2017). Mają one działanie przeciwbakteryjne i wykorzystuje się je w formułach kosmetycznych takich jak dezodoranty, produkty do pielęgnacji paznokci i pasty do zębów (Muhammad i Mahsa 2014). Opatentowano również produkt kosmetyczny w postaci maści zawierający od 0,001% do 5% rhamnolipidów do leczenia oznak starzenia. Przewiduje się, jej stosowanie od 1 do 3 razy dziennie (Vecino i in. 2017). Opatentowano również szampon zawierający 2% rhamnolipidu rozpuszczonego w wodzie. Działanie przeciwbakteryjne tego biosurfaktantu pozwoliło na utrzymanie połysku włosów i odpowiedniej kondycji skóry głowy przez trzy dni (Bhattacharya i in. 2017).

Zaproponowano również produkty zawierające zarówno rhamnolipidy jak i soforolipidy z dodatkiem 10% oleju oleinowego w różnych typach formuł kosmetycznych: szamponie przeciwłupieżowym z odżywką, nawilżających środkach myjących, zwykłych środkach myjących i żelach pod prysznic (Vecino i in. 2017).

Zarówno rhamnolipidy jak i soforolipidy są komercjalizowane przez przedsiębiorstwa. W przypadku rhamnolipidów są to Urumqi Unite Bio-Technology Co., Ltd. (Chiny) oraz AGAE Technologies LLC (Corvallis, Oregon), a w przypadku soforolipidów, produkowane są one, m.in. przez Soliance (Francja) oraz MG Intobio Co Ltd (Korea Południowa) (Vecino i in. 2017). Kao Chemical Corporation używa soforolipidów jako środków utrzymujących wilgoć dla takich marek kosmetyków do makijażu jak Sofina (Banat i in. 2000).

Lipidy mannosylerytrytolu zawierają 4- lub 1-O- β -D-mannopiranozylo-mezo-erytrytol oraz dwa kwasy tłuszczowe. Wyróżnia się kilka typów mannosylerytrytolu w zależności od stopnia acylacji (Fukuoka i in. 2007). Substancje te są syntezowane przez drożdże ze szczepu *Pseudozyma*, zazwyczaj jako mieszanina trzech pochodnych: MEL-A, MEL-B i MEL-C, gdzie MEL-A stanowi główny składnik (70%) (Vecino i in. 2017). Mannosylerytrytole zostały zaproponowane jako produkty zapobiegające starzeniu się skóry. Dodatkowo, wykazały właściwości nawilżające wobec komórek ludzkiej skóry, porównywalnie do nawilżających właściwości naturalnych ceramidów (Yamamoto i in. 2012). Zbadano również działanie naprawcze tych biosurfaktantów na zniszczonych włosach za pomocą mikroskopu elektronowego i zaproponowano mannosylerytrytol nie tylko do poprawy kondycji włosów, ale również jako środek zapewniający ich gładkość i elastyczność (Morita i in. 2010). Zbadano je pod kątem wykorzystania jako substancje aktywne w produktach do pielęgnacji skóry, chroniących przed powstawaniem szorstkości (Vecino i in. 2017).

Do 2011 roku opatentowano ponad 200 patentów związanych z produkcją biosurfaktantów, gdzie ponad 50% dotyczyło rhamnolipidów, 35% soforolipidów, a 10% lipidów mannosylerytrytolu (Müller i in. 2012).

Lipopeptydy to cykliczne peptydy składające się z dziesięciu lub siedmiu aminokwasów, które związane są z β -hydroksykwasami. Tym samym, najbardziej zbadanym lipopeptydem jest surfaktyna. Wyróżniamy surfaktynę A (zawierającą L-leucynę), surfaktynę B (zawierającą L-walinę) oraz surfaktynę C (zawierającą L-izoleucynę), której odpowiedni aminokwas jest zaangażowany w tworzenie pierścienia laktonowego. Produkowane są one przez rodzaj *Bacillus*, głównie *Bacillus subtilis* (Vecino i in. 2017). Lipopeptydy zostały wykorzystane w patentach kosmetyków przeciwzmarszczkowych (Varvaressou i Iakovou 2015) i kosmetycznych produktach oczyszczających (Bockmühl 2012). Niektóre z lipopeptydów zostały wykorzystane w dostarczaniu hormonów, np. tych stymulujących a-melanocyty do zastosowania w kosmetykach wybielających (Ogawa i in. 1999) i produktach anty-cellulitowych.

Das i współpracownicy (Das i in. 2013) badali również biosurfaktanty syntetyzowane przez bakterie *Nocardiopsis* (konkretnie *Nocardiopsis VITSISB*), które wytwarzają substancje przeciwbakteryjne, w tym tiopeptydy. Biosurfaktanty te proponowane są jako alternatywa dla SDS (laurylosiarczanu sodu) w pastach do zębów, ze względu na ich lepsze działanie i mniejszą toksyczność.

Wprowadzono również formułacje kosmetyczne zawierające biosurfaktanty jako co-surfaktanty. Taka formułacja składała się z sulfobursztynianów i/lub biosurfaktantów od 0,1 do 30% (wag/wag). Ponadto zbadano zastosowania biosurfaktantów jako środków zagęszczających w porównaniu z karbomerem, który jest dobrze znanym i typowym zagęszczaczem stosowanym [w formułacjach kosmetycznych (Vecino i in. 2017).

Co raz częściej w kontekście kosmetyków szuka się też działania prebiotycznego. Oznacza to, że mają być to produkty pozwalające na odbudowę i ponowne wyrównanie mikroflory skóry. Właściwości antyadhezyjne, antygrzybicze oraz antywirusowe, a dodatkowo też antibakteryjne sprawiają, że biosurfaktanty stają się idealnymi kandydatami. Szczególnie mowa tutaj o biosurfaktantach syntetyzowanych przez bakterie kwasu mlekowego ze szczepu *Lactobacillus*, np. *L. pentosus*, *L. paracasei*, *L. brevis*, *L. rhamnosus* itd. i są one uznawane za mikroorganizmy GRAS (ogólnie uznawane za bezpieczne). Tym samym mogą być potencjalnie wykorzystane jako prebiotyki w formułacjach kosmetycznych. Biorąc pod uwagę zakres Rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1223/2009 (Rozporządzenie WE nr 1223/2009) substancje takie jak biosurfaktanty, posiadające właściwości przeciwdrobnoustrojowe, można włączać do preparatów kosmetycznych, o ile są one zgodne z przepisami rozporządzenia, a w szczególności, gdy funkcje biocydów są drugorzędne do funkcji kosmetycznych. Jednakże, te konkretne właściwości przeciwbakteryjne nie mogą być reklamowane w produkcie (Vecino i in. 2017).

Pomimo dużego potencjału i zainteresowania handlowego, problemem produkcji biosurfaktantów na skalę przemysłową jest koszt produkcji. Z tego powodu wiele obecnych badań koncentruje się na wykorzystywaniu odpadów rolno-przemysłowych jako substratów by produkcja biosurfaktantów stała się konkurencyjną produkcją biotechnologiczną w porównaniu do syntezy chemicznej ich syntetycznych odpowiedników (Vecino i in 2017).

3. Podsumowanie

Surfaktanty produkowane przez bakterie, grzyby i drożdże mogą być i są stosowane w formułacjach kosmetycznych. Zastępują one surfaktanty syntetyczne i substancje chemiczne w celu uzyskania produktów ekologicznych oraz bardziej przyjaznych środowisku. Ze względu na swoje antibakteryjne właściwości mogą również pełnić rolę substancji prebiotycznych pozwalających na chronienie odpowiedniej mikroflory bakteryjnej skóry (Vecino i in. 2017), a także stały się alternatywą

w przemyśle farmaceutycznym ze względu na swoje właściwości anty-adhezyjne. Wiele badań prowadzi się teraz by zoptymalizować produkcję naturalnych surfaktantów, szczególnie z użyciem bio-źródeł, np. olejów roślinnych. Biosurfaktanty glikolipidowe są najbardziej obiecujące z względu na uzyskiwanie dużych ilości tych substancji właśnie z wykorzystaniem źródeł odnawialnych.

Inżynieria genetyczna pozwoliłaby nawet na poprawianie właściwości tych biosurfaktantów (Varvaresou i Iakovou 2015). Niestety, potrzeba bardzo dokładnych i głębokich badań nad fizykochemią biosurfaktantów oraz szerszych badań nad przenikaniem tych substancji przez skórę i interakcjami z komórkami człowieka.

4. Literatura

- Banat M, Makkar RS, Cameotra SS (2000) Potential commercial applications of microbial surfactants, *Applied Microbiology and Biotechnology* 53: 495-508.
- Bhattacharya B, Ghosh TK, Das N (2017) Application of Bio-Surfactants in Cosmetics and Pharmaceutical Industry. *Scholars Academic Journal of Pharmacy (SAJP)* 6 (7): 320-329.
- Bockmühl D (2012) Biosurfactants as antimicrobial ingredients for cleaning products and cosmetics. *Tenside Surfactants Detergents* 49, 196-198.
- Bujak T, Wasilewski T, Nizioł-Łukaszewska Z (2015) Role of macromolecules in the safety of use of body wash cosmetics. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 135: 497-503.
- Corazza M, Borghi A, Lauriola MM i in. (2009) Use of topical herbal remedies and cosmetics: a questionnaire-based investigation in dermatology out-patients. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venerology* 23 (11): 1298-303.
- Fukuoka T, Morita T, Konishi M i in. (2007) Characterization of New Types of Mannosylerythritol Lipids as Biosurfactants Produced From Soybean Oil by a Basidiomycetous Yeast, *Pseudozyma Shanxiensis*. *Journal of Oleo Science* 56: 435-442.
- Lourith N, Kanlayavattanukul M (2009) Natural surfactants used in cosmetics: glycolipids. *International Journal of Cosmetic Science* 31: 255-261.
- Morita T, Kitagawa M, Yamamoto S i in. (2010) Glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, repair the damage hair. *Journal of Oleo Science* 59: 267-272.
- Muhammad IM, Masha SS (2014) Rhamnolipids: well-characterized glycolipids with potential broad applicability as biosurfactants. *Industrial Biotechnology* 10: 285-291.
- Müller MM, Kügler JH, Henkel M i in. (2012) Rhamnolipids – next generation surfactants? *Journal of Biotechnology* 162: 366-380.
- Ogawa Y, Kawahara H, Yagi N i in. (1999) Synthesis of a novel lipopeptide with a-melanocyte-stimulating hormone peptide ligand and its effect on liposome stability. *Lipids* 34: 387-394.
- Rincón-Fontán M, Rodríguez-López L, Vecino X i in. (2016) Adsorption of natural surface active compounds obtained from corn on human hair. *RSC Advances* 6, 6: 63064-63070
- Rodrigues LR (2015) Microbial surfactants: fundamentals and applicability in the formulation of nano-sized drug delivery vectors. *Journal of Colloid and Interface Science* 449: 304-316.
- Rozporządzenie WE nr 1223/2009 z dnia 30 listopada 2009 r. dotyczące produktów kosmetycznych, *Dziennik Urzędowy Unii Europejskiej* [dostęp 21.05.2020]
- Varvaresou A, Iakovou K (2015) Biosurfactants in cosmetics and biopharmaceuticals. *Letters in Applied Microbiology* 64: 214-223.
- Vecino X, Cruz JM, Moldes AB i in. (2017) Biosurfactants in cosmetic formulations: trends and challenges, *Critical Reviews in Biotechnology* 37 (7): 911-923.
- Yamamoto S, Morita T, Fukuoka T i in. (2012) The moisturizing effects of glycolipid biosurfactants mannosylerythritol lipids, on human skin. *Journal of Oleo Science* 61, 407-412.
- Yamane T (1987) Enzyme technology for the lipid industry. An engineering overview. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 64: 1657-1662.

19. Systemy CRISPR-Cas w obronie przed wirusami

CRISPR-Cas systems – defense against viruses

Paulina Smaruj

Zakład Genetyki Bakterii, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski
Opiekun naukowy: prof. dr hab. Dariusz Bartosik

Paulina Smaruj: p.smaruj@student.uw.edu.pl

Słowa kluczowe: wirusy, bakteriofagi, systemy CRISPR-Cas, odpowiedź adaptacyjna, kaspozony

Streszczenie

Wirusy należą do najliczniejszych i najbardziej powszechnych cząstek biologicznych biosfery. Wpływ jaki wywierają na poszczególne grupy swoich gospodarzy oraz globalne procesy ekologiczne i geochemiczne jest nie do przecenienia. W obliczu ataku cząstek wirusowych, liczne organizmy wykształciły specyficzne mechanizmy obronne. W przypadku bakterii i archeonów poznano m.in. systemy CRISPR-Cas, które determinują odpowiedź tych mikroorganizmów o charakterze adaptacyjnym. Mechanizm ich działania polega na specyficznym rozpoznaniu obcego materiału genetycznego przez crRNA, który wraz z białkami Cas tworzy rybonukleoproteinowe kompleksy o aktywności nukleolitycznej. W efekcie dochodzi do przecięcia DNA genomu wirusa wprowadzonego do komórki podczas infekcji. Chociaż systemy CRISPR-Cas działają według podobnego schematu, widoczne się między nimi istotne różnice, szczególnie na etapie procesowania prekursora crRNA (pre-crRNA). Zarówno klasyfikacja tych systemów, jak i relacje filogenetyczne pomiędzy poszczególnymi ich typami są niejednoznaczne, i nadal pozostawiają wiele pytań bez odpowiedzi.

1. Wstęp

Bakteriofagi (w skrócie fagi, od greckiego *phagein* – pożerać) to wirusy atakujące komórki bakteryjne. Na każdą pojedynczą bakterię w biosferze przypada 10 cząstek fagowych zdolnych do jej zainfekowania (Stern 2011). Stanowią one najliczniejszą i najbardziej zróżnicowaną grupę poznanych dotąd cząstek biologicznych (Bergh i in. 1989). Ze względu na liczebność i rozpowszechnienie bakteriofagów, wywierana przez nie presja selekcyjna musi mieć znaczący wpływ na skład populacji bakteryjnych zasiedlających każde środowisko naszej planety. Co więcej, wirusy są uważane za główny czynnik o wymiarze nie tylko ekologicznym, ale także geochemicznym. Doprowadzając do lizy komórek bakterii zasiedlających środowiska morskie zapewniają dostępność materii organicznej dla licznych organizmów heterotroficznych oraz wprowadzają do obiegu w biosferze wiele pierwiastków. Opadające na dno morza pozostałości po komórkach bakteryjnych i szkieletach organizmów planktonicznych (np. okrzemek) tworzą osad, który następnie ulega powolnym procesom geologicznym (Suttle 2007).

W obliczu ciągłej presji selekcyjnej ze strony cząstek wirusowych, organizmy wykształciły wiele mechanizmów ograniczających częstość infekcji. Większość (a być może wszyscy) przedstawicieli świata żywego stosuje przynajmniej jedną z trzech strategii antywirusowych, tj.: (a) odporność wrodzoną, (b) odporność nabytą oraz (c) programowaną śmierć komórek (Koonin i in. 2013). Przez wiele dekad uważano, że tylko wyższe kręgowce wykształciły mechanizmy odporności adaptacyjnej, a obrona poprzez programowaną śmierć zdecydowanie nie była rozpatrywana wśród organizmów jednokomórkowych. Z kolei pierwotna wrodzona odpowiedź na atak cząstek wirusowych była względnie powszechnie identyfikowana wśród komórek prokariotycznych – zalicza się do tej kategorii systemy restrykcji modyfikacji (ang. *restriction-modification systems*) oraz zmiany w składzie aminokwasowym receptorów rozpoznawanych przez fagi (ang. *receptor switching*) (Stern 2011). Poznanie sposobu działania systemów toksyna-antytoksyna (ang. *toxin-antitoxin systems*, TA), które mogą doprowadzić do śmierci komórki niezależnej od bodźców zewnętrznych, oraz systemów CRISPR-Cas doprowadziły do zmiany koncepcji postrzegania obrony przeciwwirusowej (Blower i in. 2011; Westra i in. 2012). Wydaje się, że wszystkie trzy strategie zapobiegania zamknięciu cyklu

replikacyjnego są kluczowe dla przetrwania wszystkich form życia i pojawiły się na wczesnych etapach ewolucji (Koonin i in. 2013).

Geny biorące udział w obronie przed wirusami mogą stanowić nawet do 10% genomów prokariotycznych (Makarova i in. 2013). Wiele z nich wykazuje znaczącą mobilność i mogą być traktowane jako samolubne elementy genetyczne. Systemy toksyna-antytoksyna, kodowane zazwyczaj w małych zwartych operonach, ulegają częstemu transferowi i mogą uzależnić komórkę od własnej obecności (jest to jeden z mechanizmów stabilnego utrzymywania plazmidów w komórce bakteryjnej, białko toksyny zabija komórkę, w której nie dochodzi do ekspresji genu antytoksyny) (Kobayashi 2001). Jednak, alternatywnie do mechanizmu charakterystycznego dla kręgowców, prokariotyczny system odpowiedzi adaptacyjnej okazał się opierać na rozpoznawaniu obcych dla gospodarza kwasów nukleinowych.

Bakterie i archeony nabywają odporność w wyniku integracji do chromosomu krótkich fragmentów genomów wirusowych lub plazmidów. Zostają one dodane na końcu regionu o specyficznej repetytywnej budowie, określanego skrótem CRISPR (ang. *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*, czyli w dosłownym tłumaczeniu: zgrupowane regularnie rozdzielone krótkie palindromiczne sekwencje powtórzone). Pierwsze doniesienia o ich istnieniu pochodzą z lat 80. (charakterystyczna regularność sekwencji została po raz pierwszy opisana w genomie *Escherichia coli* w 1987 (Ishino i in. 1987)).

Działanie systemów CRISPR-Cas można podzielić na 3 etapy: (a) adaptacja – insercja fragmentów DNA obcego pochodzenia jako sekwencji rozdzielających w *loci* CRISPR (reakcja jest przeprowadzana przez dwa konserwowane białka – Cas1 i Cas2), (b) ekspresja – *locus* CRISPR ulega transkrypcji do pre-crRNA (pre-CRISPR RNA), który ulega dalszemu procesowaniu przez białka Cas do krótkich RNA nakierowujących na specyficzny cel (ang. *crRNAs*), oraz (c) interferencja, czyli degradacji kwasów nukleinowego obcego pochodzenia (komplementarnych do *crRNA*) przez enzymatyczną maszynę białek Cas (Datsenko i in. 2012).

2. Elementy systemów CRISPR-Cas

2.1 Sekwencje CRISPR

CRISPR stanowią dość zróżnicowaną grupę sekwencji repetytywnych. Każde locus składa się z serii krótkich powtórzeń (zazwyczaj o długości 20-50 pz) rozdzielonych przez unikatowe sekwencje (ang. *spacers*). Powtórzenia sekwencji są wysoce konserwowane w obrębie jednego locus CRISPR, jednak mogą znacznie się różnić zarówno sekwencją, jak i długością pomiędzy różnymi loci. Część powtórzeń ma strukturę palindromu, dzięki czemu może tworzyć stabilne struktury II-rzędu na poziomie RNA (Kunin i in. 2007). Dostępność i powszechność stosowania wysokoprzepustowych technik sekwencjonowania zainicjowały analizy mające na celu identyfikację loci CRISPR w genomach prokariotycznych. Powstały narzędzia bioinformatyczne dedykowane wykrywaniu sekwencji o charakterze repetytywnym. Na przykład CRISPRdb (<https://crispr.i2bc.paris-saclay.fr>) oraz CRISPI (<https://crispi.genouest.org>) dają możliwość identyfikacji, adnotacji i zdeponowania sekwencji wykrytych loci CRISPR, a także genów białek towarzyszących CRISPR (białka Cas, ang. CRISPR-associated proteins).

Nierzadko w jednym genomie identyfikuje się więcej niż jedno locus CRISPR – w *Mathanocaldococcus* sp. FS406-22 znaleziono ich aż 18 (!). Szacuje się, że loci te występują u około 90% archeonów oraz około 50% przedstawicieli bakterii (Sorek i in. 2013).

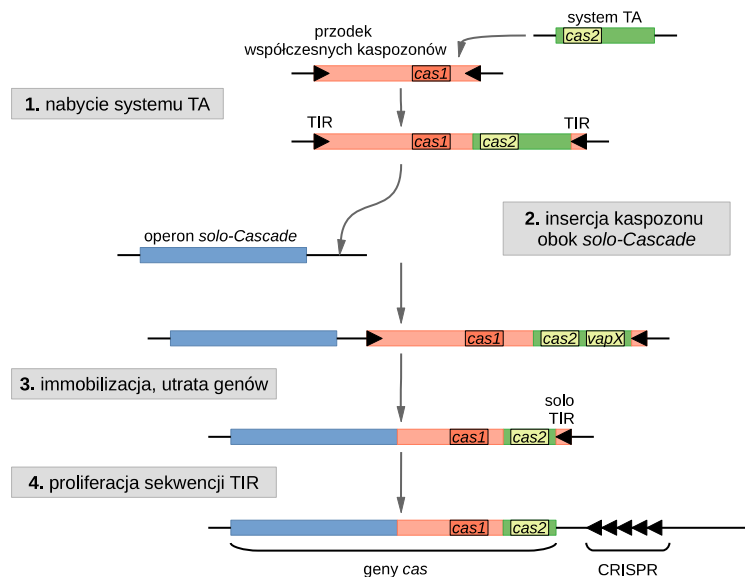
2.2 Białka Cas

Analizy porównawcze wykazały istnienie zróżnicowanych kaset grupujących geny *cas*, które zazwyczaj są zlokalizowane w pobliżu *locus* CRISPR. Dzięki analizie dużej liczby dostępnych sekwencji genomowych wyróżniono ponad 40 rodzin genów *cas* (Haft i in. 2005). Sześć z nich (*cas1-cas6*) jest wysoce konserwowanych, chociaż tylko geny *cas1* i *cas2* są uniwersalnymi składnikami wszystkich genomów zawierających macierze CRISPR (Carter i in. 2015). Produkty tych dwóch genów tworzą kompleks enzymatyczny, w którym tylko komponent Cas1 wykazuje aktywność enzymatyczną. Białko to jest endonukleazą (integrazą) zaangażowaną zarówno w cięcie DNA, którego fragment stanie się sekwencją rozdzielającą (ang. *protospacer*), jak i macierze CRISPR.

Następnie przeprowadza ono reakcję integracji (Nuñez i in. 2014). Mechanizm cięcia i łączenia nici DNA przez białko Cas1 przypomina aktywność enzymatyczną integrasz i transpozaz kodowanych w obrębie ruchomych elementów genetycznych, zapewniających ich mobilność. Jednak, nie wykazuje ono podobieństwa sekwencji do żadnej z powszechnie znanych rodzin rekombinaz (Wiedenheft i in. 2009).

Zidentyfikowano jednak elementy przypominające transpozony, które zawierają konserwowany gen *cas1* i wydają się wykorzystywać aktywność kodowanego przez nie białka do integracji i wycinania z genomu gospodarza. Kaspozony, jak nazwano te elementy, zostały wykryte zarówno w genomach bakterii jak i archeonów (Krupovic i in. 2014). Podejrzewa się, że odegrały one niemałą rolę w ewolucji systemów CRISPR-Cas – określa się je jako „przodków” modułu adaptacyjnego (Rys. 1). Według proponowanego scenariusza, prokariotyczny system odpowiedzi adaptacyjnej powstał na skutek integracji kaspozonu w pobliże operonu *solo-Cascade* (Koonin i in. 2015).

Białko Cas2, nie wykazujące aktywności endonukleolitycznej, prawdopodobnie pełni funkcję szkieletu kompleksu. Co intrygujące, Cas2 wykazuje homologię do białka VapD – prokariotycznej toksyny – nukleazy, która specyficznym przecina związane z rybosomami mRNA, co może skutkować śmiercią komórki (Makarova i in. 2012). Wydaje się, że białko Cas2 pochodzi od toksyny, będącej elementem systemu toksyna-antytoksyna. Gen *cas2* mógł już być obecny w strukturze kaspozonu, który dał początek modułowi adaptacyjnemu przyszłego CRISPR-Cas (Koonin i in. 2015).



Rys. 1. Proponowany scenariusz powstania systemów CRISPR-Cas z trzech niezależnych fragmentów: (a) ruchomego elementu genetycznego, będącego przodkiem współczesnych kaspozonów, (b) systemu toksyna-antytoksyna (TA), oraz (c) pierwotnego systemu odporności – *solo-Cascade* (ang. *CRISPR-associated complex for antiviral defence*). Ostatni element kodował wiele małych białek Cas o aktywności rybonukleolitycznej. TIR (ang. *terminal inverted repeats*) są krótkimi odwróconymi sekwencjami flankującymi elementy transpozycyjne. Zostały zidentyfikowane także na końcach kaspozonów (Krupovic i in. 2014). Na podstawie (Koonin i in. 2015), zmodyfikowane.

3. Mechanizm działania systemów CRISPR-Cas

W mechanizmie działania systemów CRISPR-Cas wyróżnia się trzy zasadnicze etapy: (a) adaptację, (b) ekspresję, czyli biogenezę crRNA, oraz (c) interferencję.

3.1 Adaptacja

W 2005 zaobserwowano *in vivo* zjawisko wprowadzania nowych sekwencji do *locus* CRISPR. Sekwencja rozdzielająca pochodzenia fagowego została dodana do zestawu fragmentów obcego DNA (Rys. 2). Towarzyszyło temu powielenie powtórzenia (ang. *repeat*) w pobliżu sekwencji liderowej na jednym z końców *locus* (ang. *leader end*) (Pourcel i in. 2005). Po przeprowadzeniu dogłębnych analiz poznanych wcześniej macierzy CRISPR, zjawisko integracji fragmentów obcego DNA (ang. *spacers*) okazało się być wyjątkowo powszechne wśród organizmów prokariotycznych. Jeszcze w 2005 roku zasugerowano, że regularnie zbudowane *loci* są komponentami mechanizmów o aktywności antywirusowej (Mojica i in. 2005). Fragmenty obcego DNA wyselekcjonowane do integracji są określane jako (ang.) *protospacers*. Często flankują je krótkie motywy nazywane PAM (ang. *protospacer-adjacent motifs*) (Barrangou i in. 2007). Co ciekawe, sekwencja i lokalizacja PAM zależy do typu systemu CRISPR-Cas (Mojica i in. 2009).

Kluczową rolę na tym etapie odgrywają białka Cas1 i Cas2 (Rys. 2). Zaobserwowano, że mutacje w obu genach uniemożliwiają integrację nowych sekwencji rozdzielających (Carter i in. 2015). Mechanizm rozpoznania odpowiedniego końca *locus* CRISPR (ang. *leader-end recognition*) nie został wyjaśniony. Mutacje wprowadzone w sekwencji liderowej, które uniemożliwiają skuteczne zachodzenie transkrypcji, nie zakłócają procesu integracji. Z kolei, mutacje w obrębie pierwszych 60 nt doprowadzają do zaniku tego zjawiska. Wydaje się więc, że sam proces transkrypcji nie jest konieczny do nabycia nowej sekwencji powtórzonej (Sorek i in. 2013). Sposób, w jaki region powtórzony ulega powieleniu również nie został w pełni wyjaśniony.

3.2 Ekspresja

W kolejnym etapie dochodzi do transkrypcji *locus* CRISPR wraz z wszystkimi sekwencjami powtórzonymi i rozdzielającymi (Rys. 2). Powstały produkt ulega „dojrzwaniu”, co prowadzi do powstania crRNA (CRISPR RNA), tj. krótkich fragmentów RNA wykazujących komplementarność względem materiału genetycznego pochodzenia fagowego lub plazmidowego (Brouns i in. 2008). Sam mechanizm dojrzewania transkryptu znacznie różni się między poszczególnymi typami systemów. Mogą być w to zaangażowane zarówno kompleksy endorybonukleolityczne, jak i pojedyncze białka – np. Cas6. Przykładem pierwszej strategii jest kompleks *Cascade* (ang. *CRISPR-associated complex for antiviral defence*) zidentyfikowany w *E. coli* (Czarnek i in. 2016; Brouns i in. 2008).

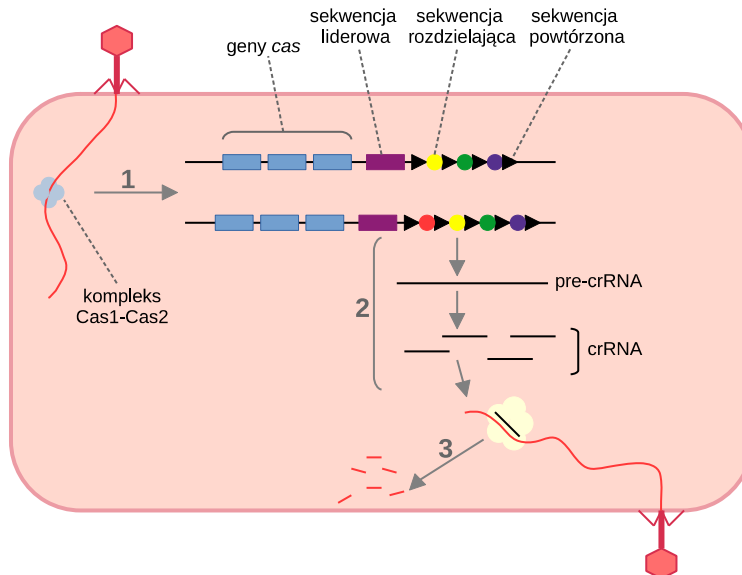
3.3 Interferencja

Ostatni etap skutkuje degradacją obcego materiału genetycznego. Wszystkie crRNA wraz z białkami Cas tworzą duże rybonukleoproteinowe kompleksy, które rozpoznają komplementarne sekwencje (Sorek i in. 2013) (Rys. 2). Krótkie motywy PAM, konieczne na etapie adaptacji, okazały się również istotne w efektywnym wiązaniu kompleksu do kwasu nukleinowego. Za rozpoznanie wspomnianych sekwencji prawdopodobnie odpowiedzialny jest komponent białkowy, ponieważ w crRNA nie występują sekwencje komplementarne do motywów PAM (Semenova i in. 2011; Czarnek i in. 2016). Nukleazy Cas powodują nacięcie DNA obcego pochodzenia w obrębie regionu komplementarnego do sekwencji crRNA (Garneau i in. 2010).

4. Klasyfikacja

Trzy etapy odpowiedzi przeciwwirusowej są prawdopodobnie wspólne dla wszystkich systemów CRISPR-Cas, jednak ich przebieg może wykazywać pewne różnice, w zależności o typu systemu. Klasyfikacja systemów prokariotycznej odpowiedzi adaptacyjnej jest dość złożona i niejednoznaczna. Nie istnieje uniwersalne białko Cas, które mogłoby być wykorzystane jako marker filogenetyczny. Poszczególne typy systemów CRISPR-Cas składają się z kilku modułów, których ewolucja zachodziła częściowo niezależnie. Dlatego też badania porównawcze nawet najbardziej konserwatywnego białka – Cas1 – nie dają pożądanych odpowiedzi na temat relacji filogenetycznych i klasyfikacji systemów CRISPR-Cas.

Tymczasem, aktualna klasyfikacja opiera się na wielu kryteriach, m.in. architekturze operonów *cas*, genetycznej organizacji *loci* CRISPR i analizach filogenetycznych konserwowanych białek Cas (Koonin i in. 2019). Dla przykładu, geny *cas1* i *cas2* są wspólne dla wszystkich systemów, z kolei geny *cas3*, *cas9* i *cas10* decydują o zaklasyfikowaniu do poszczególnych typów (Czarnek i in. 2016).



Rys. 2. Uproszczony schemat obrazujący mechanizm przeciwwirusowego działania systemów CRISPR-Cas. Na etapie (1) adaptacji dochodzi o wintegrowania fragmentu DNA pochodzenia fagowego (ang. *protospacer*) w macierz CRISPR. Transkrypt powstały na jej matrycy (etap 2 – ekspresja) ulega procesowaniu do krótszych crRNA (CRISPR RNA), które po połączeniu z białkami Cas w duże kompleksy o aktywności nukleolitycznej rozpoznają i degradują komplementarne kwasy nukleinowe obcego pochodzenia (3). Na podstawie (Koonin i in. 2015; Sorek i in. 2013), zmodyfikowane.

5. Podsumowanie

Genomy wirusów, szczególnie bakteriofagów, stanowią najbardziej zróżnicowaną pulę genetyczną w biosferze naszej planety (Sorek i in. 2013). Przeważającej większości genów zidentyfikowanych w analizach metagenomicznych wiriomeów nie została przypisana żadna funkcja. Kodowane przez nie białka nie wykazują podobieństwa sekwencji aminokwasowych do białek zdeponowanych w dostępnych bazach danych. Tajemnicze otwarte ramki odczytu znajdowane w genomach wirusów określa się często jako metagenomiczną „ciemną materię” (Kristensen i in. 2010). Tak duże zróżnicowanie genetyczne wirusów można interpretować jako skutek presji selekcyjnej wywieranej przez mechanizmy obronne organizmów komórkowych (Sorek i in. 2013).

Systemy CRISPR-Cas w pełni spełniają definicję odpowiedzi adaptacyjnej. Mechanizm ich działania opiera się na integracji krótkiego fragmentu DNA pochodzenia fagowego (lub plazmidowego) do macierzy CRISPR, która pełni funkcję analogiczną do ssaczych limfocytów pamięci. Na etapie interferencji obcy materiał genetyczny jest specyficznym rozpoznawany, co przypomina z kolei wiązanie antygenów przez swoiste receptory BCR i TCR (ang. *B-cell receptor*, *T-cell receptor*). Następnie dochodzi do nukleolitycznego cięcia przez kompleksy rybonukleoproteinowe, w skład których wchodzi crRNA oraz liczne białka Cas. Specyficzną eliminację obcych cząstek infekcyjnych można porównać do aktywności cytotoksycznej zależnej od przeciwciał (ang. *antibody-dependent cell cytotoxicity*, ADCC) i fagocytozy antygenów opłaszczonych przez immunoglobuliny.

Ewolucja prokariotycznych mechanizmów antywirusowych o poziomie złożoności porównywalnym z odpowiedzią nabytą ssaków nie została dokładnie wyjaśniona. Wydaje się, że systemy CRISPR-Cas są produktem wielu następujących po sobie zdarzeń ewolucyjnych, których dokładne odtworzenie może być nierealne. Poszczególne moduły podlegały częściowo niezależnej ewolucji, a ich pochodzenie może się różnić pomiędzy poszczególnymi typami systemów CRISPR-Cas, co znacznie komplikuje prowadzenie analiz. Ponadto, badania filogenetyczne genów *cas* sugerują, że systemy CRISPR-Cas wykazują silną tendencję do podlegania horyzontalnemu transferowi genów (ang. *horizontal gene transfer*, HGT) (Haft i in. 2005). W genomach prokariotycznych względnie często identyfikuje się ślady wymiany informacji genetycznej na skutek wielkoskalowych zdarzeń rekombinacyjnych. Powszechność wymiany materiału genetycznego pomiędzy bakteriami i archeonami zasiedlającymi wspólną niszę ekologiczną mogła doprowadzić do transferu macierzy CRISPR i powstania populacyjnej odporności adaptacyjnej (Sorek i in. 2013).

Pomimo wielu lat badań nad systemami CRISPR-Cas, wiele kwestii nadal pozostaje owianych tajemnicą. Wciąż nie rozumiemy, jakie warunki musi spełniać fragment DNA, żeby uległ integracji do macierzy. Nie wiemy także, w jaki sposób kompleksy rybonukleoproteinowe odnajdują komplementarne sekwencje w molekularnie zatłoczonym środowisku wewnątrzkomórkowym, ani w jaki sposób wirusy unikają prokariotycznej odpowiedzi immunologicznej. Nie ulega jednak wątpliwości, że odkrycie systemów CRISPR-Cas zmieniło koncepcję koewolucji cząstek wirusowych i ich gospodarzy, pozwoliło spojrzeć na obronę antywirusową w sposób holistyczny, pozbawiony sztucznego podziału na zaopatrzone w odpowiedź nabytą kręgowce i pozostałą, bardziej prymitywną część biosfery.

6. Literatura

- Barrangou R et al. (2007) CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes. *Science* 315 (5819): 1709-1712.
- Bergh Ø et al. (1989) High Abundance of Viruses Found in Aquatic Environments. *Nature* 340(6233): 467-68.
- Blower TR, Salmond GP, Luisi BF (2011) Balancing at Survival's Edge: The Structure and Adaptive Benefits of Prokaryotic Toxin–Antitoxin Partners. *Current Opinion in Structural Biology* 21(1): 109-118.
- Carter J, Wiedenheft B (2015) SnapShot: CRISPR-RNA-Guided Adaptive Immune Systems. *Cell* 163(1): 260.
- Czarnek M, Bereta J (2016) The CRISPR-Cas System – from Bacterial Immunity to Genome Engineering. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* 70: 901-916.
- Datsenko KA et al. (2012) Molecular Memory of Prior Infections Activates the CRISPR/Cas Adaptive Bacterial Immunity System. *Nature Communications* 3(1): 945.
- Garneau JE et al. (2010) The CRISPR/Cas Bacterial Immune System Cleaves Bacteriophage and Plasmid DNA. *Nature* 468(7320): 67–71.
- Haft DH et al. (2005) A Guild of 45 CRISPR-Associated (Cas) Protein Families and Multiple CRISPR/Cas Subtypes Exist in Prokaryotic Genomes. *PLoS Computational Biology* 1(6):e60.
- Ishino Y et al. (1987) Nucleotide Sequence of the *iap* Gene, Responsible for Alkaline Phosphatase Isozyme Conversion in *Escherichia Coli*, and Identification of the Gene Product. *Journal of Bacteriology* 169(12): 5429-5433.
- Kobayashi I (2001) Behavior of Restriction-Modification Systems as Selfish Mobile Elements and Their Impact on Genome Evolution. *Nucleic Acids Research* 29(18): 3742-3756.
- Koonin E, Dolja V (2013) A Virocentric Perspective on the Evolution of Life. *Current Opinion in Virology* 3(5): 546-557.
- Koonin E, Krupovic M (2015) Evolution of Adaptive Immunity from Transposable Elements Combined with Innate Immune Systems. *Nature Reviews Genetics* 16(3): 184-192.
- Koonin E, Markova KS (2019) Origins and Evolution of CRISPR-Cas Systems. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 374(1772): 20180087.

- Kristensen DM et al. (2010) New Dimensions of the Virus World Discovered through Metagenomics. *Trends in Microbiology* 18(1): 11-19.
- Krupovic M et al. (2014) Casposons: A New Superfamily of Self-Synthesizing DNA Transposons at the Origin of Prokaryotic CRISPR-Cas Immunity. *BMC Biology* 12: 36.
- Kunin V, Sorek R, Hugenholtz P (2007) Evolutionary Conservation of Sequence and Secondary Structures in CRISPR Repeats. *Genome Biology* 8(4): 61.
- Makarova KS et al. (2011) Evolution and Classification of the CRISPR-Cas Systems. *Nature Reviews. Microbiology* 9(6): 467-477.
- Markova KS et al. (2012) Live Virus-Free or Die: Coupling of Antivirus Immunity and Programmed Suicide or Dormancy in Prokaryotes. *Biology Direct* 7: 40.
- Markova KS, Wolf YI, Koonin E (2013) Comparative Genomics of Defense Systems in Archaea and Bacteria. *Nucleic Acids Research* 41(8): 4360-4377.
- Mojica FJ et al. (2005) Intervening Sequences of Regularly Spaced Prokaryotic Repeats Derive from Foreign Genetic Elements. *Journal of Molecular Evolution* 60(2): 174-182.
- Mojica FJ et al. (2009) Short Motif Sequences Determine the Targets of the Prokaryotic CRISPR Defence System. *Microbiology* 155(3): 733-740.
- Núñez J et al. (2014) Cas1–Cas2 Complex Formation Mediates Spacer Acquisition during CRISPR–Cas Adaptive Immunity. *Nature Structural & Molecular Biology* 21(6): 528-534.
- Pourcel C, Salvignol G, Vergnaud G (2005) CRISPR Elements in *Yersinia Pestis* Acquire New Repeats by Preferential Uptake of Bacteriophage DNA, and Provide Additional Tools for Evolutionary Studies. *Microbiology* 151(3): 653-663.
- Semenova E et al. (2011) Interference by Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat (CRISPR) RNA Is Governed by a Seed Sequence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(25): 10098-10103.
- Stern A, Sorek R (2011) The Phage-Host Arms Race: Shaping the Evolution of Microbes. *BioEssays : News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* 33(1): 43-51.
- Suttle CA (2007) Marine Viruses — Major Players in the Global Ecosystem. *Nature Reviews Microbiology* 5(10): 801-812.
- Westra ER et al. (2012) The CRISPRs, They Are A-Changin’: How Prokaryotes Generate Adaptive Immunity. *Review of Genetics* 46(1): 311-339.
- Wiedenheft B et al. (2009) Structural Basis for DNase Activity of a Conserved Protein Implicated in CRISPR-Mediated Genome Defense. *Structure* 17(6): 904-912.

20. Przegląd zintegrowanych z genomem ruchomych elementów genetycznych

A brief review of integrated Mobile Genetic Elements

Paulina Smaruj

Zakład Genetyki Bakterii, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski

Opiekun naukowy: prof. dr hab. Dariusz Bartosik

Paulina Smaruj: p.smaruj@student.uw.edu.pl

Słowa kluczowe: ruchome elementy genetyczne, horyzontalny transfer genów, elementy transpozycyjne, introny, inteiny, prowirusy

Streszczenie

Genomy większości bakterii, archeonów i eukariotów zawierają różnorodne zintegrowane ruchome elementy genetyczne (ang. *mobile genetic elements*, MGE), do których zalicza się m.in.: elementy transpozycyjne, introny, inteiny i prowirusy. Realizacja wielu projektów badawczych, zakładających wielkoskalowe sekwencjonowanie genomowego DNA, dostarcza coraz więcej danych na temat rozpowszechnienia MGE. Elementy te mogą prowadzić do rozległych rearanżacji genetycznych (skutkujących różnego typu mutacjami), które wpływają zarówno na architekturę genomów, jak i właściwości metaboliczne ich gospodarzy, przyspieszając tempo ewolucji tych mikroorganizmów. Poszczególne typy MGE charakteryzuje również wysoki poziom różnorodności. Wciąż identyfikowane są nowe MGE, a nawet całe grup nieznanych wcześniej elementów, co budzi powszechne zainteresowanie genetyków.

1. Wstęp

Organizmy należące do wszystkich trzech domen życia mają w swoich genomach ruchome elementy genetyczne (ang. *mobile genetic elements*, MGE), do których zalicza się m.in.: introny, inteiny, elementy transpozycyjne i prowirusy. Z perspektywy ewolucji, można je postrzegać jako samolubne segmenty DNA, które powielają się, dążąc do utrzymania dużej liczby kopii w puli genetycznej gatunku, co zapewnia im stabilne utrzymanie w populacji swoich gospodarzy. Według opublikowanych doniesień, elementy transpozycyjne (ang. *transposable elements*, TE) stanowią około 45% ludzkiego genomu. Do tej grupy MGE zaliczyć można: (i) sekwencje LINE (ang. *long interspersed nuclear elements*), (ii) SINE (ang. *short interspersed nuclear elements*) oraz (iii) transpozony. Szacuje się także, że około 5-8% TE człowieka wykazuje wysoki poziom podobieństwa sekwencji z genomami infekcyjnych retrowirusów (Katsura 2019). Rekordy pobijają jednak genomy roślinne, bowiem znane są przykłady, w których MGE stanowią więcej niż 70% sekwencji nukleotydowej (Defraia 2014).

2. Ruchome elementy genetyczne zintegrowane z genomem

2.1 Elementy transpozycyjne (TE)

Ponad 80 lat temu, Barbara McClintock rozpoczęła badania cytogenetyczne kukurydzy (*Zea mays*). Na początku lat 50-tych ubiegłego wieku po raz pierwszy doniosła ona o odkryciu elementów transpozycyjnych, nazywanych obrazowo „skaczącymi genami” (ang. *jumping genes*) (McClintock 1950). Analizując nietypowe mutacje (ang. *unstable mutations*) zauważyła pojawianie się „pęknięć” w konkretnych *loci* w chromosomach kukurydzy, co skutkowało przerwaniem ciągłości informacji genetycznej. W ten sposób Barbara McClintock zidentyfikowała pierwszy transpozon, który nazwała *Ds* od „*dissociation*”, czyli „rozdzielenie”. Później odkryła, że pewne TE mogą „skakać” samodzielnie, a inne – nie. Mobilność *Ds* była uzależniona od obecności autonomicznego elementu transpozycyjnego nazwanego przez nią *Ac* od „*activator*”. Aktualnie *Ds* i *Ac* reprezentują superrodzinę *hAT* transpozonów DNA (Hickman i in. 2016). Badania prowadzone przez McClintock były przez długi czas niedoceniane. Powszechnie uważano, że genomy są stabilnymi strukturami, a stabilność ta jest konieczna do opisu gatunku jako jednostki taksonomicznej. Idea konserwatywnego

charakteru genomu wywodziła się jeszcze z praw Mendla, a umocniły ją odkrycia wskazujące na ścisłą regulację ekspresji genów u bakterii. Dopiero po udowodnieniu istnienia zjawiska transpozycji metodami biologii molekularnej, badania Barbary McClintock uznano za przełomowe, a w 1983 roku uhonorowano je nagrodą Nobla (Hua-Van i in. 2011).

Transpozony stanowią bardzo liczną grupę MGE. Piégu i in. (2015) zaproponowali następującą definicję elementu transpozycyjnego: TE jest wydzielonym segmentem DNA zdolnym do przemieszczania w obrębie genomu gospodarza z pierwotnej lokalizacji (w chromosomie lub plazmidzie) do nowej, który nie determinuje własnych specyficznych molekularnych mechanizmów umożliwiających samodzielny transfer do nowych gospodarzy na drodze horyzontalnego transferu. Autorom definicji zależało, aby nie obejmowała ona m.in. genomów wirusów oraz elementów ICE (ang. *integrative conjugative elements* – elementy integrujące z DNA, zdolne do koniugacji). Mają one podobne właściwości do elementów transpozycyjnych, odróżnia je jednak zdolność do samodzielnego przemieszczania się między komórkami różnych mikroorganizmów.

Autonomiczne elementy transpozycyjne kodują enzymy niezbędne do ich mobilności, z kolei nieautonomiczne TE są zależne od enzymów dostarczanych przez spokrewnione z nimi elementy autonomiczne (Kidwell 2001). Liczba kopii TE w genomie w obrębie gatunku może się zmieniać zależnie od ich aktywności oraz czasu jaki upłynął od ich wprowadzenia. Podobnie jak inne komponenty genomu, TE akumulują mutacje, które mogą prowadzić do inaktywacji i uniemożliwić dalszą mobilność tych elementów. W wyniku tego procesu (nazywanego „starzeniem”, ang. *aging*) w genomach wielu organizmów powszechnie obecne są liczne defektywne elementy transpozycyjne obok kilku kopii aktywnych (Piégu 2015).

Finnegan (1992) zaproponował klasyfikację TE, której u podstaw były przewidywane przez niego mechanizmy transpozycji. Wyróżnił on 2 klasy TE: (a) klasę I, grupującą elementy przeprowadzające transpozycję z udziałem odwrotnej transkrypcji, dla których RNA stanowi formę pośrednią transpozycji (ang. *intermediate*) (retrotranspozony), oraz (b) klasę II – w której transpozony (w formie DNA) wbudowane zostają w miejsce docelowe DNA. TE należące do drugiej grupy określa się często jako „transpozony DNA”.

Ekspansja retrotranspozonów zachodzi na drodze mechanizmu kopiuj-i-wklej (ang. *copy-and-paste mechanism*). Integrację poprzedza przepisanie sekwencji z RNA z powrotem na DNA przez odwrotną transkryptazę kodowaną w obrębie transpozonu. W klasie I wyróżniono dwa typy elementów: (a) zawierające długie powtórzone sekwencje (ang. *long terminal repeats*, LTR), i takie, które nie są nimi oflankowane (ang. *non-LTR*) (Eickbush 2008). W materiale genetycznym współczesnego człowieka aktywnymi TE są wyłącznie elementy należące do retrotranspozonów i to one reprezentują główną siłę kształtującą ewolucję ludzkiego genomu (Rebollo 2012).

Do klasy II TE zaliczono elementy zdolne do zmiany lokalizacji w genomie na drodze mechanizmu wytnij-i-wklej (ang. *cut-and-paste mechanism*). Reakcje wycięcia i insercji są katalizowane przez transpozazę (kodowaną w obrębie elementu lub, w przypadku nieautonomicznych TE, dostarczaną przez inny funkcjonalny TE, która dokonuje nacięcia w DNA w obrębie odwróconych powtórzeń sekwencji (ang. *terminal inverted repeats*, TIR), flankujących dany element. Transpozycja różni się od innych mechanizmów przenoszenia ruchomych elementów genetycznych dwoma właściwościami: (a) wszystkie formy pośrednie w reakcji są cząsteczkami DNA, (b) nie jest wymagana identyczność sekwencji donorowej (elementu) i miejsca docelowego (w genomie) (ang. *target site*) (Piégu 2015).

Mechanizm wytnij-i-wklej obejmuje wprowadzenie dwuniciowych pęknięć (ang. *double strand breaks*, DSB) na końcach transpozonu, co fizycznie uwalnia go z miejsca pierwotnej lokalizacji. Z chemicznego punktu widzenia, wycięcie składa się z dwóch etapów, tj.: (a) pęknięcia pierwszej z nici DNA będącego wynikiem ataku nukleofilowego cząsteczki wody, (b) uwolnienia końca transpozonu poprzez wprowadzenie pęknięcia na drugiej nici według różnych mechanizmów. Zależnie od transpozazy przeprowadzającej katalizę, nukleofilem w drugim etapie może być cząsteczka wody lub koniec 3'OH przeciwnej nici powstały w czasie wprowadzenia pierwszego nacięcia (obecna tzw. struktura spinki do włosów). W niektórych przypadkach, drugi atak nukleofilowy jest katalizowany przez odrębny enzym. Ponadto, część transpozonów DNA jest wycinana w formie liniowej, część – w cyrkularnie zamkniętej (Piégu 2015).

Wstawianie, czyli integracja w nowe *loci*, również obejmuje atak nukleofilowy, jednak tym razem jest to reakcja transestryfikacji. Z zasady mechanizm wytnij-i-wklej powoduje powielenie krótkiej sekwencji nukleotydowej w miejscu docelowym transpozycji (*target site duplications*, TSD). Większość transpozaz wymaga obecności wspomnianych wcześniej terminalnych powtórzeń sekwencji (TIR) flankujących powielany element, są one jednak niespecyficzne względem miejsca insercji (Pięgu 2015).

2.2 Introny

Pierwsze doniesienia o istnieniu intronów pochodzą z lat 70-tych XX wieku. Berget i in. (1977) wykorzystał mikroskop elektronowy do zobrazowania hybrydyzacji między oczyszczonym mRNA kodującym polipeptyd heksonu (główne białko kapsydu adenowirusa *Human Adenovirus 2*), a jednoniciowym DNA. Zaobserwowali, że koniec 5' transkryptu (około 100 bp) pozostał w formie jednoniciowego „ogona”. Sekwencje DNA komplementarne do niezhybrydowanego końca mRNA zostały znalezione 17, 20 i 27 jednostek mapowych dalej na tej samej nici DNA. Autorzy publikacji zasugerowali, że fragmenty występujące w finalnym produkcie transkrypcji są łączone w trakcie procesu dojrzewania mRNA. W tym samym czasie podobne doświadczenia wykonywał Chow i in (1977). Przeprowadzając hybrydyzację między DNA ludzkiego adenowirusa 2 a kilkoma mRNA izolowanymi z zainfekowanych komórek, zauważył powstawanie pętli (ang. *displacement loops*, *R loops*). Informacja genetyczna o danym białku wydawała się być podzielona na fragmenty przez sekwencje, których główną rolą było wygenerowanie dodatkowych fragmentów RNA wycinanych przed powstaniem finalnego transkryptu gotowego do translacji.

Początkowe odkrycia dotyczące adenowirusa szybko zyskały potwierdzenie również przy zastosowaniu innych modeli badawczych. Wraz z każdym kolejnym projektem sekwencjonowania genomowego DNA stawało się jasne, że introny (wraz z maszyną konieczną do ich usuwania) są powszechne w komórkach eukariontów. Dla przykładu, przeciętny pierwotny transkrypt współczesnego człowieka zawiera średnio 9 intronów, a w całym genomie posiadamy ich kilkaset tysięcy (Lander 2001; Venter 2001).

Aktualna klasyfikacja wyróżnia 5 głównych typów intronów, które zostały scharakteryzowane ze względu na mechanizm splicingu (Pięgu 2015). Do pierwszego z nich zalicza się jądrowe introny wycinane przy udziale spliceosomu (ang. *regular spliceosomal introns*, RSI) obecne wyłącznie w genomach Eukaryota i najpowszechniej znane biologom. Drugi typ stanowią introny występujące w genach tRNA organizmów jądrowych i należących do domeny Archaea. Ich wycinanie wymaga aktywności dedykowanych do tego procesu enzymów (ang. *tRNA splicing endonuclease* i *tRNA splicing ligase*). Trzy ostatnie typy intronów mają zdolność do samowycinania: introny grupy I i II wykorzystują autokatalityczne właściwości RNA, grupa III została zaproponowana względnie niedawno i wydaje się być spokrewniona z intronami grupy II.

Znalezione w szerokim spektrum genów (mRNA, tRNA, rRNA) introny grupy I mają zdolność katalizy własnego splicingu. Introny te zostały zlokalizowane w genomach chloroplastów i mitochondriów niższych eukariontów (np. okrzemek, euglen, glonów) oraz roślin wyższych, a także wśród przedstawicieli Eubacteria i Archaea (Ton-Hoang 2010, Raghavan 2009). Długość większości intronów mieści się w granicach 250-500 bp. W czasie transkrypcji, RNA samoorganizuje się w misterną strukturę III rzędu, niezbędną do autokatalitycznego wycinania intronów (Haugen 2005). Autonomiczne introny grupy I zawierają otwartą ramkę odczytu dla endonukleazy homingu (ang. *homing endonuclease*, HEN) – enzymu wprowadzającego dwuniciowe pęknięcie DNA w miejscu docelowym transpozycji, które podlega mechanizmowi naprawy przez aparat gospodarza wykorzystujący sekwencję intronu jako matrycę. Zdolność do przemieszczenia z pierwotnej lokalizacji do nowego *loci* jest podstawą klasyfikowania intronów grupy I do samowycinających się elementów (ang. *self-splicing elements*, SSEs) (Pięgu 2015).

Introny grupy II zostały zidentyfikowane w genach kodujących białka, tRNA, rRNA – w genomach licznych bakterii. Wśród Eukaryota ich rozmieszczenie jest ograniczone do mitochondriów i chloroplastów organizmów niższych, roślin wyższych i niektórych gatunków pierścienic. Powszechnie uznaje się, że introny grupy II nie występują w genach jądrowych organizmów eukariotycznych. Transkrypty RNA charakteryzują się konserwowaną strukturą II rzędu

zorganizowaną w 6 domen. W wyniku interakcji między nimi tworzy się konieczna do aktywności katalitycznej struktura III rzędu (Marcia 2013). Introny grupy II można zaklasyfikować jako elementy transpozycyjne, wykorzystujące RNA jako intermediat w procesie zmiany lokalizacji. Transkrypt RNA intronu ulega insercji w miejsce docelowe transpozycji w reakcji określanej jako odwrotny splicing (ang. *reverse-splicing*) jeszcze przed procesem odwrotnej transkrypcji do DNA. Introny II grupy kodują własną odwrotną transkryptazę (ang. *reverse transcriptase*, RT). Aktywność endonukleolityczna jest zapewniana przez sam rybozym, choć w niektórych intronach istnieje białko fuzyjne odwrotnej transkryptazy i endonukleazy homingu (HEN) (Pięgu 2015).

2.3 Inteiny

Pierwsze wzmianki na temat intein pochodzą z roku 1988. Zimniak i in. porównali wówczas sekwencję aminokwasową przewidzianą na podstawie sekwencji cDNA kodującej podjednostkę H⁺-ATPazy (występującej w tonoplaście komórek marchwi) z sekwencją aminokwasową F₀F₁-ATPazy, zlokalizowanej w wewnętrznej błonie mitochondrialnej *Neurospora crassa*. Homologia między nimi sięgała około 70%. W tym samym roku został zidentyfikowany homologiczny gen u drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, początkowo opisywany jako transporter jonów wapniowych (Shih 1988). W 1990 roku Hirata i in., przyrównując sekwencję podjednostki ATP-azy drożdży do wspomnianych wcześniej polipeptydów, wykazali istnienie niehomologicznego 454-aminokwasowego insertu (w sekwencji białka drożdży) i zaproponował, że jest on wycinany potranslacyjnie.

Terminem inteiny określane są inserty w genach kodujących poliproteiny, szczególnie w ważnych z perspektywy przeżycia komórek gospodarza (Barzel 2011). Często lokalizują się w sekwencjach kodujących wysoce konserwowane motywy. Te ruchome elementy genetyczne zostały zidentyfikowane w genomach przedstawicieli każdej z domen życia. Niedawne badania potwierdziły ich obecność w genach wirusów infekujących zwierzęta (Bigot 2013). Inteiny DNA zawierają ORF białek katalizujących zarówno ich wycinanie z łańcucha aminokwasowego, jak i ligację fragmentów białka gospodarza (ekstein). Ponadto, wiele intein jest zdolnych do przemieszczenia, wykorzystując w tym celu endonukleazy homingu (HENs). Unikają więc negatywnych skutków jakie mogłyby wynikać z przerwania ciągłości genów kodujących białka gospodarza, a jednocześnie mogą się rozprzestrzeniać drogą horyzontalnego transferu. Liczba kopii intein w genomie ulega zwiększeniu w wyniku konwersji genu, a także ich bezpośredniej insercji w miejsce docelowe, po czym aparat naprawy DNA gospodarza wykorzystuje nowo wintegrowaną inteinę jako matrycę dobudowując drugą nić. Kryteria, które mogą być brane pod uwagę przy klasyfikacji intein to: (a) miejsca insercji, (b) relacje ewolucyjne między inteinami oparte na zróżnicowaniu ich sekwencji oraz (c) endonukleazy homingu (HENs) (Pięgu 2015).

2.4 Prowirusy

Wiele wirusów, zarówno prokariotycznych, jak i eukariotycznych, ma zdolność integracji swojego materiału genetycznego z genomem gospodarza. Wbudowanie DNA faga może powodować zmiany w genomie gospodarza, np. może prowadzić do przerwania ciągłości genów lub istotnej sekwencji regulacyjnej. Zmiany na większą skalę również są możliwe. Gdy komórka bakteryjna jest lizogenem dwóch fagów relatywnie blisko spokrewnionych, istnieje ryzyko rekombinacji homologicznej między nimi i powstania hybrydowego genomu nowego, w pełni aktywnego wirusa.

Dobrze poznanym przykładem ludzkiego wirusa integrującego do genomu jest HIV-1 (ang. *human immunodeficiency virus 1*). Potrafi on wejść w stan latencji, czyli stan odwracalnej nieproduktywnej infekcji. Ekspresja genów wirusowych jest na niskim poziomie a nowe cząstki wirionowe nie są praktycznie produkowane. Materiałem genetycznym HIV-1 jest dodatni ssRNA, który ulega przepisaniu na sekwencję DNA przez odwrotną transkryptazę (pochodzenia wirusowego, jest dostarczana do komórki w obrębie kapsydu). DNA ulega integracji do genomu gospodarza i zostaje od tego momentu określany jako prowirus. Reakcję rekombinacji przeprowadza integraza pochodzenia wirusowego. Oba wspomniane enzymy są kodowane w obrębie genu *pol*. Zainfekowane monocyty, makrofagi, komórki mikrogleju oraz limfocyty T CD4⁺ stanowią istotny, stabilny i długotrwały rezerwuuar wirusa HIV-1 (Fanales-Belasio 2010).

Wiele bakteriofagów łagodnych również wintegrowuje swój materiał genetyczny do genomu gospodarza. Określane są wtedy mianem profagów, a bakterię je zawierającą – lizogonów. Profag

zazwyczaj jest fizycznie wbudowany w jeden z replikonów komórki bakteryjnej, chociaż istnieją także wirusy (np. P1, N15), które funkcjonują jako samodzielne cyrkularne lub liniowe plazmidopodobne episomy (Girons 2000; Casjens 2003). Specyficzność reakcji integracji jest skrajnie różna. Wśród fagów infekujących *E. coli* można znaleźć takie, które (a) integrują w jedno specyficzne miejsce chromosomu bakteryjnego, np. fag λ , (ii) wybierają jedno z kilku możliwych loci np. P2 oraz (iii) integrują, lecz ich integracja nie jest specyficzna wobec sekwencji, np. fag Mu (Casjens 2003; Barreiro 1992). W wyniku indukcji odpowiednimi czynnikami profag może ulec wycięciu, wejść w cykl lityczny i spowodować lizę komórki gospodarza. Lizogenia łagodnych wirusów bakteryjnych, podobnie jak latencja retrowirusów, jest stanem odwracalnym i charakterystycznym dla przebiegu infekcji.

3. Podsumowanie

Ruchome elementy genetyczne stanowią szeroko rozpowszechnioną i różnorodną grupę, która wywiera niebagatelny wpływ na architekturę genomów organizmów każdej z domen życia. Ich mobilność może skutkować zmianami w fenotypie komórki gospodarza, np. w wyniku unieczynnienia genu lub operonu. Bardziej znaczące zmiany spowodowane są jednak obecnością w obrębie MGE genów o charakterze adaptacyjnym – warunkujących oporność na antybiotyki (np. transpozon *Tn7*) czy jony metali ciężkich (Alekhun 2007), a także genów kodujących czynniki wirulencji. Dobrym przykładem są w tym przypadku: (a) toksyna błonista *Corynebacterium diptheriae*, kodowana przez profaga *corynephage beta*, (b) toksyna *Vibrio cholerae*, kodowana przez profaga CTX ϕ , czy (c) dysmutaza *Salmonella typhimurium*, której gen znajduje się w profagu Gifsy-2 (Figueroa-Bossi 1999; Waldor 1996; Canchaya 2003).

Wciąż opisywane są nowe typy MGE bądź klasy w obrębie poznanych wcześniej grup, a nawet odkrywane są całe nieznane wcześniej grupy ruchomych elementów. W 2014 roku pojawiła się pierwsza publikacja na temat kaspozonów – MGE przypominających pod wieloma względami transpozony, nie kodujących jednak rekombinazy. Jak wynika z dotychczasowych badań, białko endonukleazy Cas1 (kodowane przez wszystkie kaspozony) katalizuje reakcje integracji. Zaskakujące, że białko homologiczne Cas1 stanowi ważny komponent prokariotycznych systemów CRISPR-Cas, co sugeruje, że systemy te mogą wywodzić się od kaspozonów (Krupovic 2014).

Ruchome elementy genetyczne są grupą niezwykle różnorodną. Zostały zidentyfikowane u przedstawicieli trzech domen życia. Mimo dekad badań, wciąż trudno określić jaką część góry lodowej MGE jest przez nas widoczna.

4. Literatura

- Alekhun MN, Levy SB (2007) Molecular Mechanisms of Antibacterial Multidrug Resistance. *Cell* 128: 1037-1050.
- Barreiro V, Haggard-Ljungquist E (1992) Attachment sites for bacteriophage P2 on the *Escherichia coli* chromosome: DNA sequences, localization on the physical map, and detection of a P2-like remnant in *E. coli* K-12 derivatives. *Journal of Bacteriology* 174: 4086-4093.
- Barzel A, Naor A, Privman E et al. (2011) Homing endonucleases residing within inteins: evolutionary puzzles awaiting genetic solutions. *Biochemical Society Transactions* 39: 169-173.
- Berget SM, Moore C, Sharp PA (1977) Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74(8): 3171-3175.
- Bigot Y, Piégu B, Casteret S et al. (2013) Characteristics of inteins in invertebrate iridoviruses and factors controlling insertion in their viral hosts. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 67: 246-254.
- Canchaya C, Proux C, Fournous G et al. (2003) Prophage genomics. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR* 67(2): 238-276.
- Casjens S (2003) Prophages and bacterial genomics: what have we learned so far? *Molecular Microbiology* 49: 277-300.

- Chow LT, Gelinas RE, Broker TR, Roberts RJ (1977) An amazing sequence arrangement at the 5' ends of adenovirus 2 messenger RNA. *Cell* 12(1): 1-8.
- Defraia C, Slotkin R (2014) Analysis of retrotransposon activity in plants. *Methods in molecular biology* 1112: 195-210.
- Eickbush TH, Jamburuthugoda VK (2008) The diversity of retrotransposons and the properties of their reverse transcriptases. *Virus Research* 134(1-2): 221-234.
- Fanale-Belasio E, Raimondo M, Suligoi B, Buttò S (2010) HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: A brief overview. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità* 46: 5-14.
- Figueroa-Bossi N, Bossi L (1999) Inducible prophages contribute to *Salmonella* virulence in mice. *Molecular Microbiology* 33: 167-176.
- Finnegan DJ (1989) Eukaryotic transposable elements and genome evolution. *Trends in Genetics* 5: 103-107.
- Finnegan DJ (1992) Transposable elements. *Current Opinion in Genetics & Development* 2: 861-867.
- Girons IS, Bourhy P, Ottone C et al. (2000) The LE1 bacteriophage replicates as a plasmid within *Leptospira biflexa*: construction of an *L. biflexa*-*Escherichia coli* shuttle vector. *Journal of Bacteriology* 182: 5700-5705.
- Haugen P, Simon DM, Bhattacharya D (2005) The natural history of group I introns. *Trends in Genetics* 21: 111-119.
- Hickman AB, Dyda F (2016) DNA Transposition at Work. *Chemical Reviews* 116(20): 12758-12784.
- Hirata R, Ohsumi Y, Nakano A et al. (1990) Molecular structure of a gene, VMA1, encoding the catalytic subunit of H(+)-translocating adenosine triphosphatase from vacuolar membranes of *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry* 265(12): 6726-6733.
- Hua-Van A, Le Rouzic A, Boutin TS et al. (2011) The struggle for life of the genome's selfish architects. *Biology Direct* 6: 19.
- Katsura Y, Asai S (2019) Evolutionary medicine of retroviruses in the human genome. *The American Journal of the Medical Sciences* 358(6): 384-388.
- Kidwell MG, Lisch DR (2001) Perspective: transposable elements, parasitic DNA, and genome evolution. *Evolution* 55: 1-24.
- Krupovic M, Makarova KS, Forterre P et al. (2014) Casposons: a new superfamily of self-synthesizing DNA transposons at the origin of prokaryotic CRISPR-Cas immunity. *BMC Molecular and Cell Biology* 12: 36.
- Lander ES, Linton LM, Birren B (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409(6822): 860-921.
- Marcia M, Somarowthu S, Pyle AM (2013) Now on display: a gallery of group II intron structures at different stages of catalysis. *Mobile DNA* 4: 14.
- McClintock B (1950) The origin and behavior of mutable loci in maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 36 (6): 344-355.
- Piégu B, Bire S, Arensburg P, Bigot Y (2015) A survey of transposable element classification systems – A call for a fundamental update to meet the challenge of their diversity and complexity. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 86: 90-109.
- Raghavan R, Minnick MF (2009) Group I introns and inteins: disparate origins but convergent parasitic strategies. *Journal of Bacteriology* 191: 6193-6202.
- Rebollo R, Romanish MT, Mager DL (2012) Transposable elements: an abundant and natural source of regulatory sequences for host genes. *Annual Review of Genetics* 46: 21-42.
- Shih CK, Wagner R, Feinstein S et al. (1988) A dominant trifluoperazine resistance gene from *Saccharomyces cerevisiae* has homology with F₀F₁ ATP synthase and confers calcium-sensitive growth. *Molecular and Cellular Biology* 8(8): 3094-3103.
- Ton-Hoang B, Pasternak C, Siguier P (2010) Single-stranded DNA transposition is coupled to host replication. *Cell* 142: 398-408.
- Venter JC, Adams MD, Myers EW (2001) The sequence of the human genome. *Science* 291(5507): 1304-1351.

- Waldor MK, Mekalanos JJ (1996) Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. *Science* 272: 1910-1914.
- Zimniak L, Dittrich P, Gogarten JP et al. (1988) The cDNA sequence of the 69-kDa subunit of the carrot vacuolar H⁺-ATPase. Homology to the beta-chain of F₀F₁-ATPases. *Journal of Biological Chemistry* 263(19): 9102–9112.

21. Surfaktanty – właściwości i zastosowanie układów micelarnych

Surfactants – properties and applications of micellar systems

Szaniawska Magdalena

Katedra Zjawisk Międzyfazowych, Instytut Nauk Chemicznych, Wydział Chemii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

Opiekun naukowy: dr hab. Katarzyna Szymczyk, prof. UMCS

Szaniawska Magdalena: magdalena.szaniawska@poczta.umcs.lublin.pl

Słowa kluczowe: micle, krytyczne stężenie micelizacji

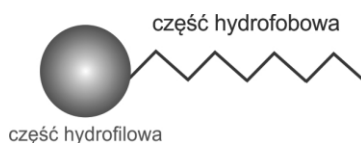
Streszczenie

Surfaktanty, jako związki chemiczne o unikatowej amfifilowej budowie posiadają wiele zastosowań, w wielu gałęziach przemysłu. Aktywność surfaktantów przejawia się przede wszystkim możliwościami obniżania napięcia powierzchniowego, a także tworzeniu, po przekroczeniu odpowiedniego stężenia, koloidalnych rozmiarów agregatów zwanych micelami. Celem niniejszej pracy jest charakterystyka surfaktantów oraz zastosowań układów micelarnych.

1. Wstęp

Surfaktanty, inaczej zwane środkami powierzchniowo czynnymi, amfifilowymi lub amfipatycznymi, to związki, które zmniejszają napięcie powierzchniowe na granicy dwóch niemieszających się faz. Dzięki tej właściwości klasyfikuje się je jako substancje emulgujące, zwilżające, spieniające, detergenty.

Surfaktanty zbudowane są z dwóch części: hydrofilowej „głowy” i hydrofobowego „ogona”. Taka budowa umożliwia powinowactwo polarnego fragmentu do wody, zaś niepolarnego do oleju. Część hydrofobowa najczęściej składa się z łańcucha alifatycznego lub łańcucha alifatyczno-aromatycznego zawierającego od 6 do 22 atomów węgla. Część hydrofilowa obejmuje grupy m. in. $-COOH$, $-NH_2$, NO_2 (Dutkiewicz 1998). Surfaktanty odgrywają istotną rolę w wielu procesach zarówno w naukach podstawowych, jak i stosowanych. Jedną ważną właściwością środków powierzchniowo czynnych jest tworzenie koloidalnych wielkości agregatów w roztworach, znanych jako micle, które mają szczególne znaczenie w farmacji ze względu na ich zdolność do zwiększania rozpuszczalności trudno rozpuszczalnych substancji w wodzie (Dutkiewicz 1998).



Rys. 1. Schemat budowy surfaktantu.

Surfaktanty często mylnie nazywane są detergentami. Jest to niepoprawne rozumowanie ze względu na to, iż detergenty to bardziej złożony produkt. Składają się najczęściej z: wybielaczy, wypełniaczy, środków do zmiękczenia tkanin, substancji zapachowych, rozjaśniaczy optycznych, stabilizatorów piany, solubilizatorów, środków zapobiegających sedymentacji, utrwalaczy barwników itd. (Chenier 2002).

2. Opis zagadnienia i przegląd literatury

2.1 Podział surfaktantów

Klasyfikacji surfaktantów dokonuje się na podstawie ładunku jaki przenoszą polarne grupy głowy. Dzieli się je na: anionowe, kationowe, niejonowe, amfoteryczne.

Surfaktanty anionowe to najczęściej sole sodowe zawierające powierzchniowo czynny anion. Do tej grupy zalicza się karboksylany (mydła- stearynian sodu), sulfoniany (alkanosulfonian sodu, alkilobenzenosulfonian sodu), siarczany VI (laurylosiarczan amonu, etoksyłowany laurylosiarczan sodu) (Zieliński 2009).

Powszechnie znanym przedstawicielem anionowych surfaktantów są mydła - pierwszy środek czyszczący używany przez ludzi. Kiedyś służyły one nie tylko do zachowywania higieny osobistej, ale także prania.

Mydło to sole sodowe lub potasowe wyższych kwasów tłuszczowych otrzymywane w wyniku reakcji hydrolizy triglicerydów. Tłuszcze używane do produkcji mydeł pochodzą z naturalnych źródeł. Tłuszcz zwierzęcy i olej kokosowy są najbardziej znanymi źródłami trójglicerydów. Innymi źródłami triglicerydów jest olej rycynowy, oliwa i nasiona bawełny (Chenier 2002).

Mydła jednak wypierane są przez detergenty, które przede wszystkim są tańsze. Także sole wapnia i magnezu powstające w twardej wodzie podczas używania mydła nie przemawiają za ich stosowaniem (sole wapnia i magnezu są nierozpuszczalne i wytrącają się na upranych ubraniach). Zaletą mydeł jest większa biodegradowalność i mniejsza toksyczność w stosunku do detergentów.

Surfaktanty kationowe są to czwartorzędowe sole amoniowe z jednym długołańcuchowym podstawnikiem alkilowym. Znajdują zastosowanie jako środki przeciwgrzybiczne i przeciwdrobnoustrojowe. Przykładem surfaktantu kationowego jest chlorek alkilobenzylodimetyloamoniowy (Zieliński 2009).

Surfaktanty niejonowe mają strukturę eteru zawierającego jeden podstawnik w postaci długołańcuchowego alkilu, a drugi krótszy w postaci poli(oksyetylenu).

Surfaktanty amfoteryczne składają się z grup kationowych i anionowych wchodzących w skład tej samej cząsteczki. Część anionowa może zawierać sulfoniany, albo betainy. Część kationowa obejmuje pierwszo-, drugo- i trzeciorzędowe aminy, a także czwartorzędowe kationy amoniowe. Surfaktanty obojętne w zależności od pH środowiska w jakim się znajdują będą zachowywały się jak kationy lub aniony (Pigoń i Ruziewicz 2005). W środowisku kwaśnym będą kationami, a w zasadowym anionami.

2.2 Właściwości surfaktantów

Początkowo związek powierzchniowo czynny znajdujący się na granicy dwóch faz występuje w postaci monomeru. Jednak gdy zostanie przekroczony limit rozpuszczalności zaczynają tworzyć się agregaty. Agregaty tworzą się w taki sposób żeby kontaktować się hydrofilową częścią z wodą. To zjawisko zwane jest krytycznym stężeniem tworzenia miceli – CMC (Rosen 2004). CMC jest wartością, która pomaga w określeniu minimalnej ilości surfaktantu potrzebnej do maksymalnego obniżenia napięcia powierzchniowego. Powstawaniu miceli towarzyszy nagle zmiana właściwości fizycznych roztworu (Dutkiewicz 1998). Zmianie ulega m. in. napięcie powierzchniowe, przewodnictwo elektryczne, intensywność rozpraszania światła w wodnych roztworach surfaktantów, lepkość.

Na wartość CMC ma wpływ (Zieliński 2009; Rosen 2004):

- a) Długość łańcucha alkilowego związku powierzchniowo czynnego. CMC w przypadku surfaktantów jonowych maleje dwukrotnie wraz z przyłączaniem kolejnej grupy metylenowej do łańcucha alkilowego, a dla związków niejonowych maleje trzykrotnie.
- b) Rodzaj surfaktantu. CMC jest mniejsze dla surfaktantów niejonowych niż dla jonowych. Surfaktanty kationowe mają wyższe wartości CMC niż surfaktanty anionowe.
- c) Wartościowość przeciwjonu. W przypadku większości nieorganicznych jednowartościowych jonów danego surfaktantu wartość CMC pozostaje na stałym poziomie, a dla jonów dwuwartościowych CMC zmniejsza się. Przeciwjony organiczne zmniejszają wartość CMC, w stosunku do przeciwjonów nieorganicznych, tym bardziej im większa jest grupa niepolarna surfaktantu.
- d) Wprowadzenie rozgałęzień, wiązań podwójnych, grup aromatycznych do niepolarnej części surfaktantu. Ten zabieg powoduje znaczny wzrost wartości CMC.

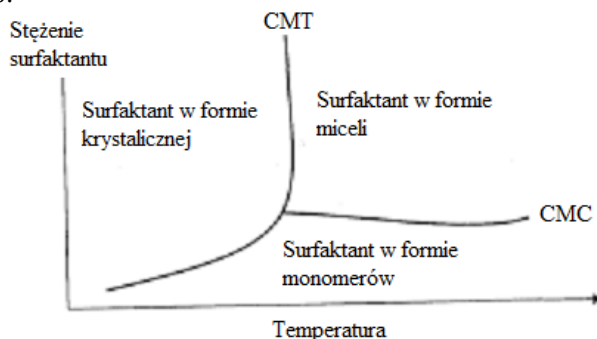
Punkt Krafft

Inną właściwością surfaktantów jest nieznaczna rozpuszczalność w niskich temperaturach. Jednak gdy stężenie surfaktantu przekroczy CMC, w danej temperaturze, rozpuszczalność gwałtownie wzrasta. Jest to tzw. punkt Krafft lub krytyczna temperatura miceli – CMT (Rys.2) . Poniżej CMT monomery środka powierzchniowo czynnego istnieją tylko w równowadze z uwodnioną fazą krystaliczną, a powyżej CMT powstają micelle zapewniające znacznie większą rozpuszczalność środka powierzchniowo czynnego (Lindmani Wennerström 1980). CMT zależy od długości łańcucha alkilowego, rodzaju przeciwjonu, struktury łańcucha i może się znacząco zmieniać wraz z niewielkimi ilościami zanieczyszczeń wprowadzonych do roztworu (Lindman i Wennerström 1980).

Znajomość punktu Krafft jest bardzo ważna, ponieważ poniżej tego punktu środek powierzchniowo czynny nie działa typowo dla siebie. Czyli nie obniża maksymalnie napięcia powierzchniowego i nie są tworzone micelle.

Równowaga hydrofilowo-lipofilowa

Równowaga hydrofilowo- lipofilowa, zwana wartością HLB, odnosi się do stopnia w jakim dany środek powierzchniowo czynny jest polarny. Wartość HLB określa w jakim stopniu dany środek powierzchniowo czynny rozpuszczalny jest w wodzie (Moroi 1992). Jej wartości mieszczą się w zakresie od 1 do 20.



Rys. 2. Diagram fazowy surfaktantów.

Im wyższa wartość HLB tym środek powierzchniowo czynny lepiej rozpuszcza się w wodzie. Im niższa wartość HLB tym obserwuje się lepszą rozpuszczalność w oleju.

W przybliżeniu wartość HLB można obliczyć używając następującego wzoru:

$$HLB = 20(1 - M_h/M_w)$$

gdzie: M_h – masa części hydrofobowej cząsteczki surfaktantu, M_w – masa całej cząsteczki.

W praktyce znajomość wartości HLB jest przydatna w doborze emulgatorów podczas tworzenia emulsji. Jedne emulgatory tworzą emulsje O/W, a inne W/O.

2.3 Biosurfaktanty

Biosurfaktanty to związki powierzchniowo czynne, które są bezpośrednio tworzone biologicznie. Wytwarzane są jako produkty przemiany drobnoustrojów. Głównie produkują je mikroorganizmy degradujące lipidy lub ropę naftową. Zdolność syntetyzowania biosurfaktantów jest szczególnie widoczna u mikroorganizmów rozkładających węglowodory. Biosurfaktanty są biodegradowalne i nieszkodliwe dla przyrody. Mówi się także, że mają właściwości podobne, a nawet lepsze niż alkilobenzenosulfoniany, czyli przedstawiciele syntetycznych związków powierzchniowo czynnych.

Większość biosurfaktantów przyjmuje strukturę lipidopodobną. Część hydrofobowa zbudowana jest z kwasów tłuszczowych lub węglowodorów. Część hydrofilowa może zawierać cukry, polisacharydy czy peptydy. Biosurfaktanty wykorzystywane są do usuwania zanieczyszczeń

ropopochodnych w oceanach, wymywania oleju z rurociągów lub cystern, a nawet jako surowce do produkcji kosmetyków (Biermann i in. 1987).

2.4 Micele

Tworzenie układów micelarnych i ich właściwości

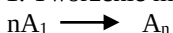
Micele to zagregowane układy surfaktantu. W ich strukturze wyróżnia się: rdzeń, obszar fazy objętościowej (warstwa palisadowa) i obszar powierzchniowy. Składają się z 50 do 200 monomerów surfaktantu. Swoim kształtem przypominają kulę, w której hydrofilowe głowy znajdują się na obwodzie, a hydrofobowe ogony wewnątrz. Micele zaczynają tworzyć się gdy surfaktant osiągnie krytyczne stężenie micelizacji – CMC. Czyli gdy zostanie utworzona już monowarstwa surfaktantu, a jego stężenie będzie nadal rosło. W takim przypadku stężenie monomeru będzie pozostawało już na stałym poziomie, a wzrastać będzie stężenie miceli i surfaktant będzie ulegał samoasocjacji (Pigoń i Ruziewicz 2005).

Agregacja cząsteczek środka powierzchniowo czynnego wynika częściowo ze skłonności grup hydrofobowych do minimalizowania kontaktu z wodą poprzez tworzenie mikroskopijnych mikrodomen w rozpuszczalniku. Tam interakcje alkil-alkil są zmaksymalizowane, podczas gdy hydrofilowe grupy głowy pozostają otoczone wodą (Eastoe 2005).

Powyższy opis miceli stosowany jest dla surfaktantów rozpuszczonych w roztworze polarnym. W przypadku roztworów niepolarnych powstają tzw. micele odwrócone. Oznacza to, że część niepolarna znajduje się na zewnątrz miceli, część polarna wewnątrz.

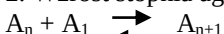
Etapy tworzenia miceli (Dutkiewicz 1998):

1. Tworzenie miceli z monomerów.



gdzie: A_1 – monomer, A_n – micela składająca się z n cząsteczek surfaktantu

2. Wzrost stopnia agregacji.



3. Wiązanie przez micelę przeciwnionów.

Solubilizacja

Solubilizacja to proces rozpuszczania związków nierozpuszczalnych lub praktycznie nierozpuszczalnych w wodzie, pod wpływem dodatku trzeciego składnika jakim jest surfaktant (Lindman i Wennerström 1980).

Podana wyżej definicja jest bardzo ogólna. Bardziej szczegółowo solubilizację określa się jako: sporządzanie roztworu izotropowego, termodynamicznie stabilnego substancji nierozpuszczalnej lub słabo rozpuszczalnej w danym rozpuszczalniku, do którego zostaje wprowadzony dodatkowy składnik lub składnik amfifilowy (Attwood i Florence 1983). Taka definicja obejmuje rozcieńczone i stężone roztwory, biorąc pod uwagę czy solubilizat jest polarny, czy nie. W procesie tym wyróżniamy trzy składniki: rozpuszczalnik, solubilizat i środek powierzchniowo czynny (Attwood i Florence 1983).

Solubilizacja zachodzi dopiero gdy w roztworze zostanie przekroczone CMC. Zdolność do solubilizacji wzrasta wraz z długością łańcucha węglowodorowego środka powierzchniowo czynnego. Zjawisko to ma wiele praktycznych zastosowań w produkcji detergentów czy preparatów farmaceutycznych, a także w katalizie micelarniej (Lindman i Wennerström 1980).

Do procesu solubilizacji można zastosować następujące wielkości:

Współczynnik podziału $[DA]$:

$$D_A = \frac{[A]_M}{[A]_W}$$

gdzie: $[A]_M$, $[A]_W$ - stężenie substancji A w pseudofazie micelarniej i wodnej.

Stała wiązania w miceli $[K_A]$:

$$K_A = \frac{[A]_M}{[A]_W \times (S_M - CMC)}$$

gdzie: S_M - to stężenie surfaktantu w pseudofazie micelarnej.
Stopień naładowania miceli L_M :

$$L_M = \frac{[A]_M - [A]_W}{S_M - CMC}$$

Kataliza micelarna

Katalizę micelną definiuje się jako podwyższoną szybkość reakcji w roztworach micelarnych w stosunku do czystych układów wodnych (Biermann i in. 1987).

Makroskopowo roztwór zawierający agregaty micelarne jest jednorodny. Jednak mikroskopowo roztwór podzielony jest na wiele małych obszarów o wysokim stężeniu substancji rozpuszczonej (micel), rozproszonych w regionach rozpuszczalnika. Jeśli warunki w tych dwóch środowiskach będą powodować różne szybkości reakcji, wtedy micle będą działały jako katalizatory lub inhibitory. Wydajność katalityczna będzie regulowana przez powinowactwo odczynników do miceli i reaktywności związanego reagentu z micelą. Kinetyka reakcji roztworów micelarnych jest regulowana przez elektrostatyczne i hydrofobowe oddziaływania między micelami i reagentami (Moroi 1992).

Wyróżnia się trzy typy katalizy micelarnej. Pierwszy, w którym micle są reagentami. Drugi, w którym występują interakcje między micelami i reagującymi odczynnikami, które mają wpływ na szybkość reakcji. Trzeci gdzie micle przenoszą katalitycznie aktywne podstawniki (Moroi 1992).

Rodzaje micel

Wyróżniamy wiele różnych kształtów micel, które zależą m. in. od struktury środka powierzchniowo czynnego, a także warunków środowiska – stężenie, temperatura, pH, zawartość elektrolitu.

Głównie wyróżnianymi strukturami micel są; sferyczne micle, pęcherzyki, dwuwarstwy, micle odwrócone. Kształt micel będzie zależał od dwóch sił kontrolujących proces samoasocjacji. Będzie to oddziaływanie węglowodor – woda, które sprzyja agregacji, a także oddziaływanie głowa – głowa, które sprzyja odpychaniu.

Przybliżony kształt micel można obliczyć ze wzoru określającego krytyczny parametr pakowania P_C :

$$P_C = \frac{V}{(a_0 \times l_c)}$$

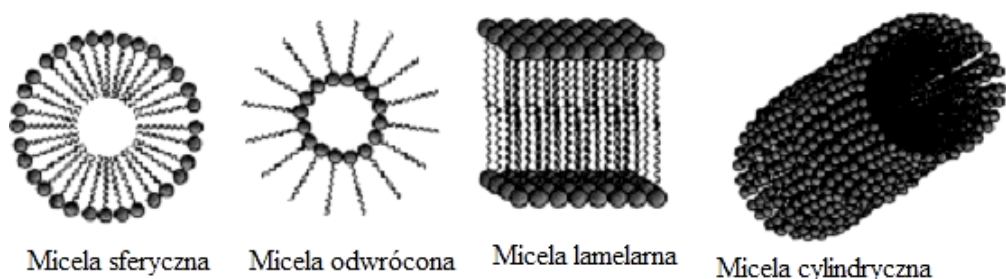
gdzie: V – objętość hydrofobowego ogona, a_0 - minimalny obszar międzyfazowy zajmowany przez grupę czołową, l_c - maksymalna wydłużona długość łańcucha ogona w rdzeniu miceli.

Parametr V zmienia się wraz z liczbą grup hydrofobowych, nienasyceniem łańcucha, rozgałęzianiem łańcucha i penetracją łańcucha przez inne grupy hydrofobowe, podczas gdy a_0 jest głównie regulowany przez oddziaływania elektrostatyczne i hydratację grupy czołowej (Eastoe 2005).

Tab. 1. Zależność tworzącej się struktury miceli od wartości P_C (Rosen 2004).

Wartość P_C	Struktura miceli
0 - 1/3	Sferyczna w środowisku wodnym
1/3 - 1/2	Cylindryczna w środowisku wodnym
1/2 – 1	Lamelarna w środowisku wodnym
>1	Odwrócona w środowisku niewodnym

W rozcieńczonych roztworach wodnych surfaktantów i w temperaturze pokojowej tworzą się struktury sferyczne. Wraz ze wzrostem stężenia surfaktantu i wzrostem liczby agregacji, początkowo powstają struktury cylindryczne, a następnie lamelarne. W układach, w których rozpuszczalnik jest niepolarny tworzą się struktury odwrócone.



Rys. 3. Struktury micel.

2.5 Zastosowanie surfaktantów i układów micelarnych

Tekstylia i włókiennictwo

Środki powierzchniowo czynne są stosowane podczas wstępnego procesu przetwarzania materiałów włókienniczych. Przed rozpoczęciem procesu obróbki włókna należy oczyścić z substancji zbędnych tj. wosków, tłuszczu, pektyn, łusek nasion i innych zanieczyszczeń. W tym celu stosuje się detergenty i środki zwilżające będące mieszaniną różnych związków powierzchniowo czynnych.

Anionowymi środkami powierzchniowo czynnymi stosowanymi w tym celu są: mydła, pierwszorzędowe sulfoniany alkanów, drugorzędowe alkanosulfoniany, alkilobenzenosulfoniany, alkilosiarczany, alkiloarylowe siarczany eteru poliglikolowego, acylometylotauryny, acylosarkozyniany, estry kwasu sulfo-bursztynowego (Piorr 1987).

Niejonowymi środkami powierzchniowo czynnymi są np. etery alkilopoliglikolowe, etery alkilofenolopoliglikolowe, estry poliglikolowe kwasów tłuszczowych, alkanoloamidy kwasów tłuszczowych (Piorr 1987).

Podczas obróbki wstępnej materiałów włókienniczych wykorzystuje się następujące procesy: merceryzację, gotowanie i bielenie. W procesie bielenia wykorzystywane są środki zwilżające w postaci sulfonianów alkanów i alkiloarylosulfonianów, a także ich kombinacje z niejonowymi środkami powierzchniowo czynnymi.

W trakcie wytwarzania tekstyliów środki powierzchniowo czynne są stosowane w celu zapobiegania tarcia między częściami maszyn, a włóknami i do wytwarzania ładunków statycznych. Stosowane środki powierzchniowo czynne to: alkanosulfoniany, alkilosiarczany, etoksyłowane alkohole tłuszczowe, kwasy tłuszczowe, aminy tłuszczowe i amidy kwasów tłuszczowych (Piorr 1987).

W procesie bielenia tekstyliów środki powierzchniowo czynne służą do przygotowywania barwników, aplikacji barwników na tekstylnia i usuwania nadmiaru barwnika.

W kolejnych etapach obróbki tekstyliów stosuje się procesy prania, farbowania i wybielania. Sprawia one, że materiały stają się szorstkie i nieprzyjemne. Aby uzyskać przyjemny efekt w dotyku, stosuje się środki zmiękczające tkaniny. Odpowiednimi środkami zmiękczającymi do tkanin są polietylen w postaci zemulgowanej lub łatwo emulgującej się formie, estry kwasów tłuszczowych, amidy kwasów tłuszczowych, tlenki amin i skondensowane aminy. Wykorzystywane są również siarczane etery poliglikolowe, estry kwasu fosforowego, betainy, woski i silikon.

2.6 Oczyszczanie zanieczyszczonych wód

Największy problem w usuwaniu zanieczyszczeń z wody powodują barwniki i pigmenty w niej obecne. Zanieczyszczenia tego typu pochodzą z fabryk produkujących barwniki i przemysłu tekstylnego. Znane są metody łączące procesy biologiczne i chemiczne w celu recyklingu zanieczyszczonych wód (Krull i Döpkens 2004). Jednak procesy sorpcji wydają się być atrakcyjniejszą alternatywą. Zwłaszcza gdy można użyć taniego sorbentu. Przykładami takich sorbentów są: trociny, łuski z orzecha ziemnego, sole kwasów humusowych czy humian żelaza (Janos i Smidova 2005). Humian żelaza ma zdolność do zatrzymywania różnej klasy zanieczyszczeń. Od związków jonowych, po związki o bardzo niskiej polarności. Jeszcze lepsze efekty zauważa się

gdy obok sorbentu zostanie zastosowany środek powierzchniowo czynny. Jednak wpływ środków powierzchniowo czynnych zależy od ich typu. Niejonowe i kationowe surfaktanty nie wykazują wpływu na sorpcję zanieczyszczeń. Użycie surfaktantów anionowych wykazuje skuteczność, lecz w określonych stężeniach tych związków. Wysokie stężenie powoduje powstawanie miceli. Co jest przyczyną solubilizacji cząstek barwnika i brakiem sorpcji. Niskie stężenia powodują powstanie małych agregatów, które są sorbowane na sorbencie.

Tworzenie elektrod

Wykazano, iż podczas przygotowywania elektrod do akumulatorów litowo – jonowych bardzo ważne jest użycie środka powierzchniowo czynnego. Akumulatory litowo – jonowe stosowane są w samochodach zasilanych energią elektryczną tzw. Hybrydach. W takich elektrodach wykorzystuje się nanocząsteczki. To od ich rozmieszczenia zależy prawidłowe działanie elektrody. Środek powierzchniowo czynny powoduje równomierną dyspersję nanocząsteczek. Zauważono, że wydajność elektrody zależy od typu użytego środka powierzchniowo czynnego i od jego stężenia. Najlepszą wydajność uzyskuje się dla surfaktantów o długich cząsteczkach. Podsumowując jednorodność rozkładu nanocząsteczek ma kluczowy wpływ na wydajność elektrody, a jednorodność dyspersji można uzyskać stosując odpowiedni surfaktant (Hintennach i Novák 2009).

Wytwarzanie materiałów mezoporowatych

Otrzymywanie materiałów mezoporowatych opiera się na metodzie zol – żel. Tą metodę można połączyć z metodą templatowania, czyli dodatku surfaktantu o odpowiedniej długości łańcucha. Dzięki temu otrzymane pory będą miały pożądaną rozmiar. Metoda templatowania polega na interkalacji materiału krzemionkowego, na powierzchni tworzących się micel. Surfactant działa na dwa sposoby. W pierwszym przypadku tworzy matrycę wokół, której kondensuje się krzemionka. Tworzą się w ten sposób struktury sześciennie, heksagonalne i lamelarne. Jest to metoda matrycowa –LCT (Vartuli i in. 1994). W drugim zwanym Warstwowym Systemem Krzemionkowym, surfaktant pełni funkcję pęcznienia i oddzielania warstw. W końcowym etapie usuwa się surfaktant przez ekstrakcję lub kalcynację. Co skutkuje utworzeniem regularnych porów o wielkości usuniętego surfaktantu.

Produkcja środków dezynfekujących

Wiele bakterii i grzybów wpływa negatywnie na zdrowie człowieka. Dlatego ich kontrolowany rozwój jest bardzo ważny. W wielu dziedzinach (przemśle spożywczym, rolnictwie, przemyśle farmaceutycznym czy gospodarstwie domowym) do zwalczania mikroorganizmów chorobotwórczych stosuje się środki dezynfekujące.

Jako środki dezynfekujące przede wszystkim wykorzystywane są surfaktanty kationowe. Działają one na bakterie gram – dodatnie, gram – ujemne i grzyby.

Ich skuteczność rozpatruje się w wytwarzanym przez nie dodatnim ładunku. Patogenne błony komórek bakteryjnych mają ładunek ujemny. Dzięki temu ułatwiona jest interakcja między błoną bakteryjną, a surfaktantem. Co skutkuje dobrą aktywnością bakteriobójczą mikroorganizmów. Mechanizm zniszczenia drobnoustroju patogennego polega na adsorpcji surfaktantu na błonie komórkowej, co zwiększa jej hydrofobowość, a więc przepuszczalność dla surfaktantu (Badawi i in. 2007). Doprowadza to do zakłócenia reakcji biologicznych zachodzących wewnątrz komórek. Aktywność bakteriobójcza zależy od długości łańcucha hydrofobowego, właściwości międzyfazowych, przeciwjonu wytworzonego przez surfaktant oraz gatunku bakterii.

Poprawa rozpuszczalności leków

Surfactanty mogą zwiększać rozpuszczalność trudno rozpuszczalnych lub nierozpuszczalnych leków w wodzie w procesie solubilizacji. Obecność miceli wpływa na rozpuszczalność stałych postaci leków tj. tabletki, kapsułki poprzez kontrolowanie wytrącania czy zwiększenie przepuszczalności membrany (Tadros 2005). Obniżone napięcie powierzchniowe leku umożliwia jego penetrację przez wodę i dzięki temu szybszy rozpad. Szybkość rozpadu leku zależy od jego pola powierzchni. Jednak bardzo wysokie stężenia środka powierzchniowo czynnego (powyżej wymaganego do rozpuszczenia) mogą zmniejszać wchłanianie leku przez zmniejszenie

potencjału chemicznego. Środki powierzchniowo czynne mają także możliwość zmieniania miejsca wiązania leku z receptorem.

3. Wnioski

Surfaktanty od lat są przedmiotem badań wielu naukowców. Odgrywają one ważną rolę w wielu procesach i są stosowane w dużej liczbie gałęzi przemysłu. Należy także zauważyć, że ciągle otrzymywane są nowe surfaktanty o zupełnie nowych właściwościach i możliwościach.

4. Literatura

- Attwood A, Florence A (1983) Solubilization. Surfactant Systems, their chemistry, pharmacy and biology: 229-292
- Badawi A, Mekawi M, Mohamed M, Mohamed A (2007) Surface and Biological Activity of Organoammonium Hydrogen Selenite Surfactants. Journal of Surfactants and Detergents 10: 257-267
- Biermann M, Lange F, Piorr R (1987) Synthesis of surfactants. Surfactants in consumer products: 23-132
- Chenier P (2002) Survey of Industrial Chemistry, Springer Science+Business Media, New York
- Dutkiewicz E (1998) Fizykochemia powierzchni, Wydawnictwo Naukowo Techniczne, Warszawa
- Eastoe J (2010) Surfactant Aggregation and Adsorption at Interfaces. Colloid Science: Principles, Methods and Applications, 2nd Edition, Wiley
- Hintennach A, Novák P (2009) Influence of surfactants and viscosity in the preparation process of battery electrodes containing nanoparticles. Physical Chemistry Chemical Physics 11: 9484-9488
- Janos P, Smidova V (2005) Effects of surfactants on the adsorptive removal of basic dyes from water using an organomineral sorbent-iron humate. Journal of Colloid and Interface Science 291: 19-27
- Krull R, Döpkens E (2004) Recycling of dyehouse effluents by biological and chemical treatment. Water Science and Technology 49: 311-317
- Lindman B, Wennerström H (1980) Micelles. Amphiphile aggregation in aqueous solution. Topics in Current Chemistry 87: 1-87
- Moroi Y (1992) Micellar Catalysis. Micelles: 195-196
- Moroi Y (1992) Surface Active Agents. Micelles: 8-11
- Pigoń K, Ruziewicz Z (2005) Chemia fizyczna Tom 1, PWN, Warszawa
- Piorr R (1987) Structure and Applications of Surfactants. Surfactants in consumer products: 5-22
- Rosen MJ (2004) Surfactants and Interfacial Phenomena, John Wiley & Sons, Hoboken
- Tadros T (2005) Applied Surfactants: Principles and Applications, Wiley, Weinheim
- Vartuli J, Kresge C, Leonowicz M, Chu A, McCullen S, Johnson I, Shepperd E (1994) Synthesis of Mesoporous Materials: Liquid-Crystal Templating versus Intercalation of Layered Silicates, American Chemical Society 11:2070-2077
- Zieliński R (2009) Surfaktanty – budowa, właściwości, zastosowania, Wydawnictwo Uniwersytetu Ekonomicznego we Wrocławiu

22. Alkaloidy – budowa, właściwości i zastosowania

Alkaloids – structure, properties and applications

Szaniawska Magdalena

Katedra Zjawisk Międzyfazowych, Instytut Nauk Chemicznych, Wydział Chemii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

Opiekun naukowy: dr hab. Katarzyna Szymczyk, prof. UMCS

Szaniawska Magdalena: magdalena.szaniawska@poczta.umcs.lublin.pl

Słowa kluczowe: substancje biologicznie aktywne, wtórne metabolity roślinne

Streszczenie

Spośród wielu klas naturalnie występujących związków organicznych, takich jak węglowodany, lipidy, białka, aminokwasy, antocyjany, flawonoidy i steroidy, tą, która wydaje się być wyjątkowa, są alkaloidy. Co czyni je wyjątkowymi? Pochodzą z aminokwasów i mogą być syntetyzowane jako metabolity wtórne przez rośliny i niektóre zwierzęta. Związki te odgrywają ważną rolę w organizmach żywych. Alkaloidy są metabolitami wtórnymi, wykazującymi silne działanie biologiczne na organizmy żywe już w bardzo małych dawkach. Alkaloidy są obecne nie tylko w codziennym życiu ludzi w żywności i napojach, ale także jako leki pobudzające. Wykazują działanie przeciwzapalne, przeciwnowotworowe, przeciwbólowe, miejscowe znieczulające i przeciwbólowe, przeciwbakteryjne, przeciwgrzybicze i wiele innych. Alkaloidy są stosowane jako składniki diety, suplementy i farmaceutyki, w medycynie i innych zastosowaniach w życiu człowieka. Alkaloidy są również ważnymi związkami w syntezie organicznej do poszukiwania nowych związków półsyntetycznych i syntetycznych o możliwie lepszej aktywności biologicznej niż związki macierzyste.

1. Wstęp

Słowo alkaloid (od arabskiego *al-kali* - potaż i od greckiego *eidos* - postać) oznacza „przybiera postać zasady” lub „zasadopodobny”. Mianem alkaloidów określa się grupę związków organicznych, przeważnie pochodzenia roślinnego (rzadko zwierzęcego), lub syntetycznego, które zawierają w cząsteczce atom (lub atomy) azotu najczęściej w pierścieniach heterocyklicznych. Ze względu na obecność azotu, większość alkaloidów wykazuje charakter zasadowy, chociaż znane są obecne substancje o odczynie słabo kwaśnym lub obojętny, np.: kolchicina, kapsaicyna. Alkaloidy wykazują silnie oddziaływanie fizjologiczne na organizmy ludzkie i zwierzęce, od stymulującego, poprzez narkotyczne, po toksyczne (Aniszewski 2007, Begley 2009, Brossi 1989).

Zazwyczaj są to substancje stałe o budowie krystalicznej, za wyjątkiem nikotyny, która jest bezbarwną, lotną cieczą. Nikotyna na powietrzu łatwo ulega utlenieniu i zmienia barwę na brunatną. Alkaloidy mają gorzki smaku, są optycznie czynne, trudno rozpuszczają się w wodzie. Łatwo łączą się z występującymi w soku komórkowym kwasami organicznymi dając sole rozpuszczalne, które tworzą roztwory wodne.

Pierwszą substancję tego typu odkrył w 1805 r. aptekarz Serturmer, otrzymując morfinę z opium. Zainicjowało to poszukiwania podobnych związków chemicznych w innych surowcach roślinnych. Kolejne wyizolowane związki to: emetyna (Pelletier, 1817 r.), strychnina (Pelletier i Caventou, 1818 r.), brucyna (Pelletier i Caventou, 1819 r.), chinina i cinchonina (Pelletier i Caventou, 1820 r.), koniina (Giesecke, 1827 r.), atropina (Mein, 1831 r.).

Nazwy alkaloidów pochodzą zazwyczaj od nazw roślin, z których zostały wyodrębnione. Często też nazwa nawiązuje do oddziaływania danego związku na organizm, jak np.: morfina (od greckiego boga snu Morfeusza) (Aniszewski 2007, Begley 2009, Brossi 1989, Dewick 2002, Fattorusso i Tagliatela-Scafati 2008).

2. Opis zagadnienia i przegląd literatury

2.1 Występowanie

Jako nietypowe metabolity, wytwarzane są przez pewne rośliny makowate (*Papaveraceae*), motylkowate (*Papilionaceae*) bobowate (*Fabaceae*), jaskrowate (*Ranunculaceae*), psiankowate (*Solanaceae*) oraz niektóre grzyby (np.: *Claviceps purpurea*), paprotniki (np.: *Lycopodium*) oraz rośliny nagozalążkowe (np.: *Taxus*, *Ephedra*).

Alkaloidy występują w całej roślinie lub w poszczególnych jej częściach ale tworzą się zazwyczaj w asymilujących częściach i stąd przenoszą się do innych peryferyjnych części danej rośliny, gdzie zostają zmagazynowane. Najczęściej gromadzone są w liściach (kokaina, nikotyna), owocach (papaweryna, morfina), w nasionach (strychnina, brucyna), czasami w kwiatach, korzeniach, bulwach, a w przypadku drzew także w korze (chinina). Zwykle jedna roślina może zawierać więcej niż jeden alkaloid, np.: z mleczka makowego otrzymano 20 alkaloidów, z liści tytoniu 10, z liści koki 7, a z kory chinowej 24. Związki te wykazują podobne właściwości, zarówno pod względem chemicznym, jak i fizjologicznym.

Zawartość alkaloidów w surowcu roślinnym waha się od ilości śladowych, rzędu ułamka procenta (np.: w liściach lukla czarnego) do 10% masy suszu roślinnego (np.: chinina w korze chinowca). Zawartość ta nie jest stała i może zależeć od wieku rośliny, pory roku, pory dnia, regionu, warunków klimatycznych oraz odmiany rośliny. Niesprzyjająca pogoda w okresie wegetacyjnym, jak również niewłaściwe przechowywanie surowca, mogą przyczynić się do wzrostu zawartości poszczególnych związków w tkankach roślinnych (Gelger i in. 1988, Kołodziejczyk 2013).

Wśród zwierząt związki typu alkaloidów stwierdzono u owadów, np.: biedronek i motyli, salamander, niektórych żab i wijów. Do najbardziej znanych należą np.: samandryna u *Salamandra maculosa*, bufoteina u *Bufo bufo*, batrachotoksyna u *Phyllobates aurotenia*, histriionikotoksyna u *Dendrobates histrionicus*. U owadów są zazwyczaj pochodzenia wtórnego, pobierane z pokarmem stanowią ochronę przed drapieżnikami. Podobnie u płazów, które nabywają tego typu związki zjadając na przykład owady (Kołodziejczyk 2013).

W stanie naturalnym alkaloidy najczęściej występują w postaci soli z kwasami organicznymi tj.: kwas jabłkowy, kwas cytrynowy, kwas szczawiowy, kwas bursztynowy lub kwasami garbnikowymi, rzadziej z kwasem propionowym, mlekowym, furanowym, octowym. Występują również w postaci soli z kwasami nieorganicznymi - kwasem fosforowym i siarkowym oraz kwasami specyficznymi dla danego alkaloidu, np.: kwas chinowy lub kwas tropowy. Znane są alkaloidy, które występują w warunkach naturalnych w postaci estrów, np.: rezerpina, kokaina oraz w postaci glikozydów w *Solanum* i *Veratrum* (Kołodziejczyk 2013).

Różnorodność budowy chemicznej alkaloidów świadczy o braku jednorodnego mechanizmu biosyntezy. Produktami wykorzystywanymi do syntezy dla wielu alkaloidów są naturalne aminokwasy: L-lizyna, L-ornityna, L-tyrozyna i L-tryptofan.

2.2 Biosynteza i otrzymywanie alkaloidów

Wielka różnorodność alkaloidów powoduje, że nie ma jednego, ustalonego mechanizmu ich wytwarzania, ani, że nie spełniają one jednolitej podstawowej funkcji w roślinach, w których są wytwarzane. Wiele alkaloidów ma jednak ze sobą pewne cechy wspólne, głównie ze względu na substraty, które służą do ich otrzymywania. Za przykład można tutaj podać benzyloetetrahydroizochinolinę, która powstaje w wyniku kondensacji dwóch cząsteczek fenyloalaniny. Cząsteczka ta jest substratem w biosyntezie ponad dwóch tysięcy alkaloidów (Kołodziejczyk 2013).

Bardzo ważną rolę w biosyntezie alkaloidów odgrywają aminokwasy, szczególnie aminokwasy białkowe. Z fenyloalaniny, tryptofanu i lizyny można otrzymać blisko pięć tysięcy alkaloidów. Na uwagę zasługuje także fakt, że jedna roślina może wytwarzać wiele związków o podobnej budowie, np. drzewo chinowe wytwarza ponad 20 alkaloidów, z których każdy zawiera układy chinolinowe i chinuklidynowe. Zdarzają się jednak też takie rośliny, w których wytworzone alkaloidy mają bardzo odmienną budowę, albo takie, które wytwarzają tylko jeden związek alkaloidowy – dla przykładu można podać rącznik wytwarzający rycyninę (Kołodziejczyk 2013).

Istnieje wiele sposobów pozyskiwania alkaloidów z materiału roślinnego. Znakomita większość tych metod wykorzystuje zasadowy charakter tych związków, co umożliwia oddzielenie ich od tych kwasowych i obojętnych, takich jak cukry, węglowodory, białka czy tłuszcze. Najpierw drobno zmielony surowiec roślinny poddaje się działaniu zasad, np. amoniaku czy węgla sodu. Alkaloidy uwalniane z soli ekstrahuje się rozpuszczalnikami organicznymi, takimi jak chloroform czy dichloroetan, a następnie reekstrahuje z warstwy organicznej do wody zakwaszonej kwasem solnym albo siarkowym. Tak otrzymany produkt należy na nowo zalkalizować, co spowoduje wytrącenie „surowych” alkaloidów, które następnie są oczyszczane przez krystalizację. Niektóre alkaloidy tworzą trudno rozpuszczalne sole lub kompleksy z taniną, heksacyjanożelazianem(II) potasu, chlorkiem platyny, czy kwasem fosforomolibdenowym.

Jeszcze inna metoda pozyskiwania alkaloidów z surowców roślinnych polega na ich ekstrakcji wodnymi lub alkoholowymi roztworami kwasów. Następnie kwaśne, wodne roztwory przemywa się rozpuszczalnikiem organicznym w celu usunięcia substancji obojętnych.

Niektóre alkaloidy lotne, np. nikotynę można wydzielić w procesie destylacji z parą wodną. Bardzo często w procesach pozyskiwania czy oczyszczania alkaloidów stosuje się także żywice jonowymiennie (wodny roztwór surowca przepuszcza się przez złożę kationitu, a następnie związany alkaloid wymywa się amoniakiem) (Aniszewski 2007, Kołodziejczyk 2013).

2.3 Podział alkaloidów

Bogactwo alkaloidów oraz ich różnorodność stworzyły potrzebę opracowania dla nich odpowiedniej klasyfikacji, którą można przeprowadzić w oparciu o kilka poniższych kryteriów.

Klasyfikacja na podstawie pochodzenia

Zanim dokładnie poznano budowę alkaloidów, stosowano podział, którego główne kryterium oparte było na źródłach pozyskiwania tych substancji. Nazwa rośliny, z której wyizolowano surowiec, stawała się nazwą grupy, np.: alkaloidy makowe, alkaloidy chinowe, alkaloidy ciemniźnicy, alkaloidy szaleja itp. Obecnie taki podział stosowany jest do określania rodzin alkaloidów ponieważ zazwyczaj w jednej roślinie występuje cała grupa związków o podobnej lub nawet różnej budowie (Kohlmunzer 2003).

Klasyfikacja biogenetyczna

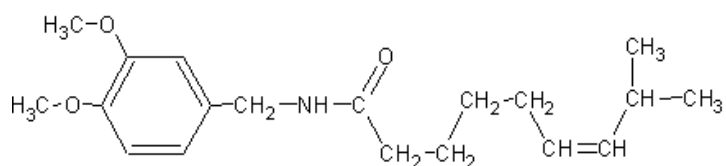
W klasyfikacji biogenetycznej podstawę podziału stanowi sposób powstawania alkaloidów (Nowacki i Nowacka 1965). Opierając się na poglądach Hegnauera wyróżnia się trzy grupy alkaloidów:

- a) protoalkaloidy,
- b) pseudoalkaloidy,
- c) alkaloidy właściwe (Kohlmunzer 2003)

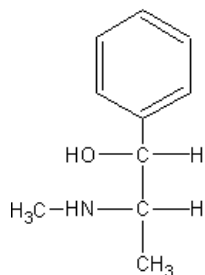
W protoalkaloidach atom azotu znajduje się w łańcuchu bocznym, poza układem heterocyklicznym. Powstają z aminokwasów lub amin biogennych. Należą do nich np.: fenyloalkiloaminy (efedryna, kapsaicyna), indoloalkiloaminy (tryptamina, serotonina), betaniny (betaina).

Pseudoalkaloidy nie są pochodnymi aminokwasów, atom azotu nie pochodzi od aminokwasów, lecz jest wbudowany na drodze biosyntezy do istniejącego szkieletu. Do tej grupy zalicza się alkaloidy diterpenowe (akonityna, pakliteksel), pochodne steroidowe (solasodyna) oraz związki, w których fragment azotowy powstaje np.: poprzez podstawienie grupy hydroksylowej grupą aminową, np.: w kolchicynie (Matławska 2008).

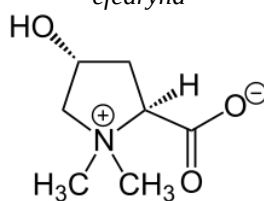
W alkaloidach właściwych atom azotu znajduje się w pierścieniu heterocyklicznym. Według klasyfikacji biogennej stanowią najliczniejszą grupę alkaloidów. Powstają na drodze biosyntezy z aminokwasów, tj.: ornityna (alkaloidy tropanowe, pirolizydynowe), lizyna (chinolizydynowe), histydyna (imidazolowe, purynowe), tyrozyna (izochinolinowe), tryptofan (indolowe) oraz amin biogennych (alkaloidy pirydynowe, piperidynowe oraz niektóre chinolinowe, pochodne benzazepiny) (Kafarski i Lejczak 1994).



kapsaicyna

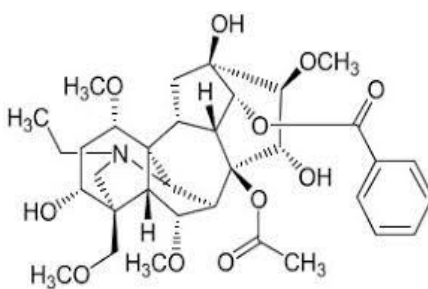


efedryna

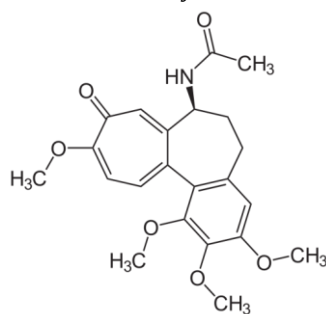


betaina

Rys. 1. Wzory chemiczne wybranych protoalkaloidów.

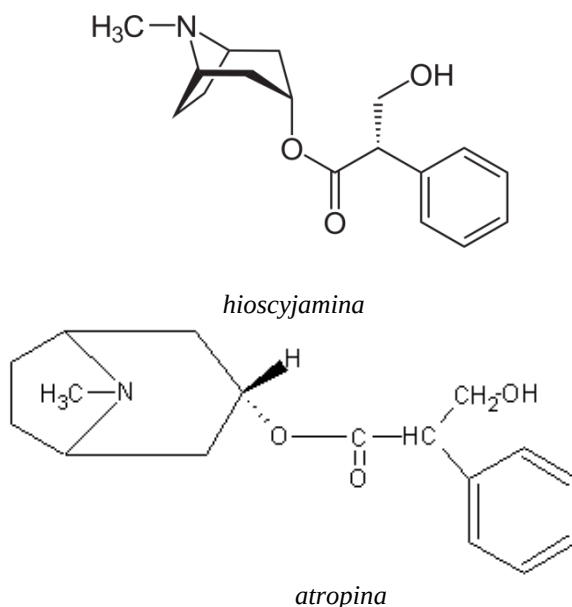


akonityna



kolchicyna

Rys. 2. Wzory chemiczne wybranych pseudoalkaloidów.



Rys. 3 Wzory chemiczne wybranych alkaloidów właściwych.

Klasyfikacja chemiczna

Najbardziej powszechną i jednocześnie najczęściej przedstawianą w literaturze jest klasyfikacja alkaloidów oparta na podziale ze względu na strukturę chemiczną. Biorąc pod uwagę budowę pierścienia heterocyklicznego, wyróżniono następujące główne grupy (Rys. 4).

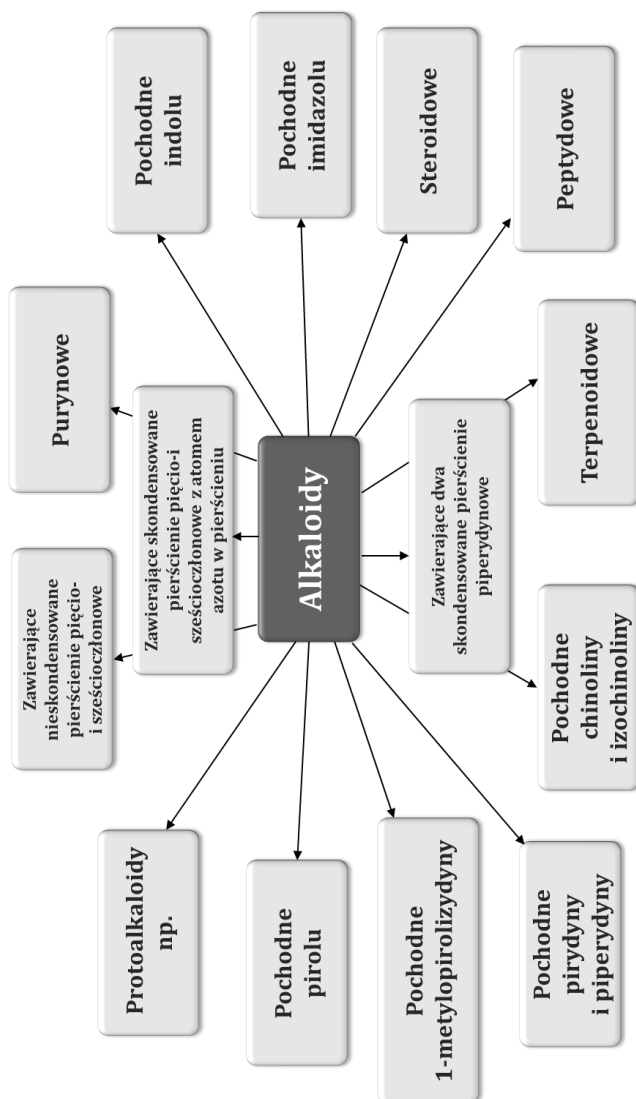
2.4 Zastosowanie w medycynie

Właściwości lecznicze alkaloidów są dość zróżnicowane. Morfina jest silnym środkiem odurzającym stosowanym w łagodzeniu bólu, chociaż jej uzależniające właściwości ograniczają jej przydatność. Kodeina, pochodna morfiny eteru metylowego znajdująca się w maku lekarskim, jest doskonałym środkiem przeciwbólowym, który jest stosunkowo mało uzależniający. Niektóre alkaloidy działają jako stymulatory serca lub układu oddechowego. Chinidyna, uzyskiwana z roślin z rodzaju *Cinchona*, jest stosowana w leczeniu arytmii lub nieregularnych rytmów bicia serca. Wiele alkaloidów wpływa na oddychanie, ale w skomplikowany sposób, tak że ciężka depresja oddechowa może następować po stymulacji. Lobelina narkotyków (od *Lobelia inflata*) jest pod tym względem bezpieczniejsza i dlatego jest przydatna klinicznie. Ergonowina (z grzyba *Claviceps purpurea*) i efedryna (z gatunku *Ephedra*) działają jak środki zwężające naczynia krwionośne. Ergonowina jest stosowana w celu zmniejszenia krwotoku z macicy po porodzie, a efedryna służy do łagodzenia dyskomfortu przeziębienia, zapalenia zatok, kataru siennego i astmy oskrzelowej (Kołodziejczyk 2003).

Wiele alkaloidów ma właściwości znieczulenia miejscowego, chociaż klinicznie rzadko są one stosowane do tego celu. Kokaina (z *Erythroxylum coca*) jest bardzo silnym znieczuleniem miejscowym. Chinina (z gatunku *Cinchona*) jest silnym środkiem przeciwmalarycznym, który wcześniej był lekiem z wyboru w leczeniu tej choroby, choć w dużej mierze został zastąpiony przez mniej toksyczne i bardziej skuteczne leki syntetyczne. Alkaloid tubokuraryna jest aktywnym składnikiem południowoamerykańskiej trucizny strzała, curare (uzyskanej z *Chondrodendron tomentosum*) i jest stosowana jako środek rozluźniający mięśnie w chirurgii. Dwa alkaloidy, winkrystyna i winblastyna (z *Catharanthus roseus*, dawniej *Vinca rosea*), są szeroko stosowane jako środki chemioterapeutyczne w leczeniu wielu rodzajów raka.

Nikotyna uzyskiwana z tytoniu (*Nicotiana tabacum*) jest głównym alkaloidem i głównym uzależniającym składnikiem tytoniu palonego w papierosach, cygarach i fajkach. Niektóre alkaloidy

to nielegalne narkotyki i trucizny. Należą do nich halucynogenne leki meskalina (z gatunku *Lophophora*) i psilocybina (z *Psilocybe mexicana*). Syntetyczne pochodne alkaloidów morfiny i kwasu lizergowego (z *Claviceps purpurea*) wytwarzają odpowiednio heroinę i LSD. Alkaloidowa stożek jest aktywnym składnikiem zatrutego szalika (*Conium maculatum*). Strychnina (z gatunku *Strychnos*) to kolejna silna trucizna (Kołodziejczyk 2003).



Rys. 4. Klasyfikacja chemiczna alkaloidów.

2.1 Zastosowanie alkaloidów w kosmetykach

Alkaloidy oprócz właściwości leczniczych wykazują także działanie pielęgnujące skórę. Najczęściej wykorzystywanym alkaloidem w przemyśle kosmetycznym jest kofeina. To alkaloid purynowy pozyskiwany z nasion krzewu kawowego *Coffea arabica*. Kofeina reguluje przemianę materii, a także wspomaga usuwanie złogów tłuszczu, a poprzez drenaż tkanek działa detoksykująco, oczyszczająco, a także wyszczuplająco. Poprawia krążenie krwi, zwiększa sprężystość tkanek skórnych, nadaje skórze miękkość i elastyczność. Kofeina ze względu na swoje działanie stosowana jest w preparatach wyszczuplających i antycellulitowych (Czerpak i Jabłońska-Trypuć 2008).

3. Wnioski

Alkaloidy to związki, które z jednej strony budzą podziw ze względu na swoje lecznicze działanie, ale z drugiej także niepokój przez swoje narkotyczne, uzależniające i trujące działanie. Współcześni badacze z wielką nadzieją patrzą na zastosowanie tych związków jako potencjalne leki np. przeciwnowotworowe. Biorąc pod uwagę powszechność występowania alkaloidów w świecie roślin, mogą być one więc ekonomicznie racjonalnym zasobem leków dla wielu kolejnych pokoleń – zwłaszcza w kontekście chorób nowotworowych i cywilizacyjnych.

4. Literatura

- Aniszewski, Tadeusz (2007) *Alkaloids – secrets of life.*, Elsevier, Amsterdam
- Begley TP (2009) *Encyclopedia of Chemical Biology*, Wiley: 1569–1570
- Brossi A (1989) *The Alkaloids: Chemistry and Pharmacology*, Academic Press
- Czerpak R, Jabłońska-Trypuć A (2008) *Roślinne surowce kosmetyczne*, MedPharm, Wrocław
- Dewick PM (2002) *Medicinal Natural Products. A Biosynthetic Approach*, Second Edition, Wiley
- Fattorusso E, Tagliatella-Scafati O (2008) *Modern Alkaloids: Structure, Isolation, Synthesis and Biology*, Wiley-VCH
- Gelger van WMJ, Winke JH, Scheffer JJC (1988) Steroidal glycoalkaloids in tubers and leaves of *Solanum* species used in potato breeding. *Euphytica* 37S: 147-158
- Kafarski P, Lejczak B (1994) *Chemia bioorganiczna*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa
- Kohlmunzer S (2003) *Farmakognozja*. PZWL, Wydawnictwo Lekarskie, Warszawa
- Kołodziejczyk A (2013) *Naturalne związki organiczne*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa
- Matławska I (2008) *Farmakognozja*, Wydawnictwo UM, Poznań
- Migas P, Heyka M (2011) Glistnik jaskółcze ziele (*Chelidonium majus* L.) we współczesnej terapii – wskazania i bezpieczeństwo stosowania. *Postępy Fitoterapii* 3: 208-218
- Nowacki E, Nowacka D (1965) Biogenetyczna klasyfikacja alkaloidów. *Wiadomości Botaniczne* 9: 2007-2016