

mgr inż. Jacek Łuczyński

Aminoestry kwasów tłuszczowych jako substancje lizosomotropowe

PRACA DOKTORSKA

Zakład Technologii Przemysłu Organicznego
Instytut Technologii Organicznej i Tworzyw Sztucznych
Politechnika Wrocławska

Promotor: prof. dr inż. Stanisław Witek

Recenzenci: prof. dr inż. Jan Legocki, Instytut Przemysłu Organicznego, Warszawa
prof. dr hab. inż. Juliusz Pernak, Politechnika Poznańska

WROCŁAW 2000

Gorące podziękowania składam Panu Profesorowi **Stanisławowi Witkowi** – Promotorowi mojej pracy doktorskiej. Realizacja tej pracy i jej zakończenie było możliwe dzięki ogromnemu zaangażowaniu Profesora. Potrafił zarazić mnie swoim entuzjazmem, z jakim od lat poświęca się badaniom nad związkami biologicznie czynnymi. Na każdym etapie prowadzonych przeze mnie badań służył mi radą i pomocą, a w chwilach zniechęcenia dodawał otuchy. Dzięki niezwyklej życzliwości Pana Profesora realizacja postawionego przede mną zadania przebiegała w wyjątkowo serdecznej atmosferze.

SPIS TREŚCI

1.	WPROWADZENIE	1
2.	PRZEGLĄD PIŚMIENNICTWA	3
2.1.	Związki amoniowe jako substancje biologicznie czynne	3
2.2.	Substancje lizosomotropowe	7
2.3.	Funkcje lizosomów	8
2.4.	Sposoby wnikania związków lizosomotropowych do lizosomów ...	9
2.5.	Sposoby działania substancji lizosomotropowych	11
2.6.	Zastosowania związków lizosomotropowych	13
2.7.	Struktura i funkcje błony biologicznej	17
2.8.	Hemoliza erytrocytów	20
3.	ZAŁOŻENIA I CEL PRACY	22
4.	METODYKA BADAŃ	24
4.1.	Stosowane metody analityczne	24
4.2.	Synteza związków	24
4.2.1.	Synteza estrów 2-dimetyloaminoetylowych kwasów tłuszczowych o różnej długości łańcucha alkilowego (DM-n) ...	25
4.2.2.	Synteza soli czwartorzędowych pochodnych estrów 2-dimetyloaminoetylowych kwasów tłuszczowych	28
4.2.3.	Synteza estrów 2-aminoetylowych kwasów tłuszczowych różnie podstawionych przy atomie azotu	29
4.3.	Synteza pozostałych pochodnych	31
4.3.1.	Synteza estrów imidazoloetylowych kwasów tłuszczowych	32
4.3.2.	Synteza pochodnych pirolidyny	35
4.3.2.1.	Synteza n-alkilopochodnych (PYL-n)	35
4.3.2.2.	Synteza soli czwartorzędowych (metylobromków) pochodnych związków PY-11 i PYL-12	36
4.3.2.3.	Synteza benzoesanów 2-aminoetylowych	37

4.4.	Badania fizykochemiczne	38
4.4.1.	Wyznaczanie stałych dysocjacji kwasowej (pK_a)	38
4.4.2.	Wyznaczanie krytycznego stężenia micelnego z pomiarów przewodnictwa	38
4.4.3.	Hydrolityczny rozkład aminoestrów	39
4.5.	Badania biologiczne	42
4.5.1.	Hamowanie wzrostu drożdży piekarniczych <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	42
4.5.2.	Pomiar zdolności inhibicji aktywności H^+ -ATPazy błony komórkowej drożdży <i>in vitro</i>	43
4.5.3.	Inhibicja H^+ -ATPazy błony komórkowej drożdży <i>in vivo</i> ...	44
4.5.4.	Badania hemolityczne	44
4.5.5.	Badania fluorymetryczne (określenie płynności błony erytrocytów)	45
4.5.6.	Określenie aktywności przeciwgrzybiczej	45
4.5.7.	Aktywność bakteriobójcza	46
5.	WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA	47
5.1.	Zdolność hamowania wzrostu drożdży <i>Saccharomyces cerevisiae</i> przez aminoestry DM-n	48
5.2.	Wpływ aminoestrów DM-n na aktywność H^+ -ATPazy błony komórkowej drożdży	55
5.3.	Aktywność hemolityczna związków DM-n	59
5.4.	Wpływ związków serii DM-n na płynność błony erytrocytów	61
5.5.	Wpływ podstawienia atomu azotu aminoestrów na ich aktywność	62
5.5.1.	Hamowanie wzrostu drożdży przez serię związków o łańcuchu zawierającym 11 lub 13 atomów węgla	62
5.5.2.	Wpływ aminoestrów zawierających 11 lub 13 atomów węgla w łańcuchu alkilowym na aktywność H^+ -ATPazy błony komórkowej drożdży	64
5.5.3.	Aktywność hemolityczna laurynianów aminoetylowych	65
5.5.4.	Wpływ laurynianów na płynność błony erytrocytów	66
5.6.	Estry 2-imidazoloetylowe kwasów tłuszczowych IM-n	67

5.7.	Badania biologiczne alkilopochodnych pirolidyny PYL-n	70
5.8.	Wartości stałych dysocjacji kwasowej pK_a	73
5.9.	Właściwości powierzchniowoczynne wybranych aminoestrów i soli czwartorzędowych	76
5.10.	Określenie aktywności fungicydowej dla wybranych drożdżopodobnych mikroorganizmów	77
5.11.	Aktywność bakteriobójcza wybranych związków	78
6.	PODSUMOWANIE WYNIKÓW I WNIOSKI	80
7.	PIŚMIENNICTWO CYTOWANE	83

PUBLIKACJE ZWIĄZANE Z ROZPRAWĄ DOKTORSKĄ

1. S.Witek, A.Goffeau, J.Nader, J.Łuczyński, T.M.Lachowicz, B.Kuta, E.Obłąk; *Lysosomotropic Aminosteres Act as H^+ -ATPase Inhibitors in Yeast.*; **Folia Microbiol.**, 1997, **42**, 252.
2. T.M.Lachowicz, S.Witek, J.Łuczyński, R.Witkowska, H.Kleszczyńska, S.Przestalski; *N-Substituted Aminoethylesters of Fatty Acids as Lysosomotropic Substances.*; **Folia Microbiol.**, 1997, **42**, 231.
3. H.Kleszczyńska, J.Łuczyński, S.Witek, S.Przestalski; *Effect of Some Lysosomotropic Substances on Erythrocytes Membrane*; **Polish J.Environ.Studies**, 1997, **6**, 21.
4. J.Kuczera, S.Witek, T.Kral, J.Hładyszowski, J.Łuczyński, S.Przestalski; *Influence of Some Lysosomotropic Compounds on Calcium Ion Desorption Process from Lyposome Membrane.*; **Z.f.Naturforsch.**, 1998, **53c**, 389
5. T.M.Lachowicz, A.Krasowska, J.Łuczyński, S.Witek; *Plasma Membrane H^+ -ATPase Activity in Wild Type and Mutants of Yeast *Saccharomyces cerevisiae* Treated by Some Lysosomotropic Drugs*; **Folia Microbiol.**, 1998, **43**, 201
6. S.Witek, M.Kończkowski, T.M.Lachowicz, A.Kończkowska, J.Łuczyński, A.Goffeau; *The Soft Lysosomotropic Compound as New Substrates of the Yeast PDR Network.*; **Folia Microbiol.**, 1998, **43**, 214
7. H.Kleszczyńska, J.Łuczyński, S.Witek, S.Przestalski; *Hemolytic Activity of Aminoethyl-dodecanoates*; **Z.f.Naturforsch.**, 1998, **53c**, 101
8. M.Kończkowski, A.Kończkowska, J.Łuczyński, S.Witek, A.Goffeau, *In Vivo Characterization of the Drug Resistant Profile of the Major ABC Transporters and Other Components of the Yeast Pleiotropic Drug Resistance Network*, **Microb.Drug Resistance**, 1998, **4**, 143-157

1. WPROWADZENIE

Poszukiwanie związków biologicznie czynnych, stosowanych w zwalczaniu czynników chorobotwórczych roślin, zwierząt i człowieka stało się koniecznością w obliczu szerzenia się wielu groźnych chorób i rosnącej oporności drobnoustrojów na skuteczne do niedawna środki. Szczególnie trudne do zwalczenia są zakażenia grzybami, których częstość występowania w ciągu kilku ostatnich lat dramatycznie wzrosła [1].

Racjonalne szukanie środków biologicznie czynnych polega na takim projektowaniu struktury związku, aby oddziaływał on z wybranym receptorem biologicznym. Substancję taką znajduje się zwykle przez optymalizację jej struktury, tak by wykazywała najbardziej korzystne właściwości. Oczywiście z góry zakłada się jej możliwości biologicznego oddziaływania, lecz obecny stan wiedzy w dziedzinach biologii i biochemii jeszcze nie pozwala na dokładne przewidywanie działania dowolnych związków chemicznych na komórki, a tym bardziej na całe organizmy.

Szansa dobrego zaprojektowania struktury o założonej aktywności pojawia się wówczas, gdy działanie biologiczne rozpatruje się na poziomie molekularnym. Jedną ze struktur komórkowych najbardziej eksponowanych na działanie związków chemicznych są błony komórkowe. Związki mogą oddziaływać z błoną specyficznie poprzez receptory białkowe, w tym również enzymy, lub niespecyficznie przez nieswoiste interakcje z lipidami błonowymi.

Szczególnie silnie oddziałują z błoną substancje o charakterze amfifilowym. Związki amfifilowe posiadają w swojej cząsteczce dwie wydzielone części: hydrofilową (lipofobową) i hydrofobową (lipofilową). Miejsc, na które mogą oddziaływać związki amfifilowe jest w błonie komórkowej dużo, głównie jednak substancje te lokują się w części lipidowej błony. Następstwami wbudowywania się cząsteczek amfifilu w błonę może być tworzenie się domen lipidowych [2], modulowanie właściwości fosfolipidów [3], czy też tworzenie struktur niewarstwo-

wych w błonie [4]. W stężeniach sublitycznych związki amfifilowe wywołują zmiany w fizycznych właściwościach błony, np. powiększenie powierzchni błony, a co za tym idzie – obniżenie wrażliwości osmotycznej komórek, ale także stabilizację błony i obniżenie jej wrażliwości na proces lizy osmotycznej i mechanicznej [5]. Związki amfifilowe mogą również wpływać na transport przez błonę, a w stężeniach przedlitycznych podnosić przepuszczalność dla wody, jonów i cząsteczek obojętnych o niskiej masie cząsteczkowej [6]. Wbudowując się do błony, związki amfifilowe mogą powodować pośrednio lub bezpośrednio zmiany aktywności enzymów błonowych [7].

Praca niniejsza poświęcona jest substancjom lizosomotropowym oraz ich oddziaływaniu na błony biologiczne i procesy transportowe przez błony. Tym zagadnieniom poświęcony jest następny rozdział, w którym omawiam doniesienia literaturowe dotyczące tego zakresu.

2. PRZEGLĄD PIŚMIENNICTWA

2.1. Związki amoniowe jako substancje biologicznie czynne.

Biologicznie czynne czwartorzędowe sole amoniowe (CSA) stanowią grupę związków amfifilowych o ogólnym wzorze $(R_1 R_2 R_3)N^+R_4X^-$ gdzie rodnik R_4 stanowi długi łańcuch alkilowy o różnej liczbie atomów węgla, a R_1, R_2, R_3 to m.in. grupy alkilowe: nasycone, nienasycone, rozgałęzione lub nie, cykliczne lub acykliczne, względnie alkiloaromatyczne [8]. Dodatnio naładowany atom azotu wraz z grupami alkilowymi stanowi hydrofilową część związku, natomiast łańcuch o różnej liczbie atomów węgla jest jego częścią hydrofobową.

Czwartorzędowe sole amoniowe charakteryzują się głównie działaniem przeciwbakteryjnym [8,9,10], a także wykazują właściwości grzybobójcze [11,12]. Zarówno grzybo- jak i bakteriobójcze właściwości omawianej grupy związków zależą od długości łańcucha alkilowego (najbardziej efektywny okazał się łańcuch zawierający od 11 do 14 atomów węgla), jak również od budowy polarnego fragmentu cząsteczki [13].

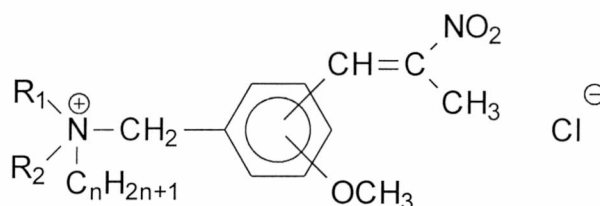
Wyizolowane z materiału biologicznego (bakteryjnego, roślinnego czy zwierzęcego), czwartorzędowe sole amoniowe (CSA), wykazują dużą i zróżnicowaną aktywność biologiczną. Występujące w naturze czwartorzędowe sole amoniowe stanowią grupę metabolitów składającą się z ponad 100 substancji, w tym tak znane jak cholina i glicynobetaina. Przeciwdziałają one głównie egzogennemu stresowi, to jednak szereg innych specyficznych funkcji przypisano poszczególnym członkom tej rodziny substancji [15]. Glicynobetaina, syntezowana przez rośliny wyższe [16], bakterie [17], glony [18] i zwierzęta [19] pełni rolę osmoregulacyjną; bierze także udział w transmetylacji fosfatydyloetanolaminy w komórkach wątrobowych ssaków [20] oraz hamuje metamorfozę jamochłonów [21].

Karnityna przenosi aktywowane kwasy tłuszczowe przez wewnętrzną błonę mitochondrialną i bierze udział w metabolizmie lipidów [22].

W związku z różnorodnością mechanizmów działania CSA pochodzenia naturalnego i szerokim jego spektrum, syntezywanie CSA o charakterze amfifilowym i różnej długości łańcucha alkilowego, wydaje się być interesujące zarówno pod względem praktycznym (zastosowanie nowych związków jako środków grzybo- i bakterio-bójczych), jak i poznawczym (szczegółowe poznanie mechanizmów działania).

Syntetycznie otrzymywane CSA wykazują działanie grzybo- i bakterio-bójcze, jeśli struktura cząsteczki jest strukturą kationowego surfaktantu, tj. jeśli związek ma charakter amfifilowy i składa się z polarnej, obdarzonej dodatnim ładunkiem główki i hydrofobowego łańcucha o odpowiedniej długości. Przykładem mogą być zsyntezowane wcześniej w naszym zespole czwartorzędowe sole amoniowe [23], u których wykazano działanie biologiczne, w stosunku zarówno do grzybów [24], glonów [12,25], jak i drożdży *Saccharomyces cerevisiae* [26,27,28].

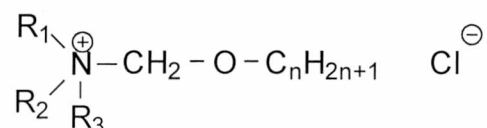
Szczególnie interesujące własności grzybobójcze wykazała grupa soli β -metylo- β -nitrowinylo-benzylo-amoniowych, przede wszystkim soli morfoliniowych o 12-to węglowym łańcuchu alkilowym, charakteryzujących się bardzo wysoką aktywnością w stosunku do *Alternaria tenuis*, a szczególnie wobec *Botrytis cinerea* [23].



Wykazano, że obecność podstawnika β -nitrowinylowego wpływa znacznie na aktywność grzybobójczą tych soli, a także wzmacnia ich oddziaływanie na błony biologiczne i modelowe oraz transport jonów siarczanowych i jonów wapnia przez te błony [29]. Autorzy wnioskuje, że układ nitrowinylo-benzyłowy powoduje głębszą inkorporację soli do lipidowej części błony, przez co następuje znacznie

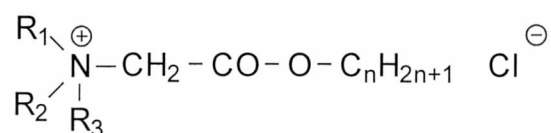
silniejsze zaburzenie jej struktury. Wykazano także iż sole nitrowinylo-benzyloamoniowe wpływają na transport aminokwasów, a przy odpowiednio wysokim stężeniu powodują dezintegrację błony drożdży *S.cerevisiae* i gwałtowny wypływ wewnętrznej puli aminokwasów z komórki [26].

Podobnie wysoką aktywność biologiczną stwierdzono u grupy chlorków alkoksymetylo-amoniowych o różnej budowie polarnej główki. Wykazały one



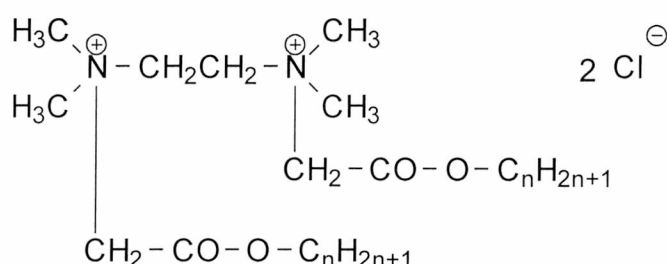
silne działanie grzybobójcze w stosunku do *A.tenuis* oraz *B.cinerea* na poziomie kilku ppm w teście laboratoryjnym. Szczególnie silnie aktywne były sole piperydyniowe i morfoliniowe z podstawnikiem dodecyloksymetylowym [23]. Próba zastosowania tych związków do zwalczania parcha jabłoniowego zakończyła się jednak niepowodzeniem, gdyż preparat zastosowany w stężeniu roboczym ok. 700 ppm wykazał wprawdzie dobrą skuteczność w zwalczaniu tego grzyba, jednak zaobserwowano uboczne działanie w postaci przebarwień owoców, a także znacznego opadania liści jabłoni. Chlorki alkoksymetylo-amoniowe hamują oddychanie komórek drożdżowych, regenerację protoplastów i tempo wzrostu *S.cerevisiae* [27].

Najbardziej zbliżone strukturalnie do aminoestrów, będących przedmiotem niniejszej rozprawy, były chlorki trimetyloamoniowe, pochodne estrów glicyny.



Wykazały one przydatność do zwalczania obrostów biologicznych w zamkniętych układach chłodniczych [12], a także dość dobre działanie

grzybobójcze, które było jednak nieco niższe niż dwu wcześniej omówionych grup CSA. Maksimum aktywności grzybobójczej, a także najsilniejsze oddziaływanie na błony obserwowano dla estrów n-dodecyłowych [30]. Sole pochodne estrów glicyny badane były później przez laboratoria szwedzkie jako „miękkie” biocydy do zwalczania salmonellozy, w szczególności do eliminacji bakterii z rodzaju *Salmonella* na jajach kurzych [31]. Wykazano również, że chlorek dodecylokarbonyloksymetylo-trimetyloamoniowy co najmniej dwukrotnie silniej hamował wzrost cytoplazmatycznych mutantów oddechowych drożdży *rho*⁻ i *rho*⁰ niż izogenicznego szczepu dzikiego. Analiza genetyczna mutantów opornych na ten związek wykazała znaczenie tła genetycznego dla stopnia wrażliwości [32].



Zsyntezowano również sole bis-amoniowe typu *gemini*, pochodne etylenodiaminy z podobnym podstawnikiem estrowym; strukturą przypominają one jak gdyby dimery poprzedniej grupy soli pochodnych glicyny. Sole bis-amoniowe wykazały silne działanie biologiczne; maksimum aktywności obserwowano jednak u *S.cerevisiae* dla krótszych łańcuchów, a ester di-n-oktyłowy okazał się najaktywniejszy [30].

Z prowadzonych badań [23] wynika, że działanie biologiczne CSA związane jest z ich oddziaływaniem na błony biologiczne i transport przez te błony [26,29,33], a w szczególności transport aminokwasów. Czwartorzędowe sole amoniowe hamują ogólną permeazę aminokwasową (*GAP*), a prawdopodobnie i inne permeazy [34]. Stwierdzono, że CSA wykazują w stosunku do mikroorganizmów działanie bójcze, a nie grzybostatyczne.

2.2. Substancje lizosomotropowe.

Substancje lizosomotropowe to pojęcie wprowadzone przez de Duve i współpracowników [35] dla określenia związków mogących swobodnie wnikać do komórki i zatężanych wielokrotnie w lizosomach komórek zwierzęcych lub w wakuolach komórek roślinnych (będących odpowiednikami lizosomów), mających najniższe pH spośród wszystkich organelli komórkowych.

Substancje lizosomotropowe to przede wszystkim słabe organiczne zasady, zazwyczaj trzeciorzędowe aminy o wartościach stałej dysocjacji kwasowej pK_a mieszczących się w granicach 5 – 9. Przy tych wartościach pK_a są one najszybciej transportowane do lizosomów. Po osiągnięciu lizosomu amina wychwytyjąc proton przechodzi w postać związku amfifilowego i - jeśli posiada odpowiednią strukturę - wykazuje własności kationowego surfaktantu oddziałując na błonę lizosomalną i białka błonowe. Równocześnie następuje podwyższenie wewnątrzlizosomalnego pH, nawet o 1.7 jednostki, co ma duży wpływ na procesy transportowe i zachowanie lizosomu [36].

Mechanizm, według którego substancje lizosomotropowe działają bójczo nie został jeszcze poznany. Istnieje prawdopodobieństwo, że są one reaktywne w stosunku do błon otaczających kwaśne przedziały komórkowe [37]. Efekty zachodzące w lizosomach poprzedzały co najmniej o 1 godzinę wszystkie inne symptomy cytotoksyczności w komórce, jak np. inhibicję syntezy RNA i białka, uwolnienie dehydrogenazy mleczanowej, wyciek związków niskocząsteczkowych z komórki. Świadczą one o tym, że dla związków lizosomotropowych lizosomy są pierwotnym, a nie wtórnym miejscem docelowym [38].

Lizosomotropowe aminy dyfundują przez plazmalemę w niejonizowanej formie, lecz kiedy dostają się do przedziałów komórkowych o niskim pH następuje ich protonowanie i przekształcenie w formę zjonizowaną – niezdolną do przenikania przez błony biologiczne [39].

Uważa się, że wewnątrz lizosomu substancje te przybierają postać kationowego surfaktantu i wbudowują się do błony lizosomów, zmieniając jej przepuszczalność, a przy odpowiednio wysokim stężeniu powodując jej zniszczenie. Wyływające zaś z lizosomu enzymy powodują samostrawienie się komórki.

Substancje lizosomotropowe mają bardzo różną strukturę. Wspólnym jej fragmentem jest atom azotu nadający cząsteczce słabo zasadowy charakter [40]. Zalicza się do nich m.in.: chlorek amonowy, ester metylowy L-leucyno-L-leucyny, N-dodecyloimidazol [41,42] czy też szereg znanych leków nasercowych. Działania terapeutycznego substancji lizosomotropowych w kuracji przeciwnowotworowej upatruje się w możliwości ułatwiania działania cytostatyków, opierając się na fakcie, że wewnątrzlizosomalne pH komórek nowotworowych jest o ok. 0.5 jednostki niższe niż komórek zdrowych [43]. Fakt ten może sprzyjać gromadzeniu się substancji lizosomotropowych głównie w komórkach nowotworowych [41,46]. Działanie tego typu substancji może polegać także na przeciwdziałaniu oporności wielolekowej (*MDR – multidrug resistance*), polegającej na wydalaniu antybiotyków czy cytostatyków z komórki [44]; obserwacje takie można znaleźć w piśmiennictwie [45]. Przeciwdziałanie tej oporności jest uważane za najważniejszy obecnie problem chemioterapii.

Do substancji lizosomotropowych zaliczyć także można szereg fungicydów stosowanych w ochronie roślin takich jak dodyna, alkilo-2,6-dimetylomorfoliny czy wreszcie pochodne triazolu i imidazolu.

Jednym ze związków lizosomotropowych jest N-dodecyloimidazol zsyntezowany przez Firestona [40]; N-dodecyloimidazol działa bójczo na komórki ssaków. Udowodniono silny związek między jego cytotoksycznością a unicestwianiem lizosomów [38]. Konsekwencją akumulacji związków lizosomotropowych jest też wzrost przepuszczalności błony lizosomalnej dla jonów i małych cząsteczek.

2.3. Funkcje lizosomów.

Lizosomy są małymi, wypełnionymi enzymami trawiennymi woreczkami, umiejscowionymi w cytoplazmie komórek zwierzęcych. Enzymy znajdujące się w tych organellach rozkładają cząsteczki złożonych substancji, w tym lipidów, białek, węglowodanów i kwasów nukleinowych, powstających zarówno wewnątrz komórki, jak i dostających się z zewnątrz. W lizosomach wykryto około 40 enzymów; większość z nich wykazuje aktywność w środowisku o pH około 5.0

Lizosomy używane są także do degradowania wchłoniętych przez komórkę substancji obcych. Gdy białe krwinki lub komórki żerne pochłaniają bakterie lub pozostałości obumarłych komórek, obce substancje zamykane są w pęcherzyku utworzonym z części błony komórkowej. Fuzji z pęcherzykiem ulega następnie jeden lub więcej lizosomów, co prowadzi do utworzenia większego pęcherzyka, zwanego lizosomem wtórnym. Bardzo aktywne enzymy trawienne lizosomu stykają się w nim z cząsteczkami obcych substancji i rozkładają je na podstawowe elementy [87].

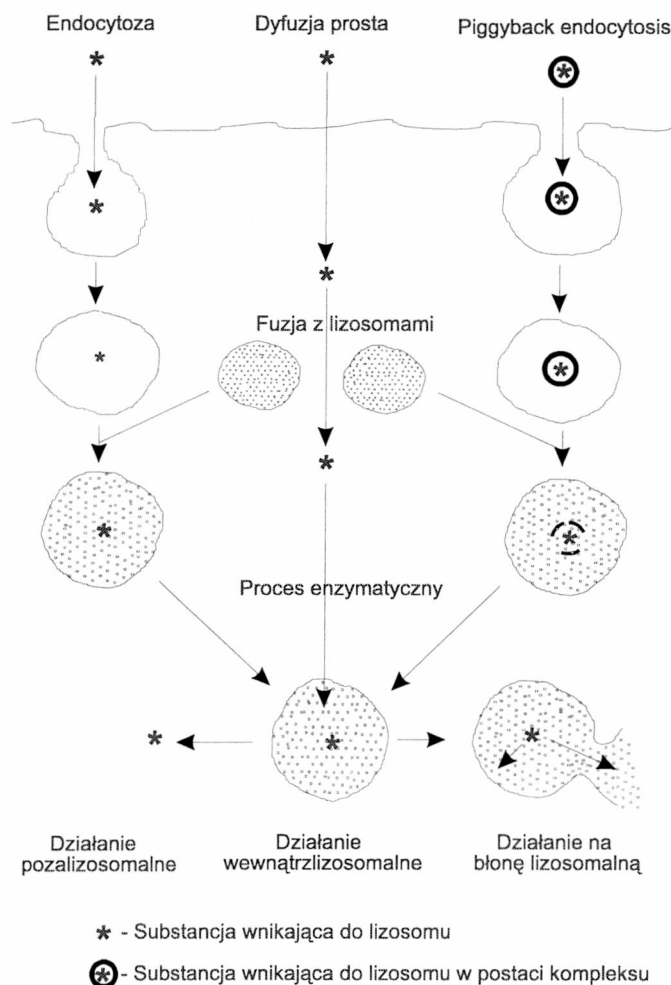
Wewnątrz lizosomu utrzymywane jest pH 4-5 czyli o 2-3 jednostek niższe niż cytozolu. Prawdopodobnie wymaga to specjalnej budowy integralnych białek lizosomów. Są one silnie glikozylowane, a kwasy sialowe nadają im niski punkt izoelektryczny, co prawdopodobnie jest przyczyną oporności na działanie proteinaz [88].

Przyjmuje się, że utrzymanie 100-krotnie wyższego stężenia protonów w lizosomach niż w cytoplazmie zależy od obecności specyficznej ATPazy w komórce. Świadczy o tym doświadczenie z wyizolowanymi lizosomami. Jeżeli umieści się je w środowisku nie zawierającym Mg^{2+} ani ATP, to pH w ich wnętrzu rośnie do 7.0. Dodanie ATP i Mg^{2+} powoduje gwałtowny spadek pH w lizosomach (mierzony gromadzeniem radioaktywnej metyloaminy). Tak więc udowodniono, że izolowane lizosomy zawierają pompę protonową zależną od ATP. Stąd przyjmuje się, że również w komórce kwaśne pH wnętrza lizosomów jest utrzymywane przez pompę transportującą protony, zależną od ATP [88].

2.4. Sposoby wnikania związków lizosomotropowych do lizosomów.

De Duve [35] wyróżnia dwie główne drogi wnikania różnych związków do lizosomów:

- Endocytoza
 - *Piggyback endocytosis*
- Dyfuzja prosta



Rys.1. Mechanizmy wnikanía i typy oddziaływania związków lizosomotropowych [35].

Pierwszy sposób polega na tworzeniu inwaginacji w błonie plazmatycznej i zamykaniu transportowanej cząsteczki w utworzonym w ten sposób pęcherzyku (Rys.1). W większości przypadków dochodzi później do fuzji tej wakuoli z lizosomem. Drogą endocytozy mogą wnikać do lizosomów różne małe cząsteczki, makromolekuły, a nawet tak złożone struktury jak wirusy czy komórki bakteryjne. Inną właściwością endocytozy jest jej specyficzność: różne materiały są pobierane z różną szybkością w zależności od typu komórki [35].

Szczególnym przypadkiem endocytozy jest mechanizm zwany *piggyback endocytosis*. Ten typ endocytozy dotyczy pobierania substancji, które wchodzi do lizosomów jako część większego kompleksu, a następnie zostają z niego uwolnione w efekcie obróbki enzymatycznej wewnątrz lizosomów (Rys.1); nośnikami mogą być przeciwciała, DNA. Wnikanie kompleksu zachodzi w podob-

ny sposób jak w przypadku typowej endocytozy. Mechanizm ten ma miejsce zarówno w warunkach fizjologicznych, jak i w patologicznych.

Drugim sposobem wnikania substancji do lizosomów jest dyfuzja prosta, polegająca na swobodnym przenikaniu przez błony (Rys.1) [35].

2.5. Sposoby działania substancji lizosomotropowych.

Substancje wnikające do lizosomów jednym z wyżej opisanych sposobów natychmiast po dotarciu do nich zostają poddane działaniu niskiego pH oraz około 40 lub więcej enzymów hydrolitycznych. Czynniki lizosomotropowe mogą tu wywierać trojaki efekt:

- mogą pozostawać wewnątrz lizosomów i oddziaływać poprzez modyfikowanie wewnątrzlizosomalnego środowiska (aktywacja lub inhibicja enzymów, zmiany pH i składu jonów, gromadzenie się wody itp.);
- mogą zmieniać właściwości błony lizosomalnej, zmniejszając jej zdolność do zatrzymania enzymów trawiennych i ochronę otaczającej cytoplazmy przed zniszczeniem. Miller postuluje, że uszkodzenie błony i uwalnianie enzymów hydrolitycznych może znaleźć zastosowanie w leczeniu chorób nowotworowych [37];
- mogą wywierać działanie poza lizosomami. Ma to miejsce w przypadku czynników wnikających na drodze *piggyback endocytosis*. Dzięki lizosomalnym enzymom hydrolitycznym substancje te są uwalniane od nośnika (następuje rozerwanie wiązania między związkiem a nośnikiem) i mogą swobodnie dyfundować z lizosomów, aby oddziaływać na komórkę w innym miejscu. W tym przypadku lizosom nie jest celem działania, lecz raczej narzędziem służącym do uwolnienia związku z kompleksu selektywnie skierowanego do lizosomu [35].

Aby związki swobodnie dyfundujące przez błony zostały w lizosomach zatrzymane musi istnieć system uniemożliwiający im ucieczkę z tych organelli. Jak już wyżej wspomniano czynniki lizosomotropowe to słabo zasadowe aminy. Słaba zasada ma zdolność przenikania przez błonę w formie nieprotonowanej; forma protonowana nie dyfunduje wcale lub przenika bardzo wolno. Wewnątrz

lizosomów panuje niskie pH co powoduje protonowanie zasady, a następnie jej wbudowanie w błonę lizosomalną i tym samym uwięzienie jej w lizosomie [35].

Firestone i współpracownicy postanowili zbadać działanie związków, które łączyłyby w sobie właściwości lizosomotropowe z właściwościami surfaktantów, działających aktywnie na błony plazmatyczne. Związki takie można określić mianem *surfaktantów lizosomotropowych*. Zadaniem tych związków byłoby selektywne rozrywanie błony lizosomalnej. Sam surfaktant nie wywierałby takiego skutku, gdyż działałby destruktywnie nie tylko na błonę lizosomalną, ale także na błonę komórkową niszcząc ją jako pierwszą. Surfaktant lizosomotropowy powinien biernie dyfundować przez błony i gromadzić się w kwasowych kompartmentach komórki. Tu zachodziłaby protonacja aminy i związek mógłby rozwinąć właściwości powierzchniowoczynne, zakotwicząc hydrofobowe reszty w lipidowej części błony, a hydrofilowe protonowane grupy aminowe zwrócone byłyby w stronę wnętrza lizosomu. W miarę postępowania tego procesu zmieniałaby się płynność błony i ulegałby zaburzeniu transport jonów, aż dochodziłoby do dezintegracji błony w momencie osiągnięcia stężenia krytycznego protonowanej aminy [40].

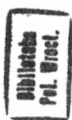
Zgodnie z tymi założeniami zespół Fireston'a zsyntetyzował 6 typów amin z łańcuchami bocznymi o długości 1-18 atomów węgla i przetestował je na różnych typach komórek. Działanie toksyczne obserwowano w przypadku związków o długości łańcucha większej, bądź równej 8 atomów węgla. Wszystkie związki były nietoksyczne, gdy ilość atomów węgla w łańcuchu bocznym była mniejsza lub równa 5. Potwierdzeniem tego, że czynniki te działały tylko na lizosomy był brak toksyczności w stosunku do erytrocytów [40].

Miller i współpracownicy [37] zbadali mechanizm działania N-dodecyloimidazolu (C-12-Im) na komórki nerki chomika. Po dodaniu C-12-Im wewnątrz-lizosomalne pH rośnie stopniowo w zależności od ilości związku (zanotowano zmianę z pH 5 na pH 7). Tak duży wzrost pH w połączeniu z powierzchniowoczynnymi właściwościami surfaktantu przyczyniał się do wzrostu przepuszczalności błony lizosomalnej i uwolnienia enzymów hydrolitycznych do cytozolu. W wyniku tego procesu następowała śmierć komórki.

Ponieważ w komórkach grzybów istnieją struktury analogiczne do typowych lizosomów - wakuole - można więc przypuszczać, że grzyby powinny być

zabijane przez surfaktanty lizosomotropowe w ten sam sposób jak komórki ssaków. Z badań Hussain'a i współpracowników, nad wpływem związku C-12-Im na komórki *S.cerevisiae* wynika, że zabijanie komórek drożdży przez surfaktanty lizosomotropowe jest silnie pH-zależne: śmiertelność komórek jest wyższa w pH 8 niż w pH 5. Ponadto zauważono że dodanie imidazolu do komórek *S.cerevisiae* przed podaniem surfaktanta zabezpiecza je przed działaniem C-12-Im. Jest to spowodowane faktem, że aminy nie mające charakteru surfaktantów podnoszą pH wewnątrz wakuoli osłabiając przez to pobieranie i protonowanie surfaktantu lizosomotropowego. Efektywność zabijania komórek grzyba zależy także od fazy wzrostu. Najbardziej wrażliwe na działanie N-dodecyloimidazolu są komórki we wczesnej fazie logarytmicznej, a stają się mniej wrażliwe w późnej fazie logarytmicznej i fazie stacjonarnej [42].

2.6. Zastosowania związków lizosomotropowych.



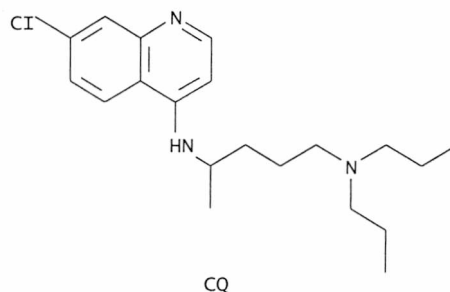
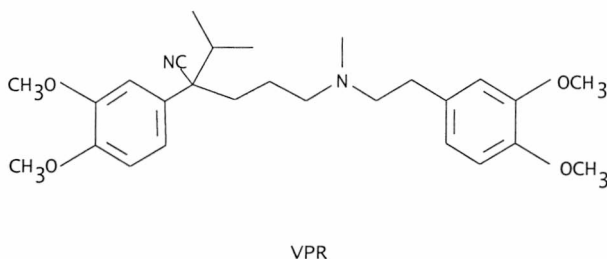
Substancje lizosomotropowe podwyższając lizosomalne pH i oddziałując na błony lizosomów znajdują szerokie zastosowanie jako:

- leki lizosomotropowe;
- substancje odwracające efekt oporności wielolekowej;
- fungicydy;

- leki lizosomotropowe

Są to leki, które bez względu na sposób podania, preferencyjnie gromadzą się w lizosomach. Zazwyczaj są to związki o charakterze słabo zasadowych amin, które podlegają protonowaniu w środowisku kwaśnym. W postaci nieprotonowanej leki takie swobodnie dyfundują przez błony, w tym też błony otaczające lizosomy. Po przyłączeniu protonu we wnętrzu lizosomów, leki z tej grupy tracą zdolność do przenikania przez błony i zostają „uwięzione” w lizosomach [88].

Verapamil (VPR) – lek stosowany przy leczeniu częstoskurczu komorowego, czy Chlorochina (CQ) – lek przeciwmalaryczny, są przykładami substancji lizosomotropowych [45].



Znane są również inne leki o charakterze substancji lizosomotropowych, stosowane jako leki kardiologiczne, przeciwzakrzepowe, blokujące β -receptory czy przeciwpadaczkowe.

Gromadzenie się protonowanych amin we wnętrzu lizosomów wykorzystano w sposób celowy, syntetyzując związek, który łączy cechy zasadowej aminy z właściwościami surfaktantu; jest to wcześniej wspomniany N-dodecyloimidazol (C-12-Im). Związek ten zmieniając przepuszczalność błony lizosomalnej prowadzi do uwolnienia na zewnątrz hydrolaz lizosomowych, spośród których najgroźniejsze dla komórki okazują się katepsyny. Ponieważ największą wrażliwość na działanie tych enzymów wykazują komórki młode, rosnące, związek ten próbuje się zastosować do niszczenia komórek nowotworowych posiadających kwasowe obszary [88].

Istnieją przynajmniej dwa potencjalne mechanizmy zabijania komórek przez C-12-Im. Pierwszy obejmuje bezpośrednie działanie na błonę komórki. W warunkach fizjologicznych, tylko niewielka część tego związku istnieje w formie protonowanej. Obniżone zewnątrzkomórkowe pH powoduje wzrost poza komórką ilości cząsteczek aktywnego surfaktantu i prowadzące do śmierci komórki zniszczenie jej błony komórkowej. Mechanizm alternatywny zakłada, że cząsteczki nie posiadające ładunku elektrycznego dyfundują do komórki, gdzie koncentrują się w lizosomach w wyniku gradientu pH w poprzek błony lizosomalnej. Kiedy znajdują się wewnątrz lizosomu zostają uprotonowane. Po osiągnięciu wystarczająco dużego stężenia surfaktantu wewnątrz lizosomu

następuje rozpuszczenie błony lizosomalnej i uwolnienie enzymów lizosomalnych do cytoplazmy. Te enzymy mogą degradować struktury komórki prowadząc do jej śmierci. Obecność niskiego pH zewnątrzkomórkowego może wzmacniać zabójcze działanie, jeśli enzymy uwalniane są do zakwaszonych komórek, lub gdy uwalniane są do środowiska i mogą oddziaływać na sąsiednie komórki [41].

- substancje odwracające efekt wielolekowej oporności (MDR)

W wyniku obserwacji klinicznych oraz towarzyszących im badań eksperymentalnych stwierdzono, że komórki niektórych nowotworów (czerniaka, raka okrężnicy, gruczolakolaka płuc) wykazują oporność na działanie powszechnie stosowanych cytostatyków. Komórki innych nowotworów (m.in. raka sutka, raka jajnika) w miarę trwania chemioterapii tracą wykazywaną początkowo wrażliwość na leki. Okazało się przy tym, że istniejąca od początku, lub nabyta w trakcie leczenia, oporność w stosunku do jednego leku, dotyczy również szeregu innych leków reprezentujących różne grupy chemiczne i odmienne mechanizmy działania. Ten typ oporności nazwano zatem *opornością wielolekową* (MDR) [45].

Stwierdzono następnie, że występowanie oporności wielolekowej wiąże się ze zdolnością komórek do gromadzenia leku w kwaśnych pęcherzykach. Modelem takich kwaśnych pęcherzyków mogą być lizosomy. Lek jest wówczas izolowany od miejsca, w którym powinien działać (jest to przeważnie jądro komórkowe) i może zostać wydalony z komórki drogą egzocytozy lub za pomocą glikoproteiny P-170, uniemożliwiając tym samym osiągnięcie poziomu warunkującego efekt terapeutyczny. Glikoproteina P-170 jest integralnym białkiem błon komórkowych stanowiącym pompę jonową, która najprawdopodobniej usuwa lek poza komórkę. Zauważono wzmożoną produkcję glikoproteiny P-170 podczas występowania oporności wielolekowej [45].

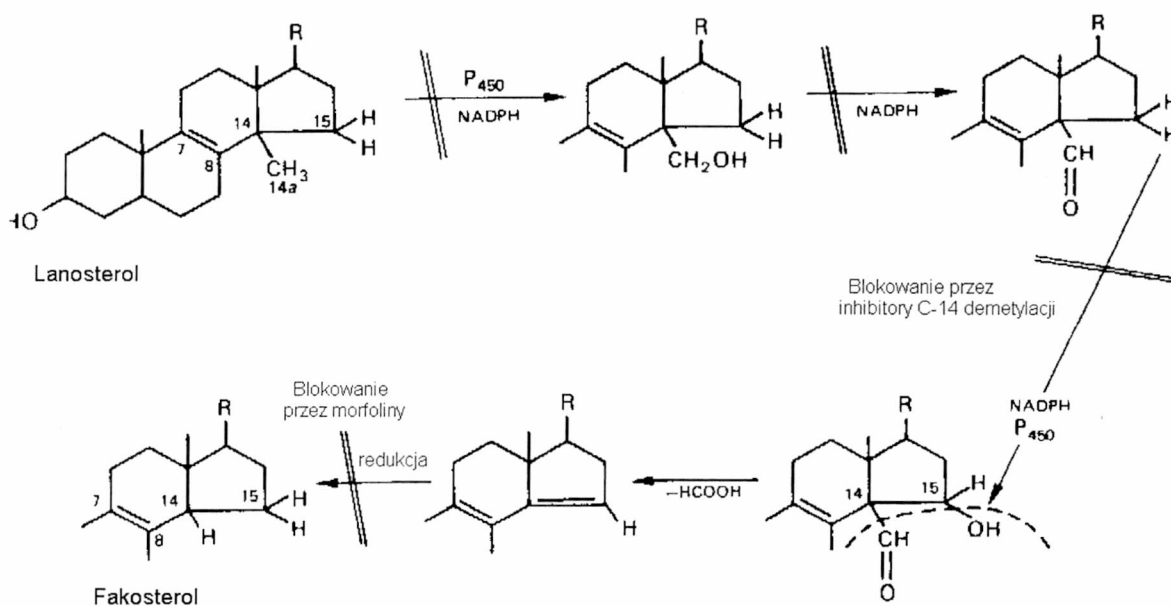
Odkryto grupę związków zdolnych do odwrócenia efektu MDR (Firestone i współpracownicy [40]). Posiadały one dwie cechy wspólne:

- zawierały co najmniej jeden azot zasadowy;
- były lipofilowe.

Istnieją dwa proponowane mechanizmy działania tych związków. Pierwszy z nich zakłada, że związek wnikający do komórki łączy się z glikoproteiną P-170 (PGP), co blokuje wypływ leków. Innym wyjaśnieniem może być lokalizacja tych związków w błonie pęcherzyków lizosomalnych i transport za ich pośrednictwem protonów do cytozolu, co podnosi pH wewnątrz pęcherzyków. To powoduje zaburzenie w sortowaniu i oddzielaniu leków antynowotworowych i uniemożliwia ich efektywne wydalenie [45].

- fungicydy

Substancje lizosomotropowe, głównie pochodne imidazolu i 1,2,4-triazolu, znalazły również zastosowanie jako fungicydy. Ich działanie polega na zahamowaniu biosyntezy steroli poprzez zablokowanie demetylacji na węglu C-14 przez system cytochromu P-450 [89].



Cytochrom P-450 jest kompleksowym białkiem związanym z błoną, którego centrum aktywne jest w pobliżu zawierającej żelazo grupy prostetycznej - porfiryny. Wszystkie heterocykliczne związki, które są inhibitorami demetylacji C-14 zawierają atom azotu, posiadający wolną parę elektronów i mogący wiązać się do systemu porfiryнового, co uniemożliwia wiązanie tlenu [89].

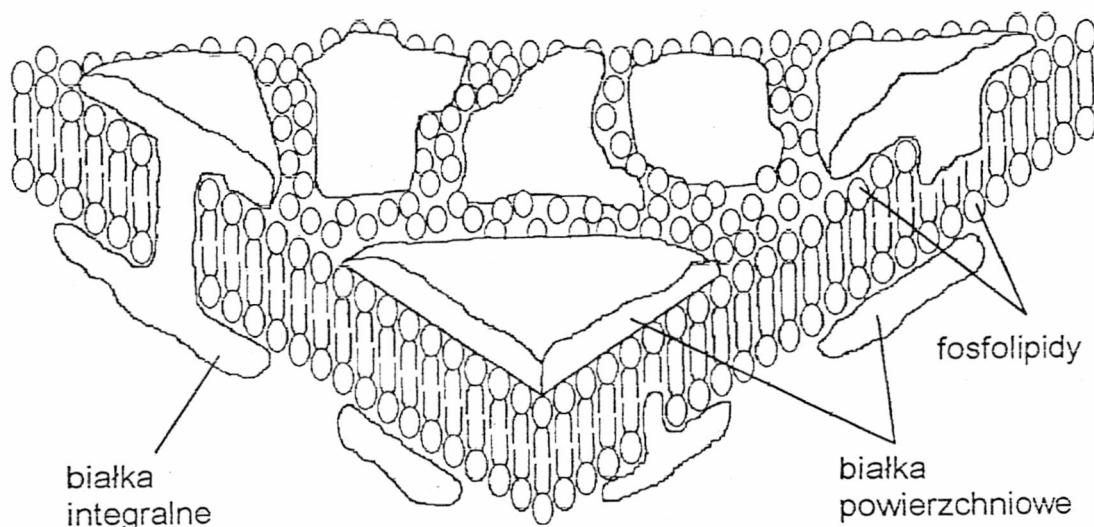
W normalnych warunkach miejsce aktywne przyciąga lanosterol, a na żelazie gromadzą się cząsteczki tlenu, zanim grupa metylowa będzie utleniona do CH_2OH . Może to być spowodowane tym, że inhibitory demetylacji C-14 zajmują miejsce aktywne obok grupy prostetycznej cytochromu P-450, uniemożliwiając dostęp zarówno tlenu jak i lanosterolu i nie pozwalają przez to na syntezę ergosterolu [89].

Konsekwencją zablokowania syntezy steroli jest obserwowany u grzybów defekt w membranach lipoproteinowych powodowany krótkim czasem trwania prawidłowych steroli lub obecnością nieprawidłowych lipidów. W ten sposób przenikalność błony komórkowej jak również aktywności desaturazy kwasów tłuszczowych, ATPazy i oksydazy cytochromowej ulegają zmianie, co prowadzi do śmierci grzyba [89].

2.7. Struktura i funkcje błony biologicznej.

Błona biologiczna jest jednym z głównych elementów struktury wszystkich organizmów żywych, oddzielającym od siebie komórki lub organelle komórkowe. Przykładem błony biologicznej jest błona komórkowa, dzięki której komórka zachowuje swoją indywidualność. Błona ta jest nie tylko barierą mechaniczną, oddzielającą wewnątrz komórki od jej najbliższego otoczenia, lecz również miejscem bardzo ważnych dla jej życia procesów fizjologicznych. Do najważniejszych funkcji błony komórkowej należą: funkcja ochronna, sterowanie procesami energetycznymi, recepcja bodźców zewnętrznych, regulowanie przenikania biernego i aktywnego substancji (jonów, składników odżywczych, leków itp.) do wnętrza lub na zewnątrz komórki, generacja potencjałów czynnościowych i spoczynkowych (np. wytwarzanie i przesyłanie impulsów nerwowych). Jest ona również odpowiedzialna za zjawiska immunologiczne, różnicowanie tkanek i agregację komórek, jak również przebieg reakcji chemicznych, umożliwiających m.in. równoczesne zachodzenie konkurencyjnych reakcji; ma też wpływ na szybkość reakcji metabolicznych [60,61].

Składnikami błon biologicznych są: białka, lipidy, węglowodany, jony i woda. Występują one w różnych proporcjach w zależności od rodzaju błony i organizmu.



Rys.2. Budowa błony komórkowej.

W przypadku drożdży najbardziej zewnętrzną płaszczyzną otaczającą komórkę jest ściana komórkowa, lecz dzięki swej strukturze, jest ona całkowicie przepuszczalna dla związków mniejszych niż 600 Da [62]. Natomiast błona komórkowa jest praktycznie nieprzepuszczalna dla większości cząsteczek hydrofilowych; muszą one być przenoszone w transporcie aktywnym. Błona komórkowa, według klasycznego modelu Singera i Nicolsona [63], to mozaika swobodnie dyfundujących białek i lipidów. Wraz z późniejszymi modyfikacjami [64] jest to wciąż aktualny opis struktury błony.

Białka błon drożdży, odpowiedzialne za transport są klasyfikowane w trzech grupach: kanały, permeazy (transportery) i pompy (ATPazy).

Transport uzależniony od energii pochodzącej z rozkładu ATP, to tzw. transport pierwotny. Biorą w nim udział pompy protonowe – ATPazy. ATPaza błony komórkowej drożdży jest zbudowana z dziewięciu do dziesięciu segmentów tkwiących w błonie i jest głównym, pod względem ilościowym białkiem tej błony [65]. Rola jaką odgrywa, polega na pompowaniu różnych kationów przez błonę na zasadzie antyportu z protonami, wyrzucanymi do środowiska [66]. Dodanie

glukozy do zawiesiny drożdży powoduje dwu- lub trzykrotny wzrost aktywności tej ATPazy, objawiający się wzmożonym wyrzucaniem protonów do środowiska [67].

Synteza i zastosowanie związków chemicznych, których biologiczna aktywność polega na hamowaniu w różny sposób transportu przez błony, daje możliwość zarówno zwalczania niepożądanych mikroorganizmów, np. grzybów, bakterii, jak również likwidowanie komórek nowotworowych. Z drugiej strony stosowanie inhibitorów transportu w dawkach subletalnych dla komórki, często pozwala zaobserwować mechanizm działania inhibitora, a także może dostarczać informacji o jego receptorze i funkcji jaką pełni. Prace nad inhibitorami transportu skupiają się obecnie głównie na zahamowaniu funkcji białek odpowiedzialnych za transport pierwotny. Wykrycie lub zsyntetyzowanie związku – inhibitora dla ATPaz, byłoby pierwszym krokiem w kierunku syntezy nowej klasy fungicydów [68].

Drożdże piekarnicze *S.cerevisiae* wydają się być doskonałym mikroorganizmem do badań nad wpływem związków lizosomotropowych na komórki. Wakuole występujące w komórkach drożdży charakteryzują się podobnymi cechami i funkcją, co lizosomy komórek ssaków [38,47,48]. Drożdże są zabijane przez związki lizosomotropowe prawdopodobnie na tej samej drodze co komórki ssaków. Dzięki temu, w sposób szybszy (szybki wzrost hodowli drożdży) i łatwiejszy (niski koszt, możliwość analizy genetycznej) można uzyskać cenne wyniki badań na poziomie molekularnym [49].

Hussain i współpracownicy przeprowadzili badania nad wpływem N-dodecyloimidazolu na komórki *S.cerevisiae* [42]. Wpływ tego związku lizosomotropowego zależał ściśle od jego stężenia i od pH na zewnątrz komórki. Stwierdzono znacznie wyższą efektywność jego działania w pH 8.0 niż w pH 5.0. Pod wpływem wyższych stężeń związku, zaobserwowano w mikroskopie fluorescencyjnym zniszczenie wakuoli wewnątrz komórek drożdży.

Związki, których struktura pozwala na penetrowanie błony, mogą oddziaływać zarówno z białkami jak i z dwuwarstwą lipidową błony. Większość związków amfifilowych występuje w roztworach wodnych w stanie dynamicznej równowagi pomiędzy różnymi typami agregatów cząsteczkowych. W niskich stężeniach występują w formie monomerów, a po przekroczeniu pewnego progu stężeniowego (tzw. c.m.c. – Critical Micelle Concentration), który zależy od

temperatury, pH, siły jonowej roztworu i innych czynników [69,70,71], dochodzi do tworzenia agregatów micelarnych. Micele to agregaty koloidowe, spontanicznie tworzone przez związki amfifilowe w roztworach wodnych powyżej pewnego stężenia. Łatwość tworzenia miceli przez związki amfifilowe jest zależna od obecności ładunku w ich części hydrofilowej [72]. Cząsteczki amfifilowe mogą oddziaływać z błoną, będąc zarówno w postaci miceli, jak i monomerów [73], jednak do wbudowywania się w błonę biologiczną zdolne są wyłącznie cząsteczki w formie monomerów [74].

2.8. Hemoliza erytrocytów.

Erytrocyty są intensywnie badane ze względu na ich funkcje biologiczne [75] i wpływ na wiele procesów chorobowych [76], a ze względu na łatwość ich uzyskiwania wykorzystywane są często w badaniach *in vitro* jako komórki modelowe. Szereg prac prowadzonych w tym zakresie dotyczy wpływu czynników fizykochemicznych na komórki erytrocytów, a w szczególności na właściwości i funkcje błony erytrocytów, traktowanej często jako model błony biologicznej.

Podstawowym elementem struktury błony erytrocytów (podobnie jak innych błon) jest dwuwarstwa lipidowa, w którą wbudowane są białka integralne i białka powierzchniowe.

Hemoliza jest procesem polegającym na wypływie hemoglobiny (i innych składników) z erytrocytów wskutek dezintegracji błony. W warunkach fizjologicznych błona krwinki czerwonej jest nieprzepuszczalna dla hemoglobiny, natomiast w różnym stopniu przepuszcza jony, np. takie jak: sodu, potasu i chloru, które wraz z hemoglobiną traktowane są jako osmotyczne składniki cytoplazmy krwinek czerwonych [77].

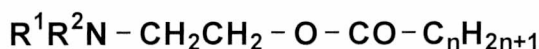
Proces hemolizy może być wywołany między innymi przez różnego rodzaju substancje, w szczególności biologicznie czynne, takie jak: leki, surfaktanty, toksyny, pestycydy oraz lipidy, oddziałujące ze składnikami membrany erytrocytów. Liczne badania wykazały, że lipidy i amfifilowe związki

biologicznie aktywne charakteryzują się w szczególności właściwościami litycznymi [78,79,80,81,82]. Mechanizm oddziaływania tych substancji z błoną erytrocytów nie jest do końca poznany; rozważa się tu wiele procesów, które potencjalnie mogą być przyczyną hemolizy, a spowodowanych obecnością w błonie związków amfifilowych. Substancje te mogą ponadto zmieniać właściwości transportowe błony (np. zaburzać transport jonów sodu i potasu) i kształt erytrocytów [83,84,85,86].

3. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY

Celem niniejszej pracy było opracowanie nowej grupy związków biologicznie czynnych o właściwościach „miękkich” substancji lizosomotropowych, tj. łatwo degradowalnych do nieaktywnych metabolitów, z wykorzystaniem przy ich projektowaniu mechanizmu działania biologicznego oraz zależności struktura – aktywność.

Z tych względów jako obiekt badań wybrałem podstawione estry 2-aminoetylowe kwasów tłuszczowych



opierając się na wcześniej stwierdzonej aktywności trimetyloamoniowych soli pochodnych estrów glicyny [25,31,96], których mechanizm działania biologicznego oraz oddziaływanie na błony biologiczne zostały dość szczegółowo ustalone. Od wybranych do badań aminoestrów kwasów tłuszczowych należało oczekiwać podobnego mechanizmu działania, z tym, że obecność w cząsteczce trzeciorzędowego w miejsce czwartorzędowego atomu azotu i związany z tym brak ładunku elektrycznego, winny umożliwiać cząsteczce aminoestru przenikanie przez błony i wnikanie do wnętrza komórki.

Obecność długłańcuchowego podstawnika hydrofobowego w ugrupowaniu estrowym miała nadawać związkowi, w jego protonowanej postaci, charakter kationowego surfaktantu wbudowującego się w błonę biologiczną, a przez to wpływającego na strukturę i funkcję błony. Różne podstawienia atomu azotu grupy aminowej R^1 i R^2 miały wpływać na zasadowość aminoestru, a przez to na stan dynamicznej równowagi między jego protonowaną i nieprotonowaną formą, który to stan wydawał się wywierać istotny wpływ na transport związku w komórce i jego biologiczne działanie. Obecność grupy estrowej winna wpływać na podatność związku do hydrolitycznego rozpadu w komórce, a jego produkty tj. kwas tłuszczowy i podstawiony 2-aminoetanol mogą być łatwo metabolizowane w organizmie.

W programie badań przewidziano następujące elementy:

- opracowanie metod syntezy i oczyszczania estrów kwasów tłuszczowych i podstawionych 2-aminoetanoli; przewidziano syntezę estrów kwasów tłuszczowych zawierających 9 – 15 atomów węgla w łańcuchu oraz aminoalkoholi różnie podstawionych przy atomie azotu;
- charakterystykę zsyntezowanych substancji, w szczególności określenie ich podatności na hydrolizę, oznaczenie zasadowości (pK_a) oraz własności powierzchniowych;
- określenie aktywności biologicznej substancji, a szczególnie
 - zdolności hamowania wzrostu drożdży *S.cerevisiae*,
 - aktywności hemolitycznej oraz wpływu na płynność błony erytrocytów,
 - zdolności hamowania aktywności H^+ -ATPazy błony komórkowej drożdży;
- opracowanie zależności struktura – aktywność jako narzędzia projektowania struktur o najwyższej aktywności;
- określenie obszarów praktycznego zastosowania badanych związków.

4. METODYKA BADAŃ

4.1. Stosowane metody analityczne.

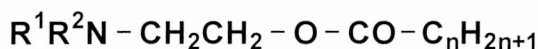
Temperaturę topnienia (nie korygowaną) oznaczono na stoliku mikroskopowym firmy Boetius.

Widma magnetycznego rezonansu jądrowego (¹H-NMR) wykonano na aparacie Bruker Avance DRX 300 MHz w CDCl₃, lub DMSO-d₆, wzorzec wewnętrzny TMS.

Chromatografię gazową (GLC) wolnych aminoestrów i amin wykonano na chromatografie gazowym GC-17A firmy SHIMADZU z programowanym wzrostem temperatury z szybkością 25°C /min w zakresie 70-240°C (kolumna o długości 25 m, średnicy 0.32 mm, zawierająca 5% fenylopolisiloksanu).

4.2. Synteza związków.

Zaprojektowane związki o ogólnym wzorze:



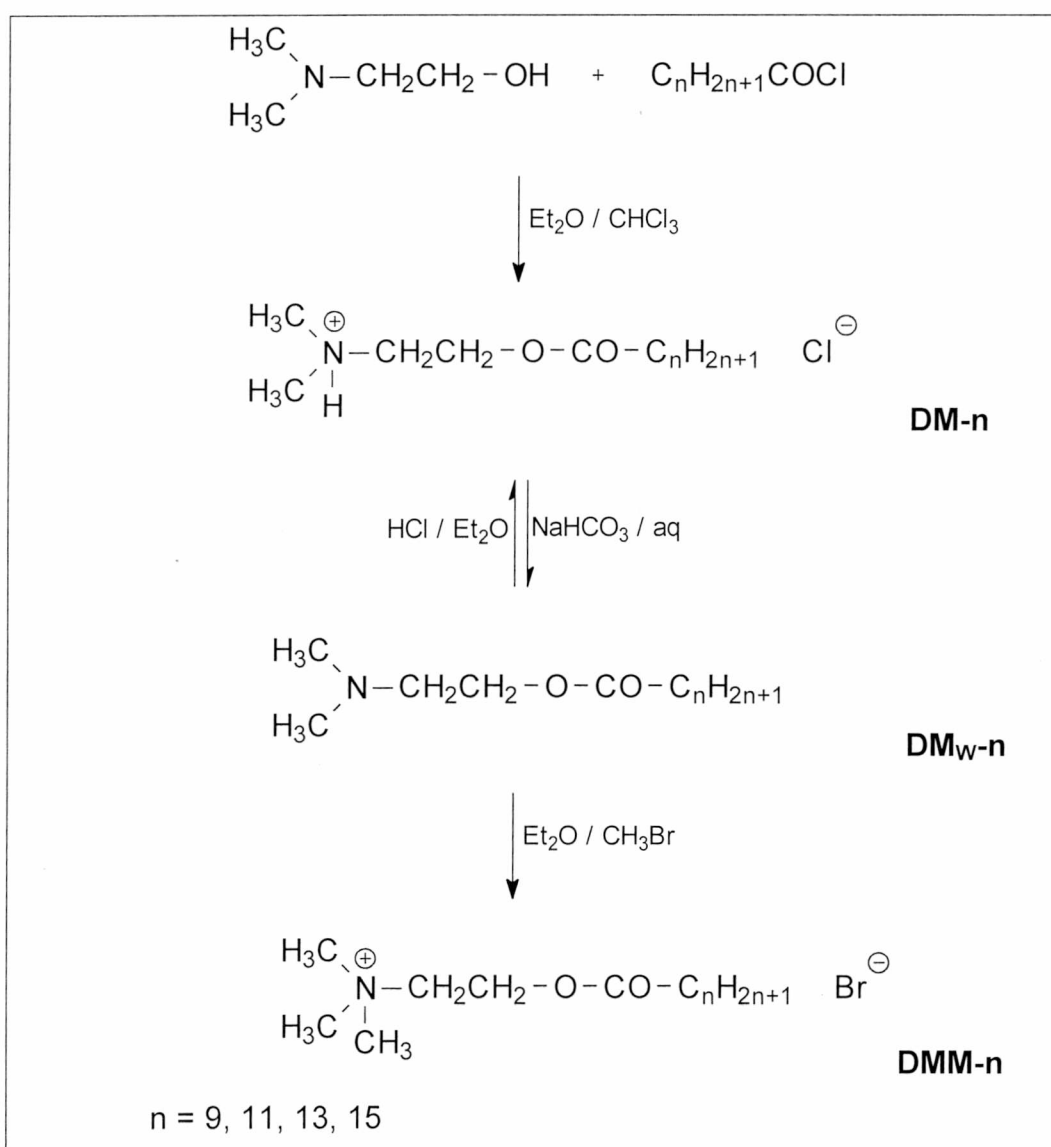
syntezowałem przez acylowanie podstawionych 2-aminoetanoli chlorkami kwasów tłuszczowych; pochodzenie oraz czystość stosowanych surowców, a także struktury zsyntezowanych połączeń, wraz ze stosowanymi w tekście oznaczeniami kodowymi, podaje **Appendix** umieszczony na zakończenie rozprawy.

Prowadzone przeze mnie prace nad syntezą były tak ułożone, aby zsyntezowane serie związków po przeprowadzeniu testów biologicznych, dawały w miarę jednoznaczne odpowiedzi co do wpływu poszczególnych elementów struktury na aktywność biologiczną lizosomotropowych aminoestrów. Prowadzone testy biologiczne miały być również próbą wyjaśnienia mechanizmu działania biologicznego zsyntezowanych związków. W pierwszej kolejności zsyntezowałem więc grupę estrów 2-dimetyloaminoetylowych (**DM-n**), które

traktowałem jako struktury wzorcowe i dla których przeprowadzono w najszerszym zakresie zaplanowane badania.

4.2.1. Synteza estrów 2-dimetyloaminoetylowych kwasów tłuszczowych o różnej długości łańcucha alkilowego (DM-n).

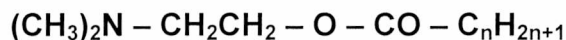
Rys.3. Schemat syntezy estrów 2-dimetyloaminoetylowych kwasów tłuszczowych o różnej długości łańcucha alkilowego (**DM-n**) i ich soli czwartorzędowych (**DMM-n**).



W tym wstępnym etapie syntez szukałem potwierdzenia założenia, że aminoestry kwasów tłuszczowych można uznać za substancje lizosomotropowe.

Jednocześnie chciałem określić optymalną długość łańcucha alkilowego, a więc stwierdzić, pochodne jakich kwasów tłuszczowych wykazują najwyższą aktywność biologiczną.

Zsyntezowałem serię estrów 2-dimetyloaminoetylowych, zawierających w łańcuchu alkilowym 9, 11, 13 i 15 atomów węgla (**DM-n**, gdzie **n** oznacza liczbę atomów węgla w łańcuchu alkilowym kwasu tłuszczowego).



O wyborze takich długości łańcucha zdecydowały wcześniejsze prace nad czwartorzędowymi solami amoniowymi, z których wynikało, że właśnie w zakresie 9 – 15 atomów węgla należy spodziewać się maksimum aktywności biologicznej badanych związków. Dla tej grupy zsyntezowałem też ich czwartorzędowe sole tj. bromki trimetyloamoniowe **DMM-n**.

Synteza prowadzona była według schematu przedstawionego na Rys.3.

Dla ilustracji synteza tych pochodnych zostanie opisana na przykładzie laurynianu 2-dimetyloaminoetylowego (**DM-11**).

W kolbie czteroszyjnej pojemności 50 ml umieszczono 3.6 g (0.04 mola) dimetyloaminoetanolu w 20 ml suchego eteru dietylowego. Kolbę umieszczono w łaźni lodowo-wodnej i w czasie mieszania schłodzono ją do temperatury około 5°C. Do wkraplacza wlano 11.0 g (0.05 mola) chlorku kwasu laurynowego w 20 ml chloroformu i wkraplano powoli przy ciągłym mieszaniu. Szybkość wkraplania regulowano tak, aby temperatura mieszaniny w kolbie nie przekroczyła 10-15°C. Po wkropleniu całej ilości chlorku, mieszaninę ogrzewano pod chłodnicą zwrotną w temperaturze wrzenia rozpuszczalników przez ok. 2 godz. Po tym czasie wyłączono ogrzewanie i pozostawiono całość do następnego dnia w temperaturze pokojowej. Odsączono na lejku ze spiekim biały krystaliczny osad, przemyto go kilkakrotnie suchym eterem dietylowym i pozostawiono do wysuszenia. Otrzymano 11,12 g (89,5%) produktu o dwu temperaturach topnienia $t_1=115-120^\circ\text{C}$, $t_2=136-140^\circ\text{C}$. Następnie surowy produkt krystalizowano z

mieszaniny n-heksan-chloroform (60:40 v/v) otrzymując bezbarwny produkt (wydajność 88%) o temperaturze topnienia 147-148°C. W podobny sposób otrzymano chlorowodorki estrów kwasów kaprynowego, mirystynowego i palmitynowego z 2-dimetyloaminoetanolem. Wyniki syntez podano w Tabeli 1.

Tabela 1. Wyniki syntezy chlorowodorków estrów 2-dimetyloaminoetylowych kwasów tłuszczowych.

Związek	Wydajność produktu surowego [%]	Wydajność procesu krystalizacji [%]	Temp. topnienia po krystalizacji [°C]
DM-9	94.5	89.0	127-129
DM-11	89.5	88.0	147-148
DM-13	89.0	88.0	168-170
DM-15	93.0	87.0	179-181

Czystość otrzymanych chlorowodorków aminoestrów kontrolowano głównie z pomocą widm ^1H NMR. Przykładowe widmo dla związku **DM-11** podano poniżej: (Brucker Avance 300 MHz, CDCl_3 , standard wewn. TMS, δ ppm): 0.882 (3H,t, CH_3); 1.259 (18H,s,-(CH_2)₉-); 1.618 (2H,t,-(CH_2)-CO-); 2.397 (2H,t, - CH_2 -O-); 2.198 (6H,d, (CH_3)₂N-); 3.394 (2H,m,-(CH_2)N-); 12.897 (1H,ss,-NH).

Tabela 2. Wyniki syntezy wolnych estrów 2-dimetyloaminoetylowych kwasów tłuszczowych.

Związek	Wydajność [%]
DM_w-9	88,0
DM_w-11	87,3
DM_w-13	98,8
DM_w-15	87,2

Aminoestry uwalniano z chlorowodorków działaniem roztworu kwaśnego węglanu sodowego. Chlorowodorek rozpuszczano w wodzie w kolbie stożkowej i

mieszając mieszadłem magnetycznym dodawano 2-krotny nadmiar 5% wodnego roztworu wodorowęglanu sodowego NaHCO_3 w stosunku do rozkładanego chlorowodoru. Następnie ekstrahowano trzykrotnie po 30 ml eteru dietylowego. Warstwę eterową suszono nad bezwodnym MgSO_4 i odpędzono eter do sucha na wyparce rotacyjnej. Otrzymano wolne aminoestry w postaci jasnych olejów.

Ponowne przeprowadzenie wolnych aminoestrów w ich chlorowodorki drogą przepuszczania gazowego chlorowodoru przez ich eterowy roztwór prowadziło do produktów o znacznej czystości i było alternatywną do krystalizacji drogą oczyszczania syntezowanych związków. W badaniach stosowano chlorowodorki aminoestrów i ich też dotyczą stosowane oznaczenia kodowe bez indeksu. Jeśli stosowany był wolny aminoester zaznaczono to w tekście.

4.2.2. Synteza soli czwartorzędowych pochodnych estrów 2-dimetyloaminoetylowych kwasów tłuszczowych.

Na tym etapie pracy interesującym było, jak zmienia się aktywność badanych aminoestrów w porównaniu z odpowiadającymi im strukturalnie solami czwartorzędowymi. W związku z tym zsyntezowałem serię bromków trimetyloamoniowych (**DMM-n**) przez czwartorzędowanie wolnych aminoestrów bromkiem metylowym w eterze dietylowym. Przykładem reakcji czwartorzędowania aminoestrów bromkiem metylu będzie synteza związku **DMM-11**.

W kolbie o pojemności 50 ml umieszczono 2.7g (0.01 mola) wolnego estru 2-dimetyloaminoetylowego **DM_W-11**, w 10 ml osuszonego eteru dietylowego i dodano równomolową ilość bromku metylu. Kolbkę pozostawiono na okres 24 godzin w temperaturze około 5°C. Po tym czasie odsączono na lejku ze spiekim biały krystaliczny osad produktu i przemyło go eterem dietylowym. Otrzymano 3,0 g bromku **DMM-11** o temperaturze topnienia 135-140°C, wydajność 82,0%.

W analogiczny sposób otrzymano metylobromki pozostałych aminoestrów **DMM-9**, **DMM-13** i **DMM-15**. Wyniki ujęto w Tabeli 3.

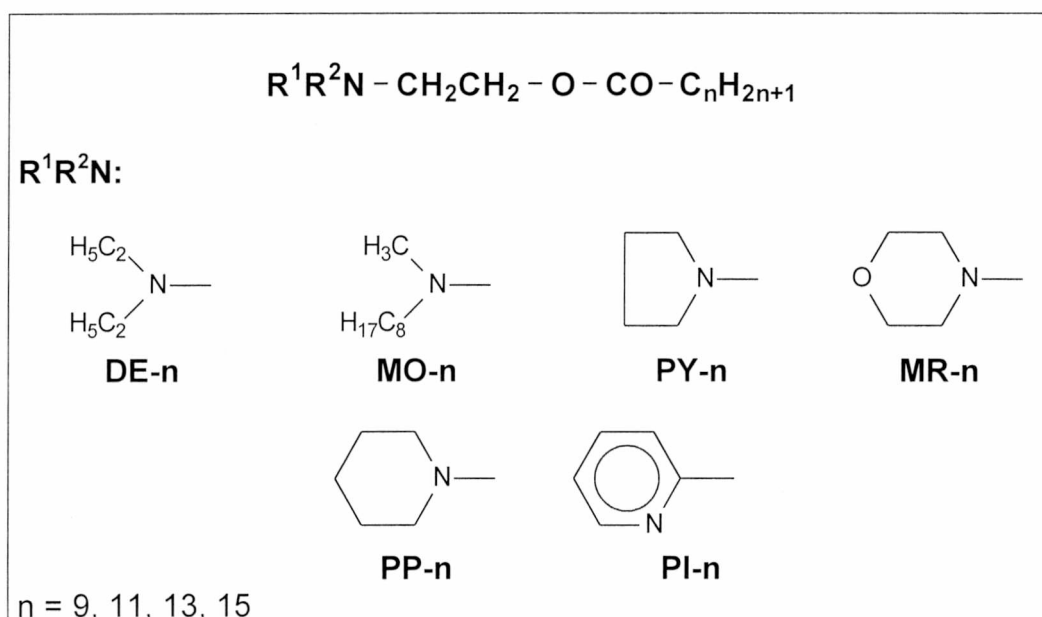
Tabela 3. Wyniki syntezy i właściwości soli trimetyloamoniowych **DMM-n**

Związek	Wydajność [%]	Temp. topnienia [°C]
DMM – 9	88,7	125 – 128
DMM – 11	82,0	135 – 140
DMM – 13	87,5	165 – 168
DMM – 15	87,0	170 – 175

Widmo ^1H NMR **DMM-11** (δ ppm): 0.88 (3H,t,CH₂-CH₃); 1.21 (16H,s,-(CH₂)₈-); 1.58-1.62 (2H,m,-CO-CH₂-CH₂-); 2.36 (2H,t, CO-CH₂); 3.58 (9H,s,(CH₃)₃N-); 4.13-4.15 (2H,m,-CH₂N-); 4.58 (2H,m,-OCH₂-).

4.2.3. Synteza estrów 2-aminoetylowych kwasów tłuszczowych różnie podstawionych przy atomie azotu.

W tym etapie prac zsyntezowałem szeregi związków pochodnych aminoetanoli różnie podstawionych przy atomie azotu. Struktury syntezowanych połączeń przedstawiono poniżej:



Syntezę tych pochodnych prowadzono według ogólnego przykładu podanego dla laurynianu 2-dimetyloaminoetylowego (**DM-11**) w punkcie 4.2.1.

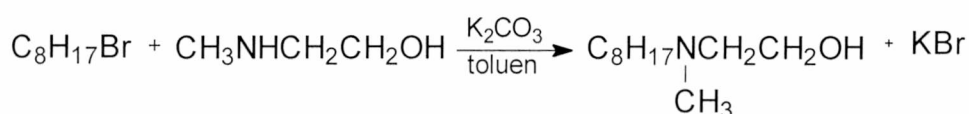
Tabela 4. Wyniki syntezy i właściwości estrów 2-aminoetylowych kwasów tłuszczowych różnie podstawionych przy atomie azotu.

Związek	Wydajność produktu surowego [%]	Wydajność procesu krystalizacji [%]	Temperatura topnienia po krystalizacji [°C]
DE-11	90.5	85	101-104
DE-13	91.0	87	98-100
DE-15	93.2	90	92-94
MR-11	92.5	88	102-103
MR-13	90.3	86	112-113
MR-15	91.4	87	115-117
PP-11	95.0	90	109-111
PP-13	93.8	89	91-93
PP-15	92.0	86	85-87
PY-11	93.5	88	123-125
PY-13	91.2	90	125-126
PY-15	93.0	87	126-128
PI-11	92.5	91	80-82
PI-13	88.9	90	88-90
PI-15	90.0	91	95-97
MO-11	75.5	-	-

W czasie syntezy estrów niektórych aminoetanoli (szczególnie cyklicznych) nie zawsze surowe aminoestry wypadały ze środowiska reakcji w postaci osadu. W takich przypadkach mieszaninę reakcyjną zagęszczano na wyparce rotacyjnej do 50% objętości i następnie dodawano do niej 50–100 ml n-heksanu. Powodowało to obfite strącanie osadu odpowiedniego aminoestru. Po schłodzeniu takiej mieszaniny do około 5°C i odczekaniu 2–3 godzin osad odsączono. Następnie oczyszczano go albo metodą przeprowadzania (przy

użyciu 5% roztworu NaHCO_3) do wolnego aminoestru i ponownego strącania chlorowodorku, albo na drodze krystalizacji z mieszaniny rozpuszczalników n-heksan–chloroform (wzajemne proporcje rozpuszczalników dobierano indywidualnie dla danego chlorowodorku). Bardzo często obie metody oczyszczania produktów stosowano łącznie, otrzymując związki o bardzo wysokiej czystości. Czystość otrzymanych chlorowodorków aminoestrów kontrolowano głównie z pomocą widm ^1H NMR. Czystość tę potwierdzano również, analizując wolne aminoestry metodą GLC. Otrzymane związki i ich właściwości zestawiono w Tabeli 4.

2-Aminoetanol użyte do syntezy były produktami handlowymi, a ich pochodzenie podaje **Appendix**. Jedynie 2-metylo-2-n-oktylo-etanolaminę otrzymano w reakcji 2-(metyloamino)-etanolu z bromkiem oktylowym według poniższej reakcji:

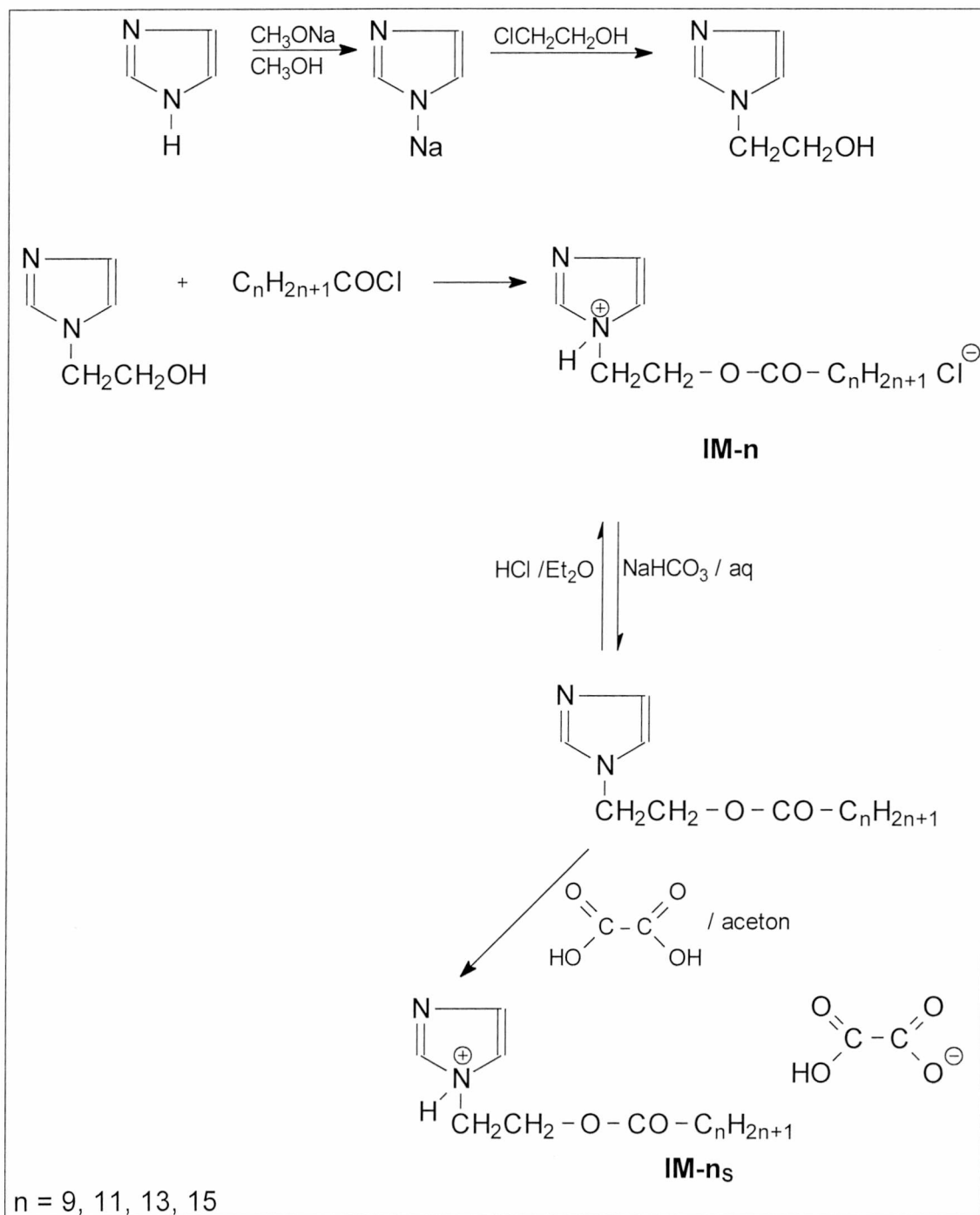


W kolbie okrągłodennej o pojemności 250 ml zmieszano 57.9 g (0.3 mola) bromku n-oktylowego, 22.5 g (0.3 mola) 2-metyloaminoetanolu, 21 g (0.15 mola) bezwodnego węglanu potasu oraz 25 ml toluenu i ogrzewano pod chłodnicą zwrotną w temperaturze łagodnego wrzenia przez około 20 godzin. Po schłodzeniu odsączono osad bromku potasu. Odpędzono toluen na wyparce próżniowej. Pozostały olej destylowano, odbierając frakcję o temperaturze wrzenia 153°C przy ciśnieniu 35 mm Hg. Otrzymano 45.0 g produktu (80.2 % wydajności, czystość pow. 99% wg GLC).

4.3. Synteza pozostałych pochodnych.

Zsyntezowano szereg dalszych pochodnych, których wybrane elementy budowy miały umożliwić bliższe sprecyzowanie zależności struktura – aktywność. Temu celowi służyć miała grupa estrów imidazoloetylowych, N-alkilowe pochodne pirolidyny oraz estry kwasu benzoowego. Ich synteza została opisana poniżej.

4.3.1. Synteza estrów imidazoloetylowych kwasów tłuszczowych.



a) Synteza imidazoloetanolu.

9 g Na rozpuszczono w 100 ml suszonego metanolu. Mieszaninę doprowadzono do temperatury wrzenia, a następnie wkroplono 27 g imidazolu rozpuszczonego w 100 ml suchego metanolu. Całość ogrzewano pod chłodnicą zwrotną przez 5 godzin, a następnie pozostawiono do schłodzenia.

Następnie do kolby okrągłodennej odmierzone 86 ml metanolowego roztworu soli sodowej imidazolu (0.26 mola) i równomolową ilość chlorohydryny etylenowej (20.9 g). Całość doprowadzono do temperatury wrzenia i ogrzewano pod chłodnicą zwrotną przez 3 godziny. Po odpędzeniu metanolu otrzymano 11.3 g imidazoloetanolu, który bez dalszego oczyszczania poddawano acylowaniu.

b) Synteza chlorowodorków imidazoloestrów.

Syntezę chlorowodorków imidazoloestrów prowadzono przez acylowanie imidazoloetanolu chlorkami wybranych kwasów tłuszczowych. Ogólny opis zostanie podany na przykładzie laurynianu imidazoloetylowego (**IM-11**).

Do kolby okrągłodennej, trójszyjnej, zaopatrzonej w mieszadło, termometr, wkraplacz, odmierzone 4.5 g imidazoloetanolu (0.04 mola) i 20 ml suchego eteru dietylowego. Do wkraplacza wprowadzono 10.9 g chlorku kwasu laurynowego (0.05 mola) w 20 ml chloroformu. Reakcję prowadzono na łaźni lodowej wkraplając wolno chlorek kwasowy tak, aby temperatura nie przekroczyła 5°C. Podczas stopniowego wkraplania wytrącał się biały osad. Po dodaniu całej ilości chlorku kwasowego mieszaninę reakcyjną podgrzano na łaźni wodnej pod chłodnicą zwrotną do temperatury łagodnego wrzenia i utrzymywano w tej temperaturze przez 2 godziny. Po tym czasie reakcję przerwano i pozostawiono mieszaninę reakcyjną w temperaturze pokojowej przez 24 godziny. Wytrącony biały, klejący osad odsączono otrzymując 7.1 g surowego chlorowodorku **IM-11**.

c) Otrzymywanie wolnych imidazoloestrów.

Otrzymane chlorowodorki rozkładano do wolnych aminoestrów. Do kolby stożkowej zawierającej 5% wodny roztwór kwaśnego węglanu sodu (NaHCO_3) dodawano partiami chlorowodorek, roztwór mieszano przy pomocy mieszadła magnetycznego. Po rozłożeniu całej ilości osadu dodawano do kolby niewielką ilość eteru dietylowego, całość mieszano i następnie przenoszono do rozdzielacza. Ekstrakcję eterem powtarzano 2–3 razy. Zebrane frakcje eterowe przenoszono do kolby stożkowej i suszono nad bezwodnym siarczanem magnezu. Eter odpędzano na wyparce uzyskując oleistą ciecz o żółtym zabarwieniu. Ponowne przeprowadzenie wolnych aminoestrów, przez

przepuszczanie gazowego HCl przez ich eterowe roztwory, nastęczało poważne trudności – były kłopoty z ich strącaniem z roztworów, a następnie z sączeniem. Te trudności były tym większe im krótszy był łańcuch alkilowy w cząsteczce imidazoloestru. Otrzymane chlorowodorki i ich właściwości podano w Tabeli 5.

Tabela 5. Wyniki syntezy i właściwości chlorowodorków imidazoloestrów

Związek	Temp. topnienia [°C]	Wydajność [%]
IM-11	74-77	36.0
IM-13	58-62	31.5
IM-15	88-91	42.0

Otrzymane wolne aminoestry imidazolu przeprowadzano przede wszystkim w szczawiany.

d) Strącanie szczawianów (IM-n_s).

Odwagowaną ilość wolnego aminoestru rozpuszczano w acetonie. Do tak przygotowanego roztworu dodawano równomolową ilość kwasu szczawowego również rozpuszczonego w acetonie. Osad wypadał obficie i po przechowywaniu całej mieszaniny w lodówce przez 24 godziny odsączało go. Następnie suszono na powietrzu. Wyniki syntez zebrano w Tabeli 6.

Tabela 6. Wyniki syntez i właściwości szczawianów aminoestrów.

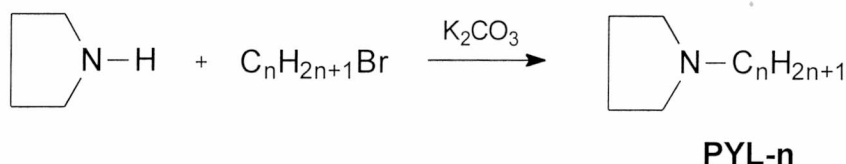
Związek	Temp. topnienia [°C]	Wydajność [%]
IM-9_s	88-91	31,2
IM-11_s	60-62	41,5
IM-13_s	94-96	43,3
IM-15_s	74-76	36,7

W celu potwierdzenia struktury otrzymanych związków wykonano dla nich widma $^1\text{H-NMR}$. Przykładowo podano widmo wolnego aminoestru **IM_w-11**: (Brucker Avance 300 MHz, CDCl_3 , standard wewn. TMS, δ ppm): 0.880 (3H,t, - CH_3); 1.226 (16H,t,-(CH_2)₈-); 1.589 (2H,t, - CH_2CH_3); 2.303 (2H,t,-CO- CH_2 -); 4.198-4.323 (4H,2t, -N- CH_2 - CH_2 -O-); 6.955 (1H,s, CH); 7.320 (1H,s,CH); 7.531 (1H,s,CH), które potwierdza założoną strukturę, a brak dodatkowych sygnałów świadczy o dużej czystości związku.

4.3.2. Synteza pochodnych pirolidyny.

W celu uchwycenia wpływu ugrupowania estrowego we fragmencie hydrofobowym aminoestrów zsyntezowano N-alkilopochodne pirolidyny (**PYL-n**) o różnej długości łańcucha n-alkilowego, a także metylobromki tych połączeń. Wybór ugrupowania pirolidynowego wynikał z faktu zaobserwowanej najwyższej aktywności dla pochodnej pirolidynowej **PY-11**.

4.3.2.1. Synteza n-alkilopochodnych (PYL-n).



Syntezę alkilopochodnych pirolidyny prowadzono przez alkilowanie pirolidyny bromkami n-alkilowymi o różnej długości łańcucha, w benzenie w obecności węgla potasu. Przykładową syntezę opisano dla reakcji pirolidyny z bromkiem n-dodecylowym (**PYL-12**).

7.1 g pirolidyny (0.1 mola), 27.4 bromku n-dodecylowego (0.11 mola) i 7.6 g bezwodnego węgla potasu rozpuszczono w 20 ml benzeniu i ogrzewano pod chłodnicą zwrotną w temperaturze łagodnego wrzenia przez 5 godzin. W czasie ogrzewania obserwowano silne pienie się mieszaniny reakcyjnej. Po

schłodzeniu, odsączono osad bromku potasu i odpędzono benzen na wyparce rotacyjnej, pozostałą mieszaninę poreakcyjną w postaci mazistego osadu poddano w 5% wodnym roztworze kwaśnego węglanu sodu i ekstrahowano kilkakrotnie eterem dietylowym. Warstwę eterową suszono przez 24 godziny nad bezwodnym siarczanem magnezu. Następnie przesączono na lejku ze spiekami i przesącz wysycono gazowym suchym HCl – obserwując obfite wydzielanie się białego krystalicznego osadu. Kolbę z osadem pozostawiono na kilka godzin w lodówce, następnie odsączono osad – 10.9 g (37.6% wydajności). Temperatura topnienia surowego produktu wynosiła 151-159°C. Produkt ten krystalizowano z mieszaniny n-heksan-chloroform (w równych objętościach). Po krystalizacji otrzymano 9.2 g (31.8% wydajności) produktu o temperaturze topnienia 156-158°C. Wyniki syntez i właściwości otrzymanych chlorowodorków przedstawiono w Tabeli 7.

Tabela 7. Wyniki syntezy n-alkilopochodnych pirolidyny (**PYL-n**).

Związek	Temp. topnienia [°C]	Wydajność [%]
PYL-10	153-155	29.2
PYL-12	156-158	31.8
PYL-14	157-159	31.6
PYL-16	159-161	34.6

Przykładowe widmo $^1\text{H-NMR}$ pochodnej **PYL-12** (Brucker Avance 300 MHz, CDCl_3 , standard wewn. TMS, δ ppm): 0.880 (3H, t, $-\text{CH}_3$); 1.300 (18H, t, $-(\text{CH}_2)_9-$); 1.872 (2H, m, $-\text{CH}_2\text{CH}_3$); 2.197 (4H, d, $-(\text{CH}_2)_2-$); 2.987 (4H, m, $-(\text{CH}_2)_2\text{-N-}$); 3.764 (2H, m, $-\text{CH}_2\text{-N-}$); 12.897 (1H, ss, $-\text{N-H}$).

4.3.2.2. Synteza soli czwartorzędowych (metylobromków) pochodnych związków PY-11 i PYL-12.

Sole czwartorzędowe (metylobromki) otrzymywałem według przepisu podanego dla bromków trimetyloamoniowych podanego w punkcie 4.2.2.

Otrzymane metylobromki miały temperatury topnienia: **PYM-11** – 49-51°C, **PYLM-12** – 42-45°C.

4.3.2.3. Synteza benzoesanów 2-aminoetylowych.

Dla uchwycenia wpływu łańcucha alkilowego pochodzącego od kwasu tłuszczowego zsyntezowano serię benzoesanów 2-aminoetanoli w reakcji acylowania tych ostatnich chlorkiem benzoilu. Syntezę prowadzono według przepisu podanego dla estru 2-dimetyloaminoetylowego kwasu laurynowego (punkt 4.2.1). Wyniki syntez i właściwości otrzymanych chlorowodorków przedstawiono w Tabeli 8.

Tabela 8. Wyniki syntezy benzoesanów 2-aminoetylowych.

Związek	Temp. topnienia [°C]	Wydajność [%]
DMB	148-151	92.2
DEB	117-120	91.8
PYB	180-182	90.2
PPB	187-188	92.0
MRB	202-205	89.7

Przykładowe widmo $^1\text{H-NMR}$ pochodnej dimetyloaminowej **DMB** (Brucker Avance 300 MHz, CDCl_3 , standard wewn. TMS, δ ppm): 2.958 (6H, s, $(\text{CH}_3)_2\text{-N-}$); 3.578 (2H, t, $-(\text{CH}_2)\text{-O}$); 4.849 (2H, m, $-\text{CH}_2\text{-N-}$); 7.465 (2H, m, $(\text{CH})_2$ Ph); 7.603 (1H, m, CH Ph); 8.047 (2H, t, $(\text{CH})_2$ Ph); 12.890 (1H, ss, $-\text{N-H}$).

4.4. Badania fizykochemiczne.

4.4.1. Wyznaczenie stałych dysocjacji kwasowej (pK_a).

Stałe dysocjacji kwasowej (pK_a) badanych substancji zostały wyznaczone z danych miareczkowania potencjometrycznego. Dlatego opracowany został program komputerowy, który umożliwia interpretację danych eksperymentalnych, przy czym stała dysocjacji K_a stanowi jeden z parametrów dopasowania.

Roztwory chlorowodorków aminoestrów w mieszaninach metanolu z wodą (poczynając od najniższego, dopuszczalnego rozpuszczalnością danego związku stężenia metanolu aż do 65% wag. MeOH) miareczkowano roztworem wodorotlenku sodowego. Rozpuszczalnik o większej zawartości metanolu ma zbyt niską wartość stałej dielektrycznej, by można było zastosować procedurę ekstrapolacyjną Yasudy - Shedlovky'ego, w wyniku której otrzymuje się wartość K_a odpowiadającą roztworowi wodnemu [92]. Wszystkie pomiary wykonano stosując automatyczny titrator wchodzący w skład mikrokomputerowego elektrochemicznego miernika uniwersalnego EMU [93].

4.4.2. Wyznaczanie krytycznego stężenia micelnego z pomiarów przewodnictwa.

Pomiary przewodnictwa wodnych roztworów badanych związków wykonano przy pomocy konduktometru OK. 102/1 firmy Radelkis (Węgry), wyposażonego w platynową elektrodę dzwonową, umożliwiającego pomiary w zakresie 1.5×10^{-6} [Ω^{-1}]. Częstotliwość pomiarowa wynosiła 80 lub 3000 [s^{-1}] w zależności od zakresu pomiarowego [94,95].

Po zanurzeniu elektrody pomiarowej do badanego roztworu termostatowanego z dokładnością do 0.1°C , dobraniu zakresu pomiarowego i skalibrowaniu konduktometru, wartość przewodnictwa odczytywano bezpośrednio na skali.

Pomiary przeprowadzano dla serii roztworów o stężeniach tak dobranych, aby spodziewana wartość krytycznego stężenia micelnego przypadała w około połowie zakresu. Z otrzymanych wyników sporządzono wykres zależności $\kappa=f(c)$, wartość krytycznego stężenia micelnego wyznaczano jako punkt wspólny dwu półprostych leżących poniżej i powyżej c.m.c.

4.4.3. Hydrolityczny rozkład aminoestrów.

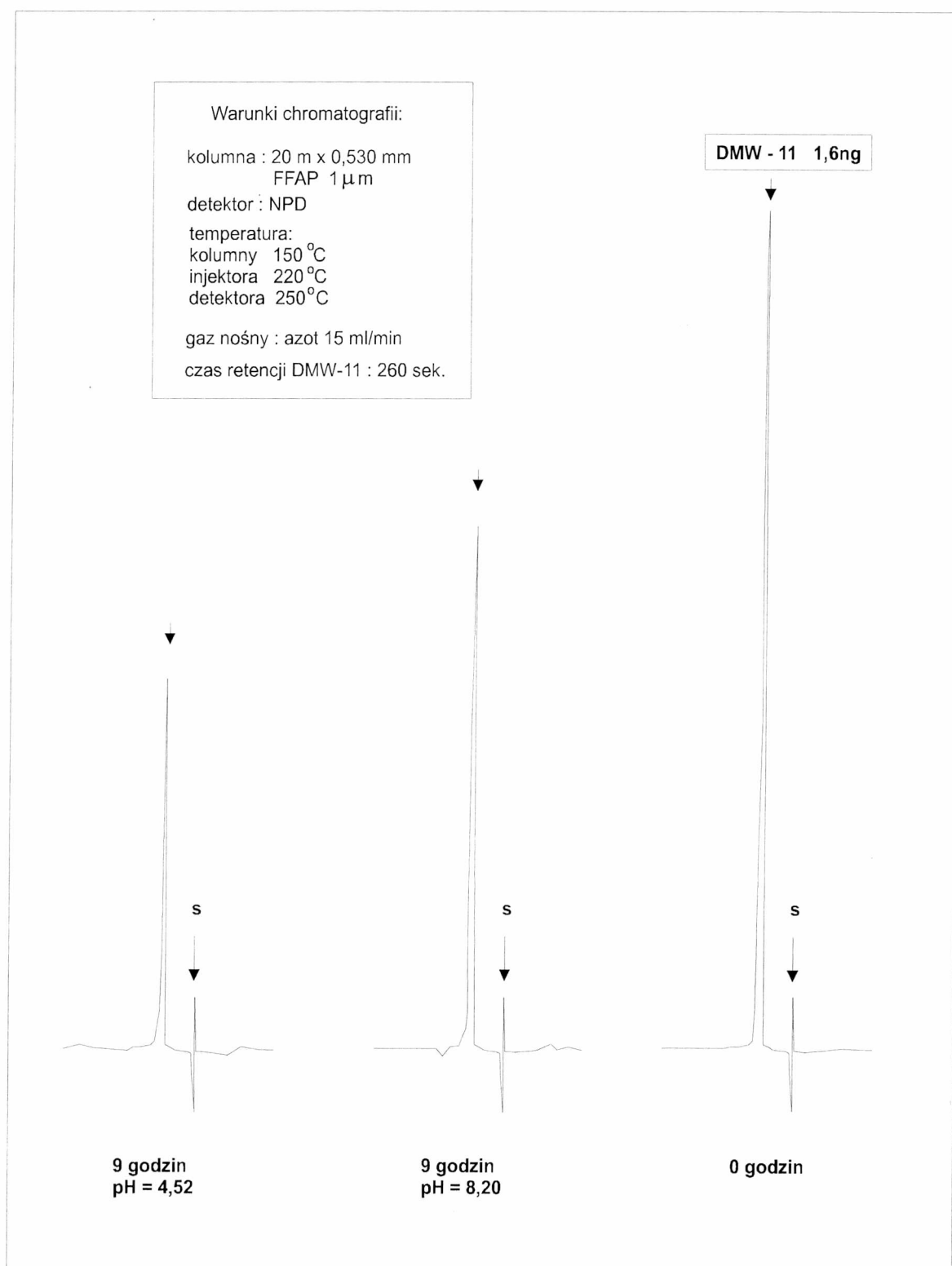
Celem badań było opracowanie metody analitycznej pozwalającej na kontrolowanie przebiegu hydrolizy aminoestrów oraz zbadanie jej przebiegu w różnych warunkach pH. Badania przeprowadzono na laurynianie 2-dimetyloaminoetylowym (**DM_W-11**) i jego chlorowodorku **DM-11**.

Sprawdzono przydatność metod chromatograficznych (chromatografii gazowej i wysokosprawnej chromatografii cieczowej) do oznaczania **DM_W-11** lub produktów jego hydrolizy. Przeprowadzone badania wstępne wskazywały, że najbardziej dogodnym będzie oznaczanie samego **DM_W-11** z pomocą chromatografii gazowej; detektor NPD (selektywny dla azotu) pozwalał na uzyskanie bardzo silnego sygnału przy dużej selektywności. Po przebadaniu kilku rodzajów faz stacjonarnych stwierdzono, że najbardziej przydatną okazała się faza stacjonarna FFAP. Za optymalne przyjęto następujące warunki chromatografii:

- chromatograf gazowy HP 5890 series II z detektorem NPD (selektywny dla azotu)
- kolumna: 20 m x 0,53 mm FFAP 1 μ m
- temperatura kolumny : 150 °C
- temperatura komory nastrzykowej: 220 °C
- temperatura detektora : 250 °C
- gaz nośny : azot 15 ml/min

pozostałe parametry wg instrukcji chromatografu. W powyższych warunkach czas retencji **DM_W-11** wynosił 260 sek. Przykładowy chromatogram przedstawiono na Rys. 4.

Rys. 4. Przykładowy chromatogram GLC.



Oznaczenie ilościowe prowadzono w oparciu o krzywą kalibracji sporządzoną na podstawie wyników oznaczeń dla roztworów **DM_W-11** w tetrahydrofuranie w zakresie stężeń od 0.4 do 2.4 μ g/ml.

Hydrolizę wolnego aminoestru **DM_w-11** oraz jego chlorowodorku **DM-11** prowadzono w buforze fosforanowym wg Michaelisa przy dwóch wartościach pH:

4.53 (fosforan jednopotasowy 1/15 M)

8.20 (0.25 cz. KH₂PO₄ + 9.75 cz. Na₂HPO₄ 1/15 M)

Wykonanie oznaczenia:

Do 6 probówek każda o pojemności 15 ml odmierzono po 4 ml roztworu buforowego. Probówki umieszczono w termostacie o temperaturze 36°C i pozostawiono na 30 minut celem ustabilizowania temperatury. Po tym czasie do każdej z probówek dodano po 0,20 ml roztworu wzorcowego, zawierającego 40 µg substancji w 1 ml tetrahydrofuranu i wymieszano.

Pierwszą probówkę wyjęto z termostatu, dodano 5 ml dichlorometanu, szczelnie zakorkowano i wytrząsano przez 1 minutę. Pozostawiono na 2 minuty do rozdzielenia warstw. Z warstwy dichlorometanu pobierano 3 ml ekstraktu. Ekstrakt odparowywano do sucha na wyparce obrotowej w temperaturze pokojowej. Suchą pozostałość rozpuszczano w 3 ml tetrahydrofuranu. Uzyskany roztwór poddawano oznaczeniu na chromatografii gazowym i z krzywej kalibracji odczytywano ilość **DM_w-11**.

Kolejne probówki wyjmowano z termostatu po 1, 3 , 5, 9 i 24 godzinach i wg wyżej opisanej procedury przeprowadzano ekstrakcję i oznaczenie ilości nie zhydrolizowanego **DM_w-11**. Wszystkie oznaczenia przeprowadzono w trzech powtórzeniach, a podawane wyniki są średnią z nich.

Odzysk opracowanej metody wyznaczono przeprowadzając ekstrakcję i chromatograficzne oznaczenie dla obu stosowanych związków i obu roztworów buforowych. Wszystkie oznaczenia wykonano w pięciu powtórzeniach w celu sprawdzenia powtarzalności metody i obliczenia średniego odzysku metody. Odzysk, niezależnie od stosowanego roztworu buforowego dla **DM_w-11** i jego chlorowodorku, wynosił 87±2%.

4.5. Badania biologiczne.

Zarówno aminoestry jak i odpowiednie pochodne alkilowe kwasów tłuszczowych były stosowane do badań biologicznych w postaci głównie ich chlorowodorków. Niektóre, z uwagi na występujące w czasie syntezy trudności, w formie szczawianów; w tym przypadku symbol kodowy związku opatrywano indeksem **s**. Stosowanie związków w formie protonowanej z odpowiednim przeciwjonem chlorkowym lub szczawianowym podyktowane było czynnikami praktycznymi. W tej formie są to związki krystaliczne, stabilne w czasie przechowywania, dobrze rozpuszczalne w wodzie i wygodne w aplikacji do badań biologicznych. Słabszą rozpuszczalność w wodzie miały jedynie pochodne o najdłuższych łańcuchach alifatycznych w cząsteczce. Rozpuszczalność tę, nieco słabszą w przypadku aminoestrów o najdłuższych łańcuchach, w znacznym stopniu poprawiało dodanie do roztworu wodnego 2% etanolu. Takie też roztwory stosowano dla wszystkich badanych związków w przypadku określenia ich aktywności w stosunku do drożdży piekarniczych *Saccharomyces cerevisiae*.

Stosując do badań związki w formie protonowanej, należy pamiętać, że w czasie prowadzonych testów biologicznych, zawsze ustalała się równowaga między formą protonowaną a nieprotonowaną, przy czym przesunięcie tej równowagi w jedną lub drugą stronę uzależnione było od pH podłoża.

4.5.1. Hamowanie wzrostu drożdży piekarniczych *Saccharomyces cerevisiae*.

Badania na hamowanie wzrostu drożdży *S.cerevisiae* prowadzono stosując prototroficzny szczep Σ 1278b na podłożu YPG (1% bactopecton, 1% yeast extract, 2% glukozy) zestalonym z pomocą 1,5% bactoagaru. Podłoże buforowano buforem Sørensen'a do pH 6 lub pH 8 w stężeniu końcowym 0.02M. Do podłoża dodawano badane substancje rozpuszczone w wodzie destylowanej z dodatkiem 2% etanolu, tak by uzyskać końcowe stężenie w pożywce w granicach 1 – 1000 μ M.

Wstępną hodowlę drożdży zakładano w 5 ml płynnego YPG i po 24 godzinach inkubacji przeszczepiano 0.1 ml do 10 ml płynnego YPG. Tak założoną hodowlę właściwą wirowano i komórki zawieszano do wyjściowej objętości w płynie fizjologicznym. Zawiesinę rozcieńczano tak by w 0.1 ml było 100 – 200 jednostek tworzących kolonie. Z rozcieńczenia tego rozprowadzano na płytkach YPG z badanymi substancjami (i na płytki kontrolne) po 0.1 ml zawiesiny.

Płytki inkubowano w temperaturze 28°C, a wyrosłe kolonie liczono po 4 dniach inkubacji. W niektórych badaniach odczytu dokonywano ponownie również po dłuższym okresie inkubacji. Procent jednostek tworzących kolonie określano jako średnią z 5 pomiarów w stosunku do kontroli. Kontrolę stanowiło identyczne podłoże bez związku z dodatkiem jedynie 2% etanolu.

Określano minimalne stężenie inhibicyjne (MIC), to znaczy takie stężenie związku w podłożu pełnym (YPG), przy którym następował spadek o ponad 50% liczby jednostek tworzących kolonie.

4.5.2. Pomiar zdolności inhibicji aktywności H⁺-ATPazy błony komórkowej drożdży *in vitro*.

ATPaza błony komórkowej drożdży jest głównym, pod względem ilościowym, białkiem tej błony [65]. Rola jaką odgrywa, polega na pompowaniu różnych kationów przez błonę na zasadzie antyportu z protonami, wyrzucanymi do środowiska [66]. Transport ten jest w znacznym stopniu indukowany obecnością glukozy w środowisku [67].

Badania nad inhibicją aktywności H⁺-ATPazy *in vitro* przeprowadzono w laboratorium prof. Andre Goffeau (Louvain-la Neuve, Belgia). Badany związek był rozpuszczany w 10 mmol DMSO i testowany przy pH 6.5 oraz 7.5; 1 ml próbka zawierająca 50 mmol/L MES, 6 mmol/L MgATP, 10 mmol/L NaN₃, 5 mmol/L winianu fosfoenolu, 1mmol/L DMSO i 1 µg białka z błony plazmatycznej izolowanej ze szczepu drożdży *S.cerevisiae* Σ1278b była testowana zgodnie z metodyką opisaną przez A.Goffeau [97,98].

4.5.3. Inhibicja H⁺-ATPazy błony komórkowej drożdży *in vivo*.

W celu potwierdzenia faktu, że badane związki (wybrane selektywnie) są również inhibitorami H⁺-ATPazy *in vivo*, przeprowadzono badania nad wpływem tych substancji na stymulowane glukozą wyrzucanie protonów przez komórki drożdży zawieszone w wodzie destylowanej.

Stopień zakwaszenia wody przez drożdże pod wpływem indukcji glukozą w obecności testowanych związków mierzono przy pomocy EMU-metru (Electrochemical Microcomputer-Controlled Universal Meter), wykonanego na Politechnice Wrocławskiej [93], pracującego z programem Turbo-pascal.

Stosowano metodę opisaną przez A.Kotyka [99,100] i R.S.Haworth [101]. Wyrzucanie protonów, mierzone spadkiem pH, przyjmowane jest za przejaw działania H⁺-ATPazy błony komórkowej. Badania prowadzono na szczepie *S.cerevisiae* Σ 1278b. W pomiarach stosowano zawiesinę drożdży o liczbie komórek odpowiadającej 10mg suchej masy, glukozę o stężeniu 200mM, KCl o stężeniu 0.1M oraz badane związki o stężeniu 1000 μ M.

4.5.4. Badania hemolityczne.

Badania prowadzono na świeżej heparynowanej krwi świni. Do płukania krwi i w prowadzonych eksperymentach stosowano izotoniczny roztwór fosforanowy o pH 7.4. Oddzielone od osocza erytrocyty płukano czterokrotnie w roztworze fosforanowym, a następnie poddawano modyfikacji w tym samym roztworze zawierającym określoną ilość badanego związku. Modyfikacja prowadzona była w temperaturze 37°C w czasie 0.5 godziny przy ciągłym mieszaniu mieszaniny. Próbkę zawierały po 10 ml zawiesiny erytrocytów o hematokrytach: 2, 4, 6 i 8%. Po zakończeniu modyfikacji pobierano 1ml zawiesiny i mierzono spektrofotometrycznie (Spekol 11) stężenie hemoglobiny. Stężenie to, wyrażone w procentach przyjmowano jako procent zhemolizowania krwinek, obliczony względem próbki zawierającej w 100% zhemolizowane erytrocyty.

4.5.5. Badania fluorymetryczne (określenie płynności błony erytrocytów).

Krwinki przygotowywano do modyfikacji podobnie jak w doświadczeniach hemolitycznych. Modyfikacja krwinek trwała 0.5 godziny w temperaturze 37°C, hematokryt krwinek w roztworze wynosił 2%. Po zakończeniu modyfikacji usuwano modyfikator, a następnie przygotowywano 5ml próbki do pomiarów fluorymetrycznych, w których hematokryt wynosił 0.05%.

Pomiary spektrofluorymetryczne wykonano przy użyciu spektrofotometru firmy Kontron, model SFM 25, w temperaturze pokojowej. Określano zmiany współczynnika polaryzacji fluorescencji sondy fluorescencyjnej TMA-DPH. Współczynnik ten (**P**) dla polaryzacji stacjonarnej obliczono według wzoru [102]:

$$P = \frac{I_{||} - G I_{\perp}}{I_{||} + G I_{\perp}}$$

gdzie $I_{||}$, $I_{\perp}$ — natężenie fluorescencji obserwowanej odpowiednio w kierunku równoległym i prostopadłym względem kierunku polaryzacji wiązki wzbudzającej. G jest parametrem zależnym od długości fali emisji.

Wzrost współczynnika polaryzacji (w porównaniu z jego wartością dla próbki kontrolnej) świadczy o zmniejszeniu płynności błony, zaś obniżenie jego wartości o zwiększeniu płynności [102, 103, 104].

4.5.6. Określenia aktywności przeciwgrzybiczej .

Podjęto również próbę określenia aktywności biologicznej niektórych z badanych związków jako fungicydów, określając ich MIC dla wybranych szczepów grzybów [105]. Badania te podjęto opierając się na doniesieniach literaturowych, że związki lizosomotropowe mogą mieć dobre właściwości przeciwgrzybicze, a poszukiwania związków o takich właściwościach prowadzone są w laboratoriach na całym świecie [106,107,108,109].

Minimalne stężenie hamujące określono dla komórek grzybów: *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida pseudotropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida quillermonti*, *Torulopsis glabrata*, *Trichosporon cutaneum* i *Geotricium*

candidum. Wszystkie te grzyby były pobrane od dzieci hospitalizowanych w Szpitalu Pediatrycznym im. J.Korczaka we Wrocławiu [109] i zostały zidentyfikowane laboratoryjnie metodami według McGinnisa [110] i Kurnatowskiej [111].

Badane grzyby hodowano w roztworze Sabourauda; pH roztworu ustalano przy pomocy buforu fosforanowego Sörensena (0.066M), ustalając wartość pH 7.2. Kultury drożdży inkubowano przez 48 godzin w temperaturze 28°C. MIC wyznaczano według metody opisanej przez McGinnisa [110].

4.5.7. Aktywność bakteriobójcza.

Testy mające wykazać zdolność hamowania wzrostu bakterii przeprowadzono dla bakterii Gram (+) – *Enterococcus faecalis* (paciorkowce kałowe), *Staphylococcus aureus* (gronkowiec złocisty) i Gram (-) - *Pseudomonas aeruginosa* (pałeczka ropy błękitnej), *Escherichia coli* (pałeczka okrężnicy) i *Proteus vulgaris* (pałeczka odmienia); we wszystkich przypadkach były to izolaty pobrane od pacjentów.

Badania przeprowadzono wysiewając na powierzchnie płytek agarowych 4-godzinne hodowle bulionowe (do założenia hodowli używano 14-godzinnych hodowli). Po wysuszeniu nanoszono kolejne rozcieńczenia badanych związków w PBS. Wyniki odczytywano po okresie 24 godzin inkubacji w temperaturze 37°C.

5. WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA

Badania rozpocząłem od zsyntezowania serii pochodnych dimetyloaminowych, jako układu modelowego, otrzymując grupę estrów 2-dimetyloaminoetylowych kwasów tłuszczowych (**DM-n**) posiadających rodnik od 9 do 15 atomów węgla. Wybór tej długości rodnika wynikał z zależności obserwowanych powszechnie dla czwartorzędowych soli amoniowych o charakterze kationowych surfaktantów, gdzie maksimum ich aktywności biologicznej jest obserwowane dla rodnika 12-węglowego. Synteza estrów o krótszym oraz dłuższym rodniku pozwoliła wykazać wpływ jego długości na aktywność badanych aminoestrów.

Dimetyloaminoestry (**DM-n**) syntezowałem przez acylowanie 2-dimetyloaminoetanolu chlorkami kwasów tłuszczowych, prowadząc tę reakcję w roztworze eterowym, wkraplając roztwór chlorku kwasowego w chloroformie. Przy takim doborze rozpuszczalników uzyskiwałem stosunkowo wysoką wydajność chlorowodorku aminoestru o dość dobrej czystości. Widma $^1\text{H-NMR}$ wskazywały jednak na obecność zanieczyszczeń, które udało się usunąć poprzez krystalizację z układu n-heksan – chloroform o doświadczalnie dobranym składzie. Później okazało się, że równie skutecznym, a znacznie prostszym w realizacji, jest sposób oczyszczania polegający na uwolnieniu aminoestru z jego chlorowodorku działaniem wodorowęglanu sodowego i ponowne strącenie chlorowodorku działaniem gazowego chlorowodoru. Zazwyczaj jednokrotna operacja prowadziła do produktu o wysokiej czystości, w wyjątkowych przypadkach wymagała powtórzenia. Czystość otrzymanych związków kontrolowałem z pomocą widm $^1\text{H-NMR}$, a czystość wolnych aminoestrów za pomocą GLC; otrzymane przeze mnie związki miały czystość powyżej 99%. Ogólnie można stwierdzić, że opracowana metoda syntezy charakteryzuje się prostotą wykonania i wysokimi wydajnościami, a zastosowany sposób oczyszczania jest bardzo prosty. Rokuje to dobrze w kontekście ewentualnego wprowadzenia tych związków w przyszłości do praktycznego stosowania.

W tabelach podano wyniki syntezy i własności otrzymanych chlorowodorków (**DM-n**) (Tabela 1) oraz wolnych estrów 2-dimetyloetylowych

(**DM_w-n**) (Tabela 2). Te ostatnie przeprowadzono w czwartorzędowe sole amoniowe przez czwartorzędowanie bromkiem metylowym, otrzymując odpowiednie bromki trimetyloamoniowe (**DMM-n**); wyniki syntezy i własności otrzymanych soli podaje Tabela 3.

5.1. Zdolność hamowania wzrostu drożdży *S.cerevisiae* przez aminoestry **DM-n**.

Zarówno aminoestry **DM-n** jak i ich czwartorzędowe pochodne **DMM-n** poddano testowi na hamowanie wzrostu drożdży *S.cerevisiae* w sposób opisany w poprzednim rozdziale przy dwóch wartościach pH podłoża; wyniki tego testu zestawilem w Tabeli 9. Znacznie wyższą aktywność obserwuje się dla pH 8 niż dla pH 6, co według Hussaina [42] jest charakterystyczne dla substancji lizosomotropowych. Najwyższą aktywność obserwuje się dla aminoestrów o 11 i 13-towęgłowym; podobną zależność uzyskano dla soli **DMM-n**. Wyniki te wskazują, że dla surfaktantów zawierających trzecio- i czwartorzędowy atom azotu mechanizm działania biologicznego jest zbliżony.

Widać również, że aktywność soli **DMM-n** jest zbliżona do aktywności aminoestrów **DM-n**, z tym, że maksimum aktywności soli amoniowych obserwuje się dla 13-towęgłowego (**DMM-13**).

Wcześniejsze prace nad czwartorzędowymi solami amoniowymi wykazały, że cytoplazmatyczne mutanty oddechowe ρ^- i ρ^0 są co najmniej dwukrotnie bardziej wrażliwe niż izogeniczny szczep wyjściowy [28]. W związku z tym przeprowadzono badania dla form dzikich i defektywnych oddechowo na szczepie drożdży $\Sigma 1278b$ stosując jako dodatek do podłoża dwa spośród badanej serii związków (przy pH 8.0), przy czym rozwój kolonii drożdży określano po 4 i po 9 dniach inkubacji. Wyniki przedstawiono w Tabeli 10.

Tabela 9. Zdolność hamowania wzrostu drożdży *S.cerevisiae* przez aminoestry **DM-n** i ich sole czwartorzędowe **DMM-n**.

Związek	Procent kolonii wyrosłych na podłożu ze związkiem [μM]											
	1000	100	10	1	0.1	1000	100	10	1	0.1	pH 8.0	
	pH 6.0											
DM-9	0	100	100	100	100	0	0	0	0	79	82	
DM-11	0	49	54	97	100	0	0	0	0	54	73	
DM-13	0	42	54	97	100	0	0	0	0	55	77	
DM-15	80	100	100	100	100	0	0	0	0	80	86	
DMM-9	0	79	86	92	95	0	0	54	55	57		
DMM-11	0	72	95	97	100	0	0	42	82	84		
DMM-13	0	62	92	95	100	0	0	0	56	63		
DMM-15	0	65	90	97	100	0	0	42	48	63		

Tabela 10. Wpływ czasu inkubacji na wzrost prototroficznego szczepu ρ^+ $\Sigma 1278b$ i jego mutantu oddechowego ρ^0 na podłożu YPG z **DM-11** i **DMM-13**.

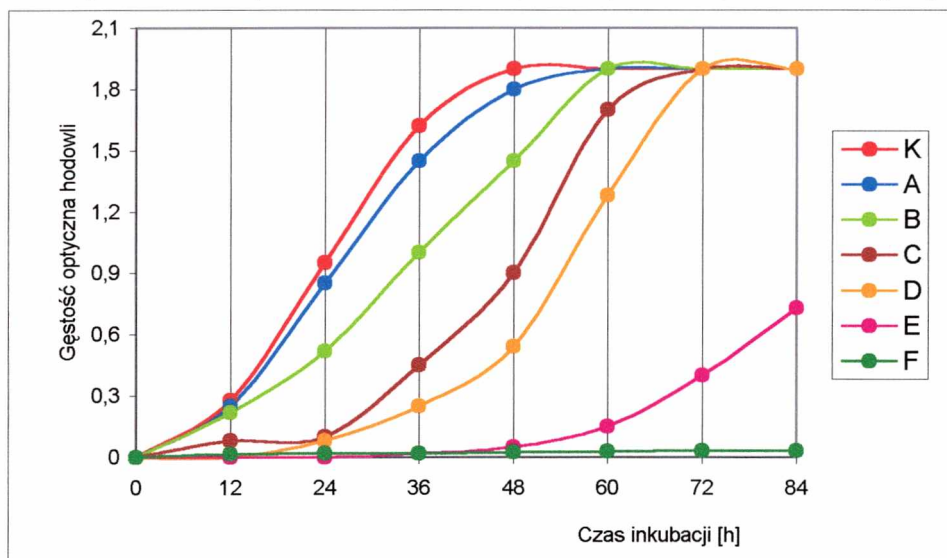
Związek	Forma drożdży	Czas inkubacji [dni]	Procent jednostek tworzących kolonie przy stężeniu związku [μM]						
			100	10	1	0.1	0.01	0.001	0.0001
DM-11	ρ^+	4	0	41	76	78	80	85	97
		9	0	84	91	97	99	100	100
	ρ^0								
		4	0	0	5	7	27	36	47
		9	0	52	56	59	68	78	86
DMM-13	ρ^+	4	0	50	85	92	96	97	100
		9	0	89	93	97	99	100	100
	ρ^0								
		4	0	0	7	9	32	39	53
		9	0	12	59	63	69	77	87

ρ^+ - szczep dziki, ρ^0 – mutant z defektem oddechowym

Wyniki zamieszczone w Tabeli 10 sugerują, że badane aminoestry mają działanie drożdżostatyczne, a nie bójcze, i hamują rozwój mutantów z defektem oddechowym przy niższych stężeniach niż form o normalnym oddychaniu. Mutanty z defektem oddechowym są więc bardziej wrażliwe na fungistatyczne działanie aminoestrów. Nie zauważa się istotnych różnic pomiędzy działaniem aminoestru **DM-11** a soli amoniowej **DMM-13**. Fakt wtórnego tworzenia kolonii drożdży po 9 dniach inkubacji mógł sugerować albo przystosowywanie się szczególnie mutantów ρ^0 do obecności aminoestrów, albo rozpad tych związków po dłuższym czasie, w środowisku podłoża, do nieaktywnych metabolitów. Podobnie obserwowano wtórny wzrost drożdży przy hodowli w podłożu płynnym, co obrazuje Rys.5.

Rys.5. Wpływ stężenia **DM-11** na szczep drożdży *S.cerevisiae* F87-24b ρ^0 w czasie, na podłożu płynnym YPG o pH 8.0

K – 0, **A** – 0.001, **B** – 0.01, **C** – 0.1, **D** – 1, **E** – 10, **F** – 100 [μ M]



W celu potwierdzenia tego, że „przystosowywania się” drożdży do aminoestru **DM-11**, może być spowodowane jego rozkładem w podłożu, przeprowadzono kolejny test biologiczny. W Tabeli 11 porównano rozwój kolonii dla szczepu drożdży F87-24b ρ^+ na płytkach z **DM-11** przygotowanych tuż przed wysiewem i płytkach przechowywanych przez 9 dni przed wysiewem.

Tabela 11. Rozwój kolonii drożdży *S.cerevisiae* F87-24b wyrosłych w obecności świeżo dodanego **DM-11** oraz po 9 dniach od naniesienia go na płytki.

Czas przechowywania płytek przed wysiewem [dni]	Czas inkubacji płytek od wysiewu [dni]	Procent komórek tworzących kolonie przy stężeniu związku [μ M]			
		10	1	0.1	0.01
0	4	0	54	73	83
0	9	42	66	76	96
9	4	39	62	74	93
9	9	78	98	100	100

Różnice w MIC o jeden rząd obserwowane na płytkach przygotowywanych tuż przed wysiewem, między czwartym a dziewiątym dniem inkubacji zanikają, jeśli płytki przechowywano przez 9 dni przed wysiewem komórek drożdży.

W kolejnym doświadczeniu zbadano wpływ czasu kontaktu związku z podłożem przed wysiewem komórek drożdży. W Tabeli 12 zebrane zostały wyniki, obrazujące wpływ związku **DM-11** na wzrost mutantu drożdży o wyjątkowej wrażliwości, przy różnym sposobie prowadzenia jego hodowli w obecności związku w podłożu. Na część płytek z podłożem wysiewano drożdże od razu, natomiast na drugą część – po inkubacji podłoża ze związkiem przez 9 dni. Inkubacja była prowadzona w temperaturze 28°C. Wyniki odczytywano po 5 i 9 dniach po wysianiu drożdży.

Tabela 12. Minimalne stężenie inhibicyjne (% przeżywalności) **DM-11** dla drożdży *S. cerevisiae* na podłożu YPD o pH 8.0
Podłoże YPD :yeast extract-1%, bacto pepton-1%, glukoza-2%, agar-agar 2%

Sposób aplikacji związku	Stężenie związku DM-11 [μ M]			Kontrola
	0.1	0.01	0.001	
Szczep+ związek po 5 dniach	3.4%	5%	6%	100%
Szczep+związek po 9 dniach	62%	65%	98%	100%
Szczep po 5 dniach związek po 14 dniach	58%	61.5%	96.5%	100%
Szczep po 9 dniach związek po 18 dniach	81%	100%	100%	100%

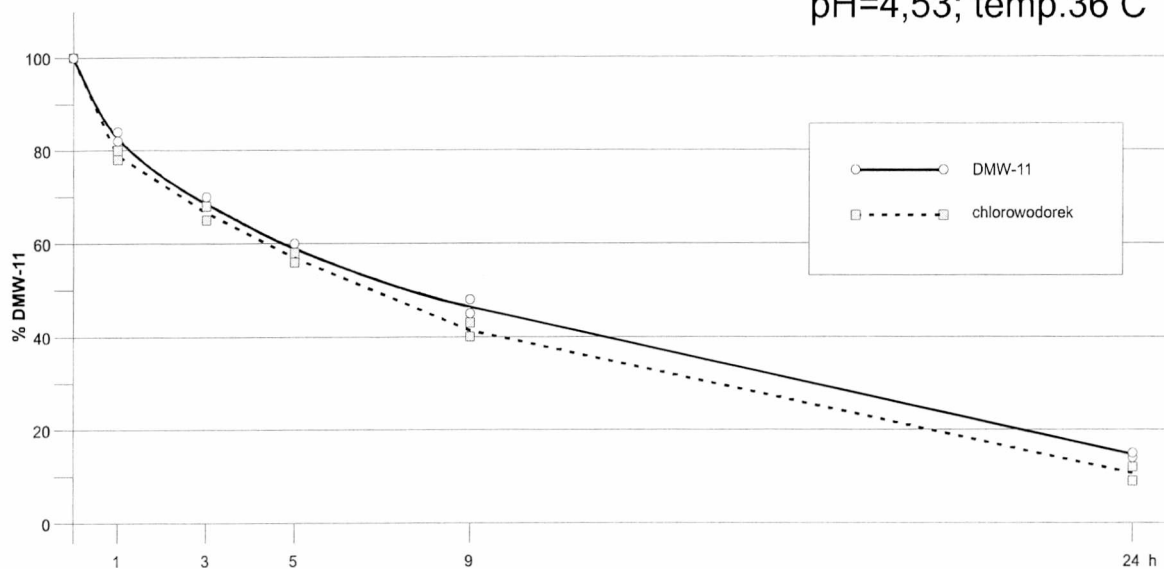
Zamieszczone w Tabeli 12 rezultaty potwierdzają, że w trakcie kontaktu z podłożem (bez obecności drożdży) znacznie spada aktywność aminoestru, jak można wnioskować, wskutek jego rozkładu, prawdopodobnie hydrolitycznego.

W wyniku zaobserwowanego wpływu czasu kontaktu związku z podłożem na wzrost kolonii drożdży, wszystkie następne testy wykonano wprowadzając substancję do podłoża bezpośrednio przed wysianiem komórek drożdży i dokonując odczytu po 4 dniach inkubacji w temperaturze 28°C.

Wobec stwierdzonego spadku aktywności aminoestrów w trakcie testu wykonanego na drożdżach, przeprowadzono badania przebiegu hydrolizy **DM_w-11** i jego chlorowodorku **DM-11** w środowisku kwaśnym i alkalicznym przy dwu wartościach pH (4.53 oraz 8.20). Uzyskane wyniki przedstawiono na Rys. 6 i 7.

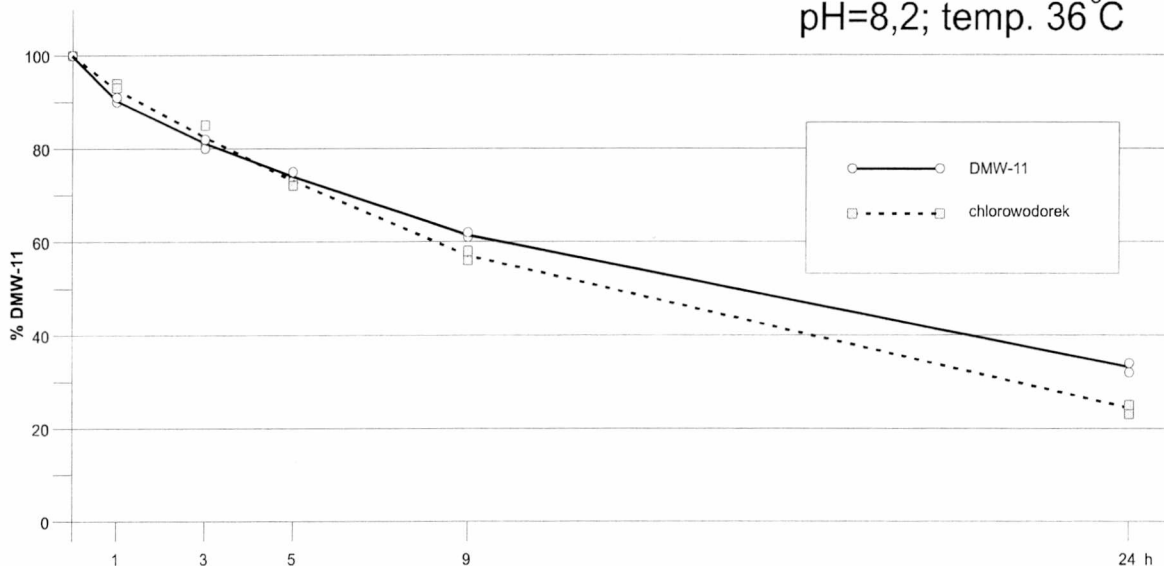
Rys.6. Hydroliza związków **DM-11** i **DM_W-11** w środowisku o pH 4.53.

pH=4,53; temp. 36 °C



Rys.7. Hydroliza związków **DM-11** i **DM_W-11** w środowisku o pH 8.2.

pH=8,2; temp. 36 °C



Obliczone stałe szybkości hydrolizy dla reakcji pseudo-pierwszego rzędu przedstawiono w Tabeli 13.

Tabela 13. Obliczone stałe szybkości hydrolizy.

Czas reakcji [s]	Stała szybkości reakcji [s ⁻¹]			
	pH 4.53		pH 8.2	
	DM_w-11	DM-11	DM_w-11	DM-11
3 600	5,175 x 10 ⁻⁵	6,547 x 10 ⁻⁵	2,926 x 10 ⁻⁵	2,016 x 10 ⁻⁵
10 800	3,436 x 10 ⁻⁵	3,847 x 10 ⁻⁵	1,951 x 10 ⁻⁵	1,725 x 10 ⁻⁵
18 000	2,931 x 10 ⁻⁵	3,123 x 10 ⁻⁵	1,673 x 10 ⁻⁵	1,748 x 10 ⁻⁵
32 000	2,397 x 10 ⁻⁵	2,752 x 10 ⁻⁵	1,526 x 10 ⁻⁵	1,789 x 10 ⁻⁵
86 400	2,196 x 10 ⁻⁵	2,555 x 10 ⁻⁵	1,283 x 10 ⁻⁵	1,652 x 10 ⁻⁵
Średnia	2,921 x 10⁻⁵	3,241 x 10⁻⁵	1,712 x 10⁻⁵	1,754 x 10⁻⁵

Jest charakterystyczne, że reakcja hydrolizy przebiega szybciej w środowisku kwaśnym niż alkalicznym (blisko dwukrotnie wyższa stała szybkości). Zaznaczyć również należy, że ustalone stałe szybkości są niższe niż uzyskane przez Thompsona [31] dla hydrolizy w 25°C przy pH 8,0 soli amoniowych o zbliżonej strukturze, dobrze rozpuszczalnych w wodzie. Thompson wspomina [96], że dla trudniej rozpuszczalnych soli o dłuższym łańcuchu otrzymywał niepowtarzalne wyniki i nie podaje ich w swojej pracy. Badany układ jest analitycznie dość trudny. Chlorowodorek **DM-11**, szczególnie w środowisku kwaśnym, dobrze rozpuszcza się w wodzie, a będący z nim w równowadze wolny aminoester **DM_w-11** rozpuszcza się bardzo słabo. Stąd uzyskane wyniki mają wyłącznie orientacyjny charakter. Nie mogliśmy jednak prowadzić tej hydrolizy w środowisku homogenym, gdyż wymagałoby to użycia rozpuszczalnika i nie odpowiadałoby warunkom środowiska komórki. Z tych też względów nie prowadziliśmy bardziej szczegółowych badań nad hydrolizą aminoestrów.

5.2. Wpływ aminoestrów DM-n na aktywność H⁺-ATPazy błony komórkowej drożdży.

H⁺-ATPaza jest jednym z enzymów błonowych. Jest ona odpowiedzialna za transport protonów między komórką a podłożem.

Wstępne badania na aktywnością H⁺-ATPazy *in vitro*, przeprowadzone w laboratorium prof. Andre Goffeau (Katolicki Uniwersytet w Louvain-la Neuve, Belgia) wykazały, że aminoestry **DM-n**, jak i ich czwartorzędowe pochodne **DMM-n** silnie hamują aktywność błonowego preparatu H⁺-ATPazy. Wyniki tego testu przedstawiono w Tabeli 14.

Tabela 14. Inhibicja aktywności enzymatycznej H⁺-ATPazy błony komórkowej drożdży *in vitro*.

Związek	I ₅₀ [*] [μM]	
	pH 6.5	pH 7.5
DM-9	315	70
DM-11	51	21
DM-13	17	11
DM-15	17	10
DMM-11	65	12

* Stężenie związku powodujące spadek aktywności o 50%

W serii związków **DM-n** najniższą aktywność wykazywał związek **DM-9**, co pokrywało się z testem hamowania wzrostu drożdży (Tabele 9 i 10). Jedyna różnica pomiędzy inhibicją H⁺-ATPazy błony komórkowej *in vitro*, polegała na tym, że MIC malał od 9-cio- do 13-towęglowego łańcucha alkilowego, a przy 15-towęglowym łańcuchu wykazywał pewien wzrost. Natomiast I₅₀ w przypadku aminoestru **DM-15** wykazywał wartości malejące. Ta różnica nasunęła przypuszczenie, że przy większej liczbie atomów węgla w łańcuchu alkilowym, przepuszczalność aminoestrów przez błonę komórkową drożdży lub dostęp ich grupy czynnej (prawdopodobnie aminowej) do miejsca wrażliwego na inhibicję może ulegać obniżeniu, stąd obserwowana wyższa wartość MIC dla aminoestru o najdłuższym z badanych łańcuchów alkilowych.

W celu potwierdzenia tego przypuszczenia, a jednocześnie stwierdzenia, czy aminoestry są inhibitorami H⁺-ATPazy błony komórkowej *in vivo*, przeprowadzono badania nad wpływem badanej pilotowej grupy związków na

stymulowane glukozą wyrzucanie protonów przez komórki drożdży zawieszone w wodzie destylowanej. Takie wyrzucanie protonów, mierzone spadkiem pH, przyjmowane jest za przejaw działania H^+ -ATPazy błony komórkowej [99]. Badania przeprowadzono nad wpływem serii aminoestrów **DM-n** na H^+ -ATPazę błony komórkowej szczepu *S.cerevisiae* Σ 1278b. Wyniki przedstawiono w Tabeli 15.

Tabela 15. Wpływ aminoestrów serii **DM-n** na ilość protonów wyrzucanych przez komórki *S.cerevisiae* Σ 1278b do środowiska.

Związek	Ilość H^+ [nM/min/mg suchej masy] po dodaniu:		
	Glukozy	Aminoestru	KCl
Brak	5.663	-	8.383
DM-9	4.977	3.688	8.304
DM-11	5.379	- 0.092	0.008
DM-13	4.182	- 0.110	0.012
DM-15	5.679	3.677	8.270

Zgodnie z danymi z piśmiennictwa [99] dodanie glukozy do zawiesiny drożdży powoduje szybki spadek pH, wynikający z wybijania protonów, których stężenie wzrasta do 5,6 nM. Jeśli po dodaniu glukozy do zawiesiny zostanie wprowadzony aminoester, spadek pH (wyrzucanie protonów) ulega natychmiastowemu zatrzymaniu. Efekt inhibicyjny uzależniony jest od długości łańcucha alkilowego w cząsteczce aminoestru. W przypadku **DM-9** następuje jedynie pewne wstrzymanie wybijania protonów do wartości 3.7 nM. W przypadku **DM-11** ilość wybijanych protonów spada do zera. W przypadku **DM-13** obserwuje się również całkowite zatrzymanie wybijania protonów. Jeszcze słabszy efekt niż **DM-9** daje wprowadzenie **DM-15**, gdzie wzrost pH po dodaniu aminoestru jest nieznaczny, a ilość wybijanych protonów spada 5.6 do 3.6 nM.

Te zależności są skorelowane w pewnym stopniu z intensywnością stymulacyjnego wpływu dodawanych jonów potasu (KCl). W obecności aminoestrów **DM-9** i **DM-15**, słabiej blokujących spadek pH, stymulujący wpływ KCl jest nadal

widoczny, podczas gdy w obecności aminoestrów o dużej aktywności (**DM-11** i **DM-13**) stymulacyjne działanie KCl jest na poziomie zerowym.

Inhibicja H^+ -ATPazy błony komórkowej, mierzona spadkiem pH i ilością wybijanych protonów, zależy od stężenia aminoestru. Stwierdzono to na przykładzie najsilniej działającego **DM-11**. Wpływ stężenia stosowanego aminoestru uwidacznia się zarówno wartością do jakiej wzrasta pH po jego dodaniu, jak również spadkiem ilości wybijanych protonów (Tabela 16).

Tabela 16. Wpływ różnych stężeń **DM-11** na ilość protonów wybijanych przez komórki *S.cerevisiae* $\Sigma 1278b$ do środowiska.

Stężenie DM-11 [μM]	Ilość H^+ [nM/min/mg suchej masy] po dodaniu:		
	Glukozy	Aminoestru	KCl
0	4.892	-	9.613
1000	4.902	- 0.068	0.009
500	4.168	- 0.083	0.060
100	4.411	1.072	2.915
50	4.372	2.466	4.330
10	4.336	4.030	4.487

Przy stężeniach aminoestru 500 – 1000 μM pH wzrasta gwałtownie, zaś wybijanie protonów ustaje całkowicie, a stymulujący wpływ KCl jest niemal zerowy. Przy stężeniach 100 μM i niższych nie stwierdza się już gwałtownego wzrostu pH, a jedynie inhibicję wybijania protonów, której stopień maleje wraz ze spadkiem stężenia aminoestru, a stymulujące działanie KCl staje się coraz bardziej widoczne.

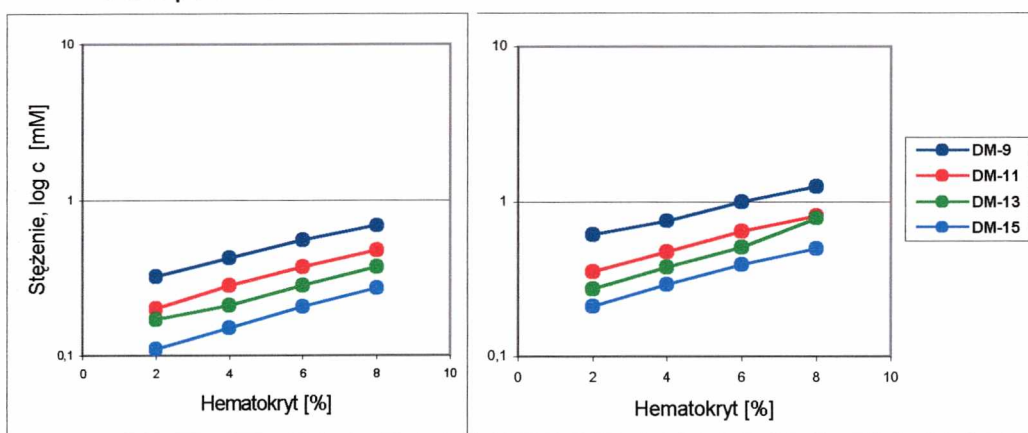
W przedstawionych wynikach doświadczeń zaskakująca była gwałtowność reakcji na wprowadzony do środowiska aminoester. Mogło to nasuwać wątpliwości, czy mamy do czynienia z procesem biologicznym, czy też raczej

czysto chemicznym. W celu sprawdzenia, czy obserwowany wzrost pH po dodaniu **DM-11** nie jest jedynie procesem chemicznym, tj. następuje alkalizacja środowiska przez związek, przetestowano wpływ tego związku na pH wody destylowanej z glukozą. W tym przypadku jednoznacznie stwierdzono, że bez obecności drożdży nie obserwuje się spadku pH środowiska.

5.3. Aktywność hemolityczna związków DM-n.

W doświadczeniach hemolitycznych określano toksyczność hemolityczną związków z serii **DM-n**, na podstawie przedziałów stężeń odpowiedzialnych za hemolizę krwinek, przy czterech hematokrytach komórek w roztworze. Stężenie hemolityczne znaleziono, badając zależność między procentem zhemolizowanych krwinek a stężeniem związku, dla hematokrytu: 2%, 4%, 6% i 8%. Wyniki tych badań pozwoliły przedstawić dla dwóch ustalonych efektów hemolitycznych, tj. 50% i 100% hemolizy krwinek (Rys.8) liniową zależność między stężeniem związku a hematokrytem.

Rys. 8. Zależność między hematokrytem a stężeniem związków **DM-n** powodującym 50% (**A**) i 100% (**B**) hemolizę krwinek przy pH 7.4 i temp. 37°C.



A

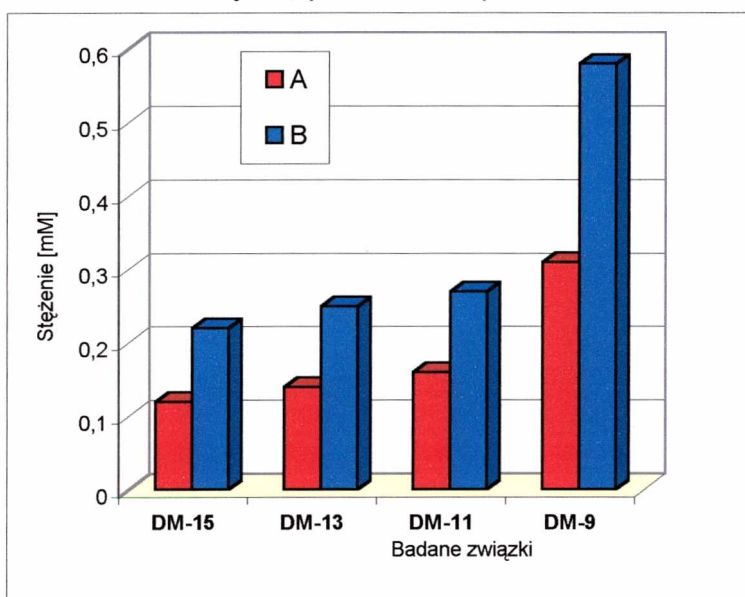
B

Na Rys.9 przedstawiono zaś stężenia związków powodujące 50% i 100% hemolizę przy 1% hematokrycie erytrocytów. Na podstawie tych wyników ustalono następujący szereg aktywności związków **DM-n**:

$$\mathbf{DM-15 > DM-13 > DM-11 > DM-9}$$

Najaktywniejszy okazał się związek **DM-15**, który wywoływał hemolizę 50% i 100% erytrocytów przy najniższych stężeniach w porównaniu ze stężeniami pozostałych związków.

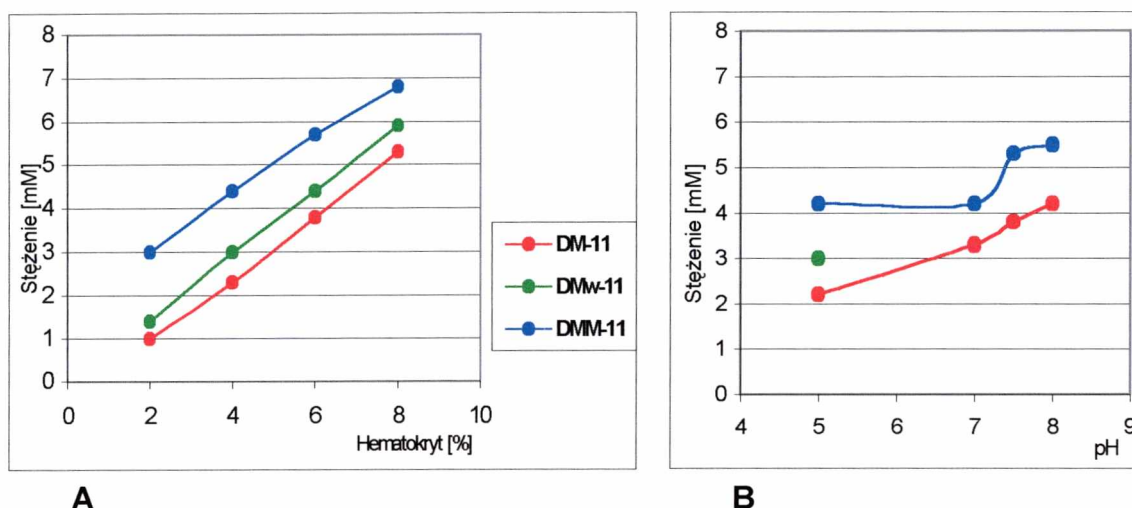
Rys. 9. Stężenie związków **DM-n** powodujących 50% (**A**) i 100% (**B**) hemolizę, przy jednostkowym hematokrycie, pH 7.4 i temp. 37°C



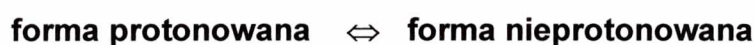
W celu bliższego określenia, która z form testowanych związków ma decydujący wpływ na oddziaływanie na błony erytrocytów, zmierzono stężenie związku wywołujące 50% hemolizę w zależności od hematokrytu (przy stałej wartości pH) oraz w zależności od pH (przy stałym hematokrycie). Test ten wykonano dla układu trzech związków: **DM-11**, **DM_w-11** i **DMM-11**. Wyniki przedstawione na Rys.10 wskazują, że chlorowodorek aminoestru **DM-11** wykazuje silniejsze działanie hemolityczne w porównaniu z jego czwartorzędową solą **DMM-11**. Najistotniejszym jednak stwierdzeniem jest obserwowana niska aktywność wolnego aminoestru **DM_w-11**, dla którego stężenia hemolityczne przy wyższych wartościach pH znajdują się poza skalą. Hemolityczne działanie tego związku znacznie wzrasta przy niskim pH (5.0), przy którym stężenie protono-

wanej formy aminoestru jest już na tyle wysokie iż różnica pomiędzy aktywnością obu związków (**DM-11**, **DM_w-11**) jest niemal zniwelowana.

Rys. 10. Zależność między stężeniem związku wywołującym 50% hemolizy a:
A) stężeniem erytrocytów (pH 5.0)
B) pH, dla hematokrytu 4%



Świadczy to niechybnie iż formą odpowiedzialną za działanie hemolityczne, a można wnosić iż również za inne formy biologicznej aktywności, jest protonowana forma aminoestru. Można również oczekiwać, że czynniki wpływające na stan równowagi



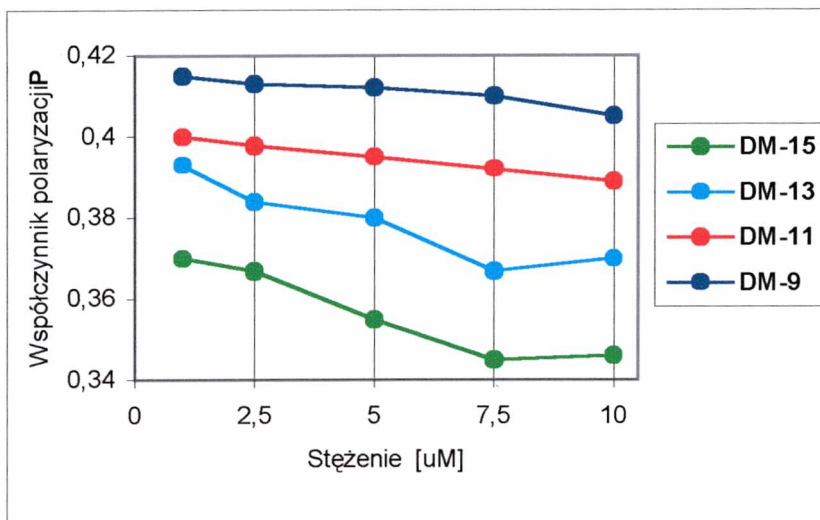
będą miały istotny wpływ na biologiczne działanie aminoestrów kwasów tłuszczowych.

5.4. Wpływ związków serii DM-n na płynność błony erytrocytów.

Badania fluorymetryczne pozwoliły obliczyć wartości współczynników polaryzacji **P** błony erytrocytów modyfikowanej związkami **DM-n**. Przedstawione na Rys.11 wyniki wskazują, że związki **DM-n** w przedziale stężeń 10-100μM powodują zmniejszenie współczynnika polaryzacji krwinek modyfikowanych, w porównaniu z krwinkami niemodyfikowanymi. Stwierdzono, że współczynnik polaryzacji w zasadzie maleje wraz ze wzrostem stężenia związku. Największe zmiany powoduje chlorowodorek aminoestru **DM-15**. Zmniejszenie

współczynnika polaryzacji błony erytrocytów modyfikowanej związkami **DM-n** świadczy o wzroście płynności błony, a więc także o wbudowywaniu się tych aminoestrów w błonę erytrocytarną.

Rys. 11. Współczynnik polaryzacji **P** w funkcji stężenia związków **DM-n**.



$P_{\text{KONTROLI}} = 0.422$

5.5 Wpływ podstawienia atomu azotu aminoestrów na ich aktywność.

Celem uchwycenia wpływu podstawienia aminoestru na atomie azotu zsyntezowałem szereg pochodnych o strukturze podanej w rozdziale 4.2.3., zawierających podstawione ugrupowania aminowe, różniące się tak wielkością cząsteczki, jak i zasadowością drugorzędowej aminy, od której się wywodzą.

5.5.1. Hamowanie wzrostu drożdży przez serię związków o łańcuchu alkilowym zawierającym 11 lub 13 atomów węgla.

Podobnie jak dla serii związków **DM-n** wyznaczono minimalne stężenie hamujące rozwój komórek drożdży *S.cerevisiae* związków różniących się hydrofilową „główką” i posiadających w swej budowie łańcuchy alkilowe zawierające 11 i 13 atomów węgla. Wybrano lauryniany i mirystyniany, ponieważ właśnie estry kwasów laurynowego i mirystynowego charakteryzowały się naj-

wyższą aktywnością biologiczną w większości przeprowadzonych dla serii **DM-n** testów. Wyznaczone wartości MIC przedstawiono w Tabeli 17.

Tabela 17. Minimalne stężenie hamujące rozwój komórek drożdży *S.cerevisiae* przez aminoestry laurynowe i mirystynowe przy różnych wartościach pH.

Związek	Minimalne stężenie hamujące [μM]		Związek	Minimalne stężenie hamujące [μM]	
	pH 6.0	pH 8.0		pH 6.0	pH 8.0
DM-11	100	5	DM-13	100	10
DE-11	100	5	DE-13	100	20
PY-11	100	5	PY-13	100	10
PP-11	100	10	PP-13	500	50
MR-11	500	50	MR-13	> 1000	> 1000
MO-11	1000	500	-	-	-
PI-11	> 1000	> 1000	PI-13	> 1000	> 1000

Seria aminoestrów o 11 atomach węgla w łańcuchu alkilowym i tym razem okazała się bardziej aktywna od ich odpowiedników 13-towęglowych. Również bardzo wyraźny jest wpływ pH podłoża; aktywność biologiczna badanych związków jest znacznie wyższa przy pH 8.0 niż przy pH 6.0.

Porównując aktywność aminoestrów o różnej budowie „główki” hydrofilowej, badaną serię można podzielić na kilka grup: najbardziej aktywne **DM**, **DE** i **PY**, nieznacznie słabsze **PP**, o wiele mniej aktywne **MR** i **MO** i zupełnie nieaktywne **PI**. Badane związki można ułożyć w szereg od najwyżej do najslabiej aktywnych:

$$\text{PY} = \text{DM} = \text{DE} > \text{PP} \gg \text{MR} > \text{MO} \gg \text{PI}$$

5.5.2. Wpływ aminoestrów zawierających 11 lub 13 atomów węgla w łańcuchu alkilowym na aktywność H⁺-ATPazy błony komórkowej drożdży

Powinowactwo hydrofobowego łańcucha alifatycznego do lipidów błony komórkowej wynikające z poprzednich badań nad czwartorzędowymi solami amoniowymi i lokalizacja w błonie komórkowej H⁺-ATPazy skłonił nas do przetestowania wpływu aminoestrów na aktywność błonowego preparatu tego enzymu. Badania przeprowadzone w laboratorium prof. A.Goffeau (Louvain-la Neuve-Belgia) wykazały, że wszystkie badane substancje, z wyjątkiem **PI**, silnie hamują aktywność tego enzymu. I₅₀ (stężenie inhibujące w 50% aktywność) przy pH 6.5 wahało się od 38 do 51 μM a przy pH 7.5 od 11 do 30 μM; wartości I₅₀ dla pochodnej pirydynowej są wielokrotnie wyższe.

Tabela 18. Wpływ aminolaurynianów na hamowanie *in vitro* aktywności H⁺-ATPazy błony komórkowej drożdży.

Związek	I ₅₀ [μM]	
	pH 6.5	pH 7.5
DM-11	51	21
DE-11	51	18
PY-11	49	11
PP-11	39	11
MR-11	38	30
PI-11	1690	1300

Badaną serię związków można uszeregować według malejącego wpływu na H⁺-ATPazę błony komórkowej drożdży w sposób następujący:

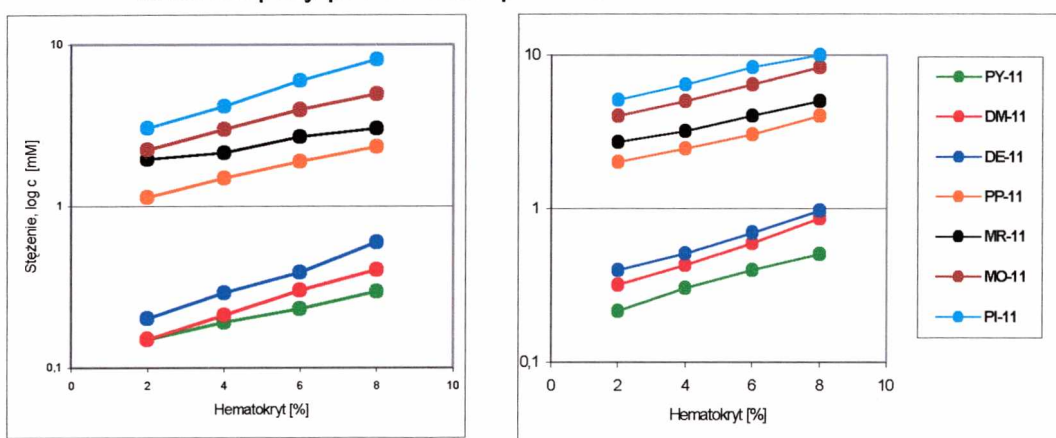
$$\text{PY} = \text{PP} > \text{DE} > \text{DM} > \text{MR} \gg \text{PI}$$

5.5.3. Aktywność hemolityczna laurynianów aminoetylowych.

Przeprowadzono badania hemolityczne krwinek modyfikowanych laurynianami aminoetylowymi, a więc związkami posiadającymi taki sam 11-towęglowy łańcuch alkilowy, lecz różne „główki” polarne.

Doświadczenia hemolityczne pozwoliły ustalić dla każdego z tych związków hemolityczne przedziały stężeń, przy ustalonych czterech hematokrytach krwinek (2%, 4%, 6% i 8%).

Rys. 12. Zależność między hematokrytem a stężeniem chlorowodorków laurynianów, powodującym 50% (A) i 100% (B) hemolizę krwinek przy pH 7.4 i temp. 37°C.



A

B

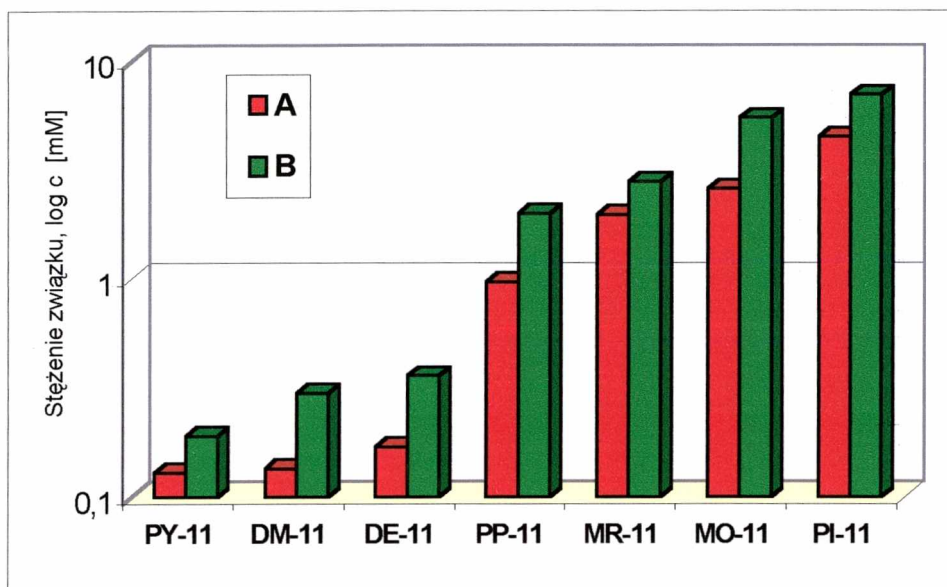
Na Rys.12 przedstawiono zależność liniową między stężeniem laurynianów a hematokrytem krwinek dla 50% (A) i 100% (B) hemolizy. Z zależności tej wyznaczono stężenie badanych związków odpowiedzialne za 50% i 100% hemolizę, w odniesieniu do jednostkowego hematokrytu. Stężenia te, w postaci wykresów słupkowych pokazano na Rys.13, pozwoliły ustalić toksyczność hemolityczną tych substancji, spełniającą relację:

$$\text{PY} > \text{DM} > \text{DE} > \text{PP} > \text{MR} > \text{MO} \gg \text{PI}$$

Najaktywniejszy jest związek **PY-11**, który wywołuje 50% i 100% hemolizę krwinek przy najniższych stężeniach, w porównaniu ze stężeniami pozostałych

związków, a przedstawiony szereg jest niemal identyczny jak w przypadku zdolności hamowania wzrostu drożdży.

Rys. 13. Stężenie chlorowodorków laurynianów powodujące 50% (A) i 100% (B) hemolizę, przy jednostkowym hematokrycie, pH 7.4 i temp. 37°C.



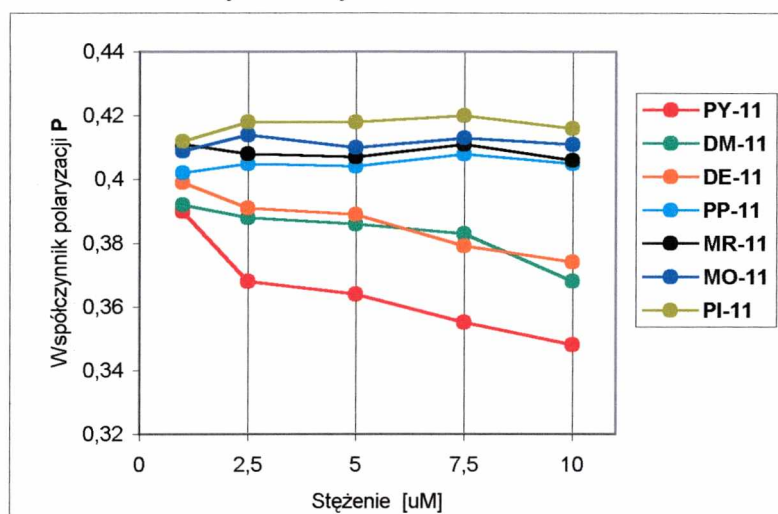
5.5.4. Wpływ laurynianów na płynność błony erytrocytów.

Badania fluorymetryczne, pozwalające wyznaczyć współczynniki polaryzacji **P** błony erytrocytów modyfikowanych badanymi związkami, wykonano podobnie jak dla serii związków **DM-n**. Wartości obliczonych współczynników przedstawiono na Rys.14.

Związki **PY-11**, **DM-11** i **DE-11** powodują zmniejszenie wartości współczynnika polaryzacji (wzrost płynności błony), w zakresie stężeń 1 – 10 μM , w stosunku do krwinek niemodyfikowanych; współczynnik ten maleje wraz ze wzrostem stężenia związku. Dla pozostałych związków współczynnik polaryzacji maleje w mniejszym stopniu. Także i w tym przypadku stwierdzono zależność układającą się w podobny szereg:

$$\text{PY} > \text{DM} > \text{DE} > \text{PP} > \text{MR} > \text{PI}$$

Rys. 14. Współczynnik polaryzacji P w funkcji stężenia badanych laurynianów.



$P_{\text{KONTROLI}} = 0.417$

5.6. Estry 2-imidazoloetylowe kwasów tłuszczowych **IM-n**.

Badania nad wpływem ugrupowania aminowego (polarnej główki) aminoestrów rozszerzono na pochodne imidazolu, syntezując grupę estrów imidazoloetylowych kwasów tłuszczowych **IM-n**. Wybór imidazolu wynikał z faktu iż wiele pochodnych imidazolu znalazło zastosowanie jako fungicydy stosowane zarówno w medycynie ludzkiej jak i ochronie roślin. N–dodecyloimidazol jest ponadto traktowany jako wzorcowa substancja lizosomotropowa i w tym kierunku był szeroko badany [40,42]. Imidazol charakteryzuje się ponadto obecnością drugiego atomu azotu i stosunkowo niską zasadowością. Badania nad tą grupą aminoestrów opisuję więc odrębnie.

W syntezie estrów imidazoloetylowych **IM-n** natrafiłem na trudności, w szczególności podczas syntezy wyjściowego imidazoloetanolu. Pomyślnym rozwiązaniem było przeprowadzenie tej syntezy przez alkilowanie soli sodowej imidazolu chlorohydryną etylenową. Dalsze trudności wystąpiły przy izolowaniu chlorowodorków **IM-n**, a korzystnym okazało się strącanie tych estrów w postaci szczawianów; w dalszych pracach udało się jednak uzyskać niektóre chlorowodorki w stanie czystym.

Badania nad hamowaniem wzrostu drożdży wykonano na szczepie Σ 1278b *S.cerevisiae* w sposób standardowy testując szczawiany imidazoloestrów **IM-n_s**. Badania przeprowadzono dla dwu wartości pH podłoża i dokonując odczytu po 4, 8 i 10 dniach inkubacji. Uzyskane wyniki przedstawiono w Tabelach 19 i 20.

Tabela 19. Zdolność hamowania wzrostu drożdży *S.cerevisiae* przez szczawiany imidazoloestrów **IM-n_s** w zależności od czasu inkubacji, przy pH 6.0.

Czas inkubacji (dni)	Związek	Procent jednostek tworzących kolonię przy stężeniu [μ M]				
		1000	100	10	1	Kontrola
4	IM-9_s	0	0	93	100	100
	IM-11_s	0	40	85	65	100
	IM-13_s	43	68	100	83	100
	IM-15_s	100	100	76	89	100
8	IM-9_s	0	0	91	100	100
	IM-11_s	0	42	85	65	100
	IM-13_s	43	70	100	83	100
	IM-15_s	100	99	74	92	100
10	IM-9_s	0	0	91	100	100
	IM-11_s	0	42	85	65	100
	IM-13_s	43	70	100	83	100
	IM-15_s	100	97	73	91	100

Tabela 20. Zdolność hamowania wzrostu drożdży *S.cerevisiae* przez szczawiany imidazoloestrów **IM-n_s** w zależności od czasu inkubacji, przy pH 8.0.

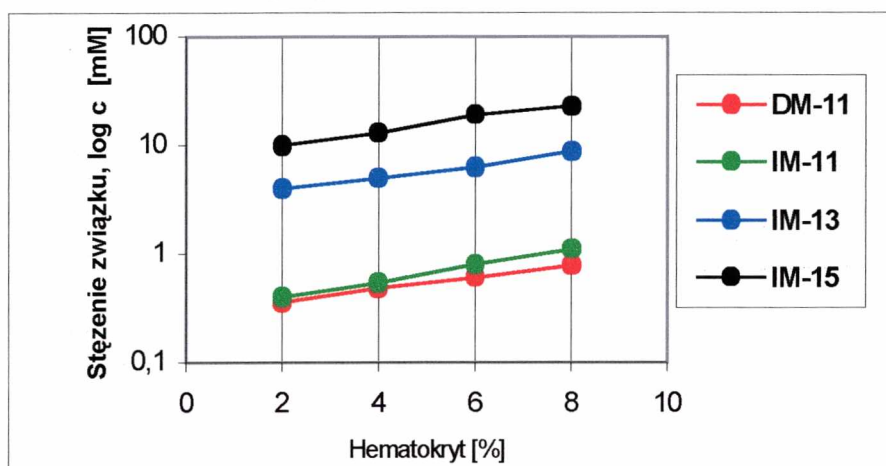
Czas inkubacji (dni)	Związek	Procent jednostek tworzących kolonię przy stężeniu [μ M]				
		1000	100	10	1	Kontrola
4	IM-9_s	0	0	1	100	100
	IM-11_s	0	0	0	31	100
	IM-13_s	0	72	100	100	100
	IM-15_s	100	88	99	85	100
8	IM-9_s	0	0	2	100	100
	IM-11_s	0	0	18	31	100
	IM-13_s	2	85	100	100	100
	IM-15_s	100	96	100	85	100
10	IM-9_s	0	0	3	100	100
	IM-11_s	0	0	20	32	100
	IM-13_s	2	85	100	100	100
	IM-15_s	100	96	100	87	100

Uzyskane wyniki wskazują na podobne działanie imidazoloestrów jak i wcześniej badanych aminoestrów o innej polarnej główce. Także i w tym przypadku najbardziej aktywnym okazał się ester o 11-towęgłowym łańcuchu alkilowym, jednak niewiele ustępuje mu związek o krótszym łańcuchu; związki o najdłuższych łańcuchach okazały się być mniej aktywne. Wyższą aktywność obserwowano dla wyższych wartości pH. Nie obserwowano występowania wtórnego wzrostu drożdży przy przedłużonym czasie inkubacji.

Badania zdolności hemolitycznej przeprowadzono na chlorowodorkach imidazoloestrów w sposób wcześniej opisany, porównując ich aktywność hemoli-

tyczną do aktywności dimetyloaminopochodnej **DM-11**. Wyniki badań przedstawia Rys. 15.

Rys. 15. Zależność stężenia związku powodującego 100% hemolizę erytrocytów od hematokrytu.



Jak widać zdolność hemolityczna imidazoloestrów **IM-n** układu się nieco inaczej. Najbardziej aktywnym hemolitycznie okazał się ester **IM-11**, a jego aktywność jest porównywalna z aktywnością pochodnej dimetyloaminowej **DM-11**. Aktywność hemolityczna maleje wraz z wydłużaniem łańcucha alkilowego i jest najniższa dla związku **IM-15**. W tym względzie pochodne imidazolowe zachowują się odmiennie niż pozostałe aminoestry.

5.7. Badania biologiczne alkilopochodnych pirolidyny **PYL-n**.

N-Alkilopochodne pirolidyny zsyntezowano w celu uchwycenia wpływu budowy rodniaka hydrofobowego aminoestrów przez porównanie ich z pochodnymi alkilowymi. Do tego celu wybrano pochodne pirolidyny, gdyż ester pirolidynoetylowy **PY-11** był w dotychczasowych badaniach najbardziej aktywnym.

W Tabelach 21 i 22 przedstawiono wyniki badania aktywności hamowania wzrostu drożdży *S.cerevisiae* przez N-alkilopirolidyny **PYL-n**, w porównaniu do pirolidynoestru **PY-11**, a także metylobromków obu tych ugrupowań.

Tabela 21. Zdolność hamowania wzrostu drożdży *S.cerevisiae* przez pochodne pirolidyny przy pH 6.0.

Związek	Procent jednostek tworzących kolonie przy stężeniu związku [μM]				
	1000	100	10	1	0.1
PY-11	0	0	56	69	86
PYL-10	0	2	65	97	99
PYL-12	0	0	58	97	99
PYL-14	0	0	35	53	84
PYL-16	0	0	26	56	100
PYM-11	0	0	83	100	100
PYLM-12	0	0	86	100	100
PYB	53	81	80	81	90

Tabela. 22. Zdolność hamowania wzrostu drożdży *S.cerevisiae* przez pochodne pirolidyny przy pH 8.0.

Związek	Procent jednostek tworzących kolonie przy stężeniu związku [μM]				
	1000	100	10	1	0.1
PY-11	0	0	0	78	79
PYL-10	0	3	76	88	95
PYL-12	0	0	0	76	80
PYL-14	0	0	0	80	82
PYL-16	0	0	1	83	91
PYM-11	0	0	50	60	79
PYLM-12	0	0	49	58	76
PYB	9	54	63	66	77

Jak widać alkilopochodne pirolidyny charakteryzują się podobną aktywnością jak pirolidynoester **PY-11**, jednak aktywność rośnie nieznacznie wraz z długością łańcucha alkilowego; związki zawierające 12, 14 i 16 atomów węgla w łańcuchu mają niemal identyczną aktywność. Czwartorzędowe sole amoniowe **PYM-11** i **PYLM-12** mają aktywność w stosunku do drożdży niższą niż trzeciorzędowe aminy, z których je otrzymano. Uzyskane wyniki wskazują, że ugrupowanie estrowe będące fragmentem hydrofobowego rodnika aminoestrów nie utrudnia ich wbudowywania się w błony biologiczne. Na podstawie uzyskanych wyników można też przypuszczać, że hydrofobowe ugrupowanie aminoestrów wbudowuje się w błonę wraz fragmentem estrowym i fragmentem etylowym pochodzącym od aminoetanolu, a więc jest ono w rzeczywistości dłuższe niż to wynika z ilości atomów węgla w rodniku kwasu tłuszczowego. Przypuszczenie to wymaga jednak weryfikacji w odrębnie przeprowadzonych badaniach biofizycznych.

Wyniki pomiarów inhibicji aktywności H^+ -ATPazy błony komórkowej drożdży *S.cerevisiae* przedstawia Tabela 23.

Tabela 23. Hamowanie *in vitro* aktywności H^+ -ATPazy przez pochodne pirolidynowe.

Związek	I_{50} [μ M]
PY-11	18
PYL-10	63
PYL-12	12
PYL-14	14
PYL-16	20
PYM-11	24
PYLM-12	12
PYB	> 1000

Wskazują one, że N-alkilopochodne pirolidyny są inhibitorami H^+ -ATPazy o aktywności zbliżonej do aminoestrów; najaktywniejszym okazał się związek **PYL-12** i jego metylobromek **PYLM-12**. Benzoesan pirolidynoetylowy **PYB** charakteryzuje się bardzo niską aktywnością, podobnie jak w teście na hamowanie wzrostu drożdży, co wskazuje, że długi łańcuch hydrofobowy jest nieodzownym fragmentem cząsteczki odpowiedzialnym za wbudowywanie się związku w błonę, jak i za aktywność biologiczną substancji.

5.8. Wartości stałych dysocjacji kwasowej pK_a .

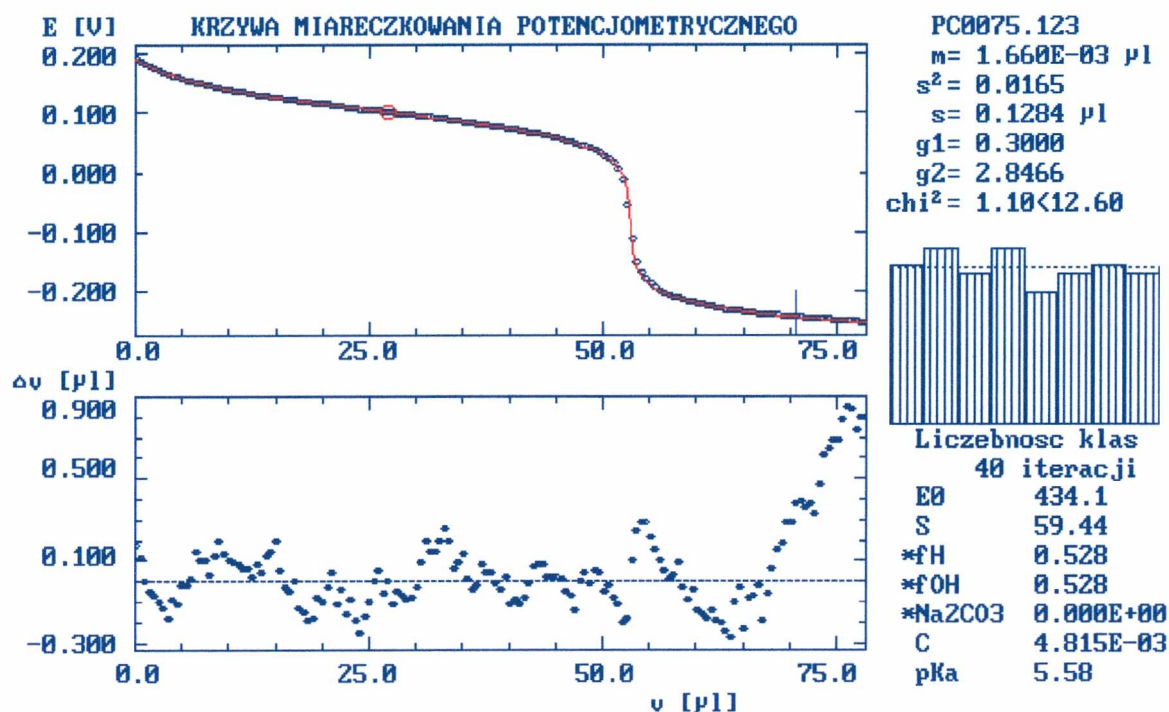
Spodziewając się zależności aktywności biologicznej od zasadowości badanych aminoestrów, wyznaczyłem wartości ich pK_a metodą miareczkowania potencjometrycznego. Na Rys. 16 podano przykładową krzywą miareczkowania i dane do obliczeń dokonywanych komputerowo. W Tabeli 24 zebrano oznaczone wartości pK_a dla badanych aminoestrów porównując je z danymi literaturowymi [113] dla wyjściowych drugorzędowych amin oraz ich metylo- i etylopochodnych. Zamieszczone w tabeli dane dotyczą pK_a aminoestrów po przeliczeniu dla roztworu wodnego.

Jak widać z tabeli wartości pK_a aminoestrów układają się w ten sam szereg zależności jak aktywność hamowania wzrostu drożdży oraz inhibicja H^+ -ATPazy błony komórkowej drożdży, a także aktywność hemolityczna. Można więc uznać, że zasadowość badanych związków odgrywa zasadniczą, obok długości hydrofobowego łańcucha i budowy hydrofilowego fragmentu cząsteczki, rolę w aktywności biologicznej. Przy czym warto zauważyć, że wartości pK_a aminoestrów układają się w takim samym szeregu jak wyjściowych amin drugorzędowych; może to być wskazówką dla projektowania nowych struktur związków.

Jedynie pochodna imidazolowa nie spełnia zależności. Związek **IM-11** charakteryzuje się stosunkowo słabą zasadowością (pK_a 5.85), a mimo to jest on silnie aktywny w hamowaniu wzrostu drożdży oraz silnie hemolizuje krwinki. Może to świadczyć, że jego aktywność zależna jest od innych jeszcze czynników

i nie można wykluczyć iż wiąże się to ze zdolnością pochodnych imidazolu inhibicji C-14 demetylacji w biosyntezie ergosterolu.

Rys. 16. Przykład obrazu ekranu po zakończeniu obliczeń stałej dysocjacji.



Objaśnienia: górny wykres przedstawia zmierzoną krzywą miareczkowania (kółka) wraz z krzywą obliczoną (linia ciągła); dolny rysunek jest wykresem reszt; z prawej strony podano wartości średniej z reszt (m), wariancji (s^2), odchylenia standardowego (s), współczynników statystycznych ($g1$), ($g2$) i χ^2 (χ^2); wykres słupkowy ilustruje liczebność poszczególnych klas testu χ^2 ; u dołu podano końcowe wartości parametrów dopasowania (wyraz wolny ($E0$) i nachylenie charakterystyki elektrody (S), współczynniki aktywności jonów wodorowych (fH) i wodorotlenowych (fOH), stężenie węgla w odczynniku miareczkującym (Na_2CO_3), stężenie miareczkowanej soli (C) oraz wartość stałej dysocjacji kwasowej (pK_a). Gwiazdką (*) oznaczono parametry nie dopasowywane.

Uzyskane wyniki wskazują ponadto, że obok zasadowości aminoestru ważny wpływ na jego aktywność wywiera rozmiar hydrofilowej główki. Pochodna **MO-11** mimo wysokiej wartości pK_a jest słabo aktywna, a wysoką aktywność obserwuje się dla tych pochodnych, w których z atomem azotu główki związanym jest nie więcej niż 4 atomy węgla. Dodanie piątego atomu węgla obniża aktywność pochodnej piperydynowej **PP-11** mimo jej dużej zasadowości.

Tabela 24. Zmiany wartości pK_a w zależności od trzeciorzędowego podstawnika.

SYMBOL ZWIĄZKU	pK_a				Obniżenie pK_a aminoestru w stosunku do wyjściowej aminy	
	Amina drugorzę- dowa	Metylo- pochodna	Etylo- pochodna	Amino- ester	Wartość -wo	Procent owo
DM-9	10.92	9.90	10.16	8.06	2.86	25.4
DM-11						
DM-13						
DM-15						
PY-11	11.28	10.32	-	8.41	2.87	25.4
DM-11	10.92	9.90	10.16	8.06	2.86	25.4
DE-11	11.04	10.46	10.80	8.41	2.59	23.5
PP-11	11.28	10.07	10.45	8.26	3.02	26.8
MO-11	-	-	-	8.10	-	-
MR-11	8.33	7.38	7.67	5.82	2.51	30.1
PI-11	5.29	5.99	5.92	4.92	0.37	7.0
IM-11	7.09	7.20	7.30	5.89	1.20	16.9
PYL-12	11.28	10.32	-	> 12.0	2.87	25.4

5.9. Właściwości powierzchniowoczynne wybranych aminoestrów i soli czwartorzędowych.

Badane substancje w formie protonowanej przyjmują postać kationowego środka powierzchniowoczynnego i powinny wykazywać zdolność do micelowania. Należy równocześnie stwierdzić, że związki te jedynie w postaci pojedynczych cząsteczek mogą wykazywać zdolność do wbudowywania się w błony, do czego nie są zdolne w postaci miceli [73]. W związku z tym dokonałem pomiarów przewodnictwa (metoda konduktometryczna) roztworów wybranych związków w zależności od stężenia. Dla porównania, tego samego typu pomiarów dokonałem dla wybranych metylobromków odpowiednich aminoestrów.

Przy wykonywaniu pomiarów, mających na celu wyznaczenie c.m.c. dla badanych aminoestrów, napotkałem na poważne trudności. Większość wodnych roztworów była mętna, tworząc trwałą emulsję. Należy pamiętać, że aminoestry występują w stanie równowagi dynamicznej obydwu form. Forma nieprotonowana jest nierozpuszczalna w wodzie i ma postać niejonowego środka powierzchniowoczynnego. Uzyskane wyniki pomiarów przewodnictwa dały możliwość wykreślenia wykresów, z których jedynie w sposób przybliżony można było wyznaczyć c.m.c.; ja określiłbym je jako *pseudo*-c.m.c. Tego typu trudności nie zauważyłem przy wyznaczaniu c.m.c. dla soli czwartorzędowych. Wyznaczone przybliżone wartości c.m.c. są do siebie zbliżone i porównywalne z c.m.c. dla soli czwartorzędowych. Mogę również stwierdzić, że w związku z występowaniem aminoestrów w roztworze w stanie dynamicznej równowagi, wyznaczenie ściśle zdefiniowanych wartości c.m.c. zastosowaną metodą nie jest możliwe.

W Tabeli 25 zebrałem oznaczone wartości c.m.c. dla grupy laurynianów aminoetylowych oraz wybranych czwartorzędowych soli amoniowych, zamieszczając w niej dla porównania wartości pK_a , MIC dla drożdży oraz I_{50} . Jak widać brak jest wyraźnej korelacji między c.m.c a pozostałymi własnościami. Sądzę, że zdolność do micelowania prawdopodobnie odgrywa jakąś rolę w aktywności badanych aminoestrów, wpływa ona bowiem na wbudowywanie się związków w błonę i być może na inhibicję aktywności H^+ -ATPazy, jednak na podstawie uzyskanych wyników nie można tego jednoznacznie stwierdzić.

Tabela 25. Wybrane właściwości fizykochemiczne i aktywność biologiczna grupy aminoestrów i soli czwartorzędowych.

SYMBOL ZWIĄZKU	pK _a	MIC*	I ₅₀ **	c.m.c. [M] x 10 ³
DM-11	8.06	5	21	7.3
PY-11	8.41	5	11	7.1
DE-11	8.45	5	18	8.9
PP-11	8.26	10	11	6.7
MR-11	5.82	50	30	7.6
MO-11	8.10	500	-	?
PI-11	4.92	>1000	1300	?
DMM-11	-	10	12	5.9
PYM-11	-	50	-	6.2

* - minimalne stężenie hamujące rozwój komórek drożdży *S.cerevisiae* [μM] przy pH 8.0

** - hamowanie *in vitro* aktywności H⁺-ATPazy drożdży *S.cerevisiae* [μM] przy pH 7.5

5.10. Określenia aktywności fungicydowej dla wybranych drożdżopodobnych mikroorganizmów.

Minimalne stężenie inhibicyjne (MIC) pochodnych **DM-n** określono dla drożdżopodobnych mikroorganizmów pochodzenia klinicznego. Podobnie jak dla drożdży i w tym przypadku najwyższą aktywność wykazały estry 2-dimetyloaminowe **DM-11** i **DM-13**; dlatego też w Tabeli 26 przedstawiono wyniki tylko dla tych dwóch związków. Potwierdziła się, również w tym przypadku, wysoka aktywność badanych aminoestrów, chociaż ich minimalne stężenie inhibicyjne w stosunku do grzybów jest słabsze niż w stosunku do drożdży.

Tabela 26. Minimalne stężenie hamujące rozwój wybranych drożdżopodobnych grzybów przez związki **DM-11** i **DM-13**.

Rodzaj grzyba	Minimalne stężenie hamujące [μM]	
	DM-11	DM-13
<i>Candida krusei</i>	100	100
<i>Candida pseudotropicalis</i>	120	100
<i>Candida parapsilosis</i>	70	50
<i>Candida quilliermondi</i>	70	50
<i>Torulopsis glabrata</i>	130	130
<i>Trichosporon cutaneum</i>	70	50
<i>Geotricium candidum</i>	50	50

5.11. Aktywność bakteriobójcza wybranych związków

Bardzo wysoka aktywność biologiczna wyselekcjonowanych aminoestrów skłoniła mnie do przekazania ich do badań nad ich aktywnością bakteriobójczą. Zostały one przebadane jako środki bakteriobójcze wobec mikroorganizmów wyjątkowo opornych na antybiotyki i obecnie stosowane w szpitalach środki dezynfekcyjne. Bakterie, na których został przeprowadzony test, mają wyjątkową łatwość wytwarzania mutantów opornych na stosowane środki, są szczególnie niebezpieczne w salach operacyjnych. Uzyskane wyniki badań aktywności bakteriobójczej przedstawiono w Tabeli 27. Z przeprowadzonych testów wynika, że zaproponowane przeze mnie aminoestry wykazują wysoką aktywność bakteriobójczą i mogą być stosowane w stężeniach niższych niż dotychczas stosowane środki bakteriobójcze. Dodatkową ich zaletą jest to, że dobrze rozpuszczają się w wodzie i są substancjami bezwonnyymi. Własności te oraz wysoka aktywność wobec opornych szczepów bakterii wskazują na potencjalną możliwość wykorzystania ich do dezynfekcji pomieszczeń i sprzętu szpitalnego.

Tabela 27. Aktywność bakteriobójcza wybranych związków.

Szczepy bakterii	DM-11					PY-11					PYL-12				
	Stężenie					Stężenie					Stężenie				
	0.5% 1.62 $\times 10^{-2}M$	0.25% 8.10 $\times 10^{-3}M$	0.125% 4.05 $\times 10^{-3}M$	0.06% 2.02 $\times 10^{-3}M$	0.03% 1.01 $\times 10^{-3}M$	0.5% 1.5 $\times 10^{-2}M$	0.25% 7.5 $\times 10^{-3}M$	0.125% 3.75 $\times 10^{-3}M$	0.06% 1.87 $\times 10^{-3}M$	0.03% 9.37 $\times 10^{-4}M$	0.5% 1.73 $\times 10^{-2}M$	0.25% 8.64 $\times 10^{-3}M$	0.125% 4.32 $\times 10^{-3}M$	0.06% 2.16 $\times 10^{-3}M$	0.03% 1.08 $\times 10^{-3}M$
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Pałeczka ropy błękitnej	+	+	+/-	+/-	-	+	+	+	+/-	+/-	+	+/-	+/-	+/-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> Paciorkowce kałowe	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i> Gronkowiec złocisty	+	+	+	+/-	-	+	+	+	+	+/-	+	+	+	+	+/-
<i>Proteus vulgaris</i> Pałeczka odmienia	+	+	+	+	+/-	+	+	+	+	+/-	+	+	+	+	+
<i>Escherichia coli</i> Pałeczka okrężnicy	+	+	+/-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+

+ całkowite zahamowanie wzrostu, +/- częściowe zahamowanie wzrostu, - brak widocznych zmian we wzroście

6. PODSUMOWANIE WYNIKÓW I WNIOSKI

Przedstawione wyniki badań udowodniły słuszność postawionej tezy iż trzeciorzędowe aminy typu lizosomotropowych surfaktantów charakteryzują się aktywnością biologiczną bardzo zbliżoną do czwartorzędowych soli amoniowych o analogicznej strukturze. Założona w badaniach struktura estrów 2-aminoetylowych kwasów tłuszczowych okazała się nośnikiem aktywności biologicznej często przewyższającej aktywność analogicznych soli amoniowych. Są to przy tym – zgodnie z założeniem - substancje podatne na hydrolityczny rozkład do nieaktywnych metabolitów.

Z uzyskanych wyników można wnioskować, że mechanizm działania badanych aminoestrów polega – podobnie jak soli amoniowych o charakterze kationowych surfaktantów – na oddziaływaniu na błony biologiczne poprzez inkorporację do tych błon i wpływ na transportowe własności błony. Badane aminoestry okazały się bardzo aktywnymi inhibitorami aktywności H^+ -ATPazy błony komórkowej drożdży i można wnosić, że H^+ -ATPazy stanowią podstawowe miejsce ich działania.

Zaplanowana sekwencja badań umożliwiła dość szczegółowe poznanie zależności struktura – aktywność biologiczna, co pozwoliło na opracowanie kolejnego wniosku badawczego przyjętego do finansowania przez KBN, podobnie jak finansowany był wniosek badawczy, którego fragmenty stanowią badania ujęte w niniejszej rozprawie.

Opracowane związki znajdują prawdopodobnie zastosowanie do dezynfekcji pomieszczeń i sprzętu szpitalnego, w związku z wykrytą silną aktywnością bakteriobójczą w stosunku do opornych bakterii pochodzenia klinicznego. Możliwe jest również wykorzystanie badanych związków w chemioterapii, w tym chemioterapii nowotworów, wymaga to jednak dalszych badań, do których poczyniono przygotowania.

Na podstawie wykonanych badań nad syntezą i własnościami biologicznymi lizosomotropowych estrów 2-aminoetylowych kwasów tłuszczowych można przedłożyć następujące wnioski:

- Badana grupa substancji lizosomotropowych stanowi pochodne łatwe do syntezy, co rokuje korzystnie w przypadku ich praktycznego wykorzystania.
- Badane substancje wykazują bardzo interesującą aktywność biologiczną o czym świadczy niskie stężenie hamujące wzrost drożdży (ok. 10 μM) oraz aktywności H^+ -ATPazy błony komórkowej drożdży (I_{50} ok. 10 μM), a także aktywność hemolityczna erytrocytów (ok. 10 mM). Stanowią one przy tym nową grupę inhibitorów H^+ -ATPazy.
- Aktywność aminoestrów zależna jest od pH, co świadczy o ich lizosomotropowym charakterze.
- Biologiczna aktywność aminoestrów zależy od ich budowy, a w szczególności od:
 - długości hydrofobowego łańcucha (maksimum dla 11–13 atomów węgla),
 - rozmiarów fragmentu hydrofilowego (maksimum dla związków zawierających przy atomie azotu podstawniki o nie więcej niż 4 atomach węgla łącznie).
- Najistotniejszy wpływ na aktywność aminoestrów wykazuje jednak ich zasadowość (określana przez pK_a), która determinuje stan dynamicznej równowagi pomiędzy protonowaną i nieprotonowaną formą aminoestru; najwyższą aktywność wykazują związki o najwyższym pK_a (powyżej 8.0).
- Zamiana rodnika alkilowego na rodnik zawierający ugrupowanie estrowe nie obniża, a raczej wpływa korzystnie na aktywność biologiczną. Można przypuszczać, że fragment estrowy wraz z grupą etylową i rodnikiem alkilowym stanowią razem hydrofobową część aminoestru, wbudowywującą się w lipidową dwuwarstwę błony biologicznej.
- Badane związki mają zdolność wbudowywania się w błony biologiczne, a przez to wpływania na procesy transportowe w komórce; w tym względzie istnieje podobieństwo pomiędzy aminoestrami a czwartorzędowymi solami

amoniowymi o zbliżonej strukturze. Aktywność aminoestrów w szeregu przypadkach przewyższa aktywność soli amoniowych, co wynika prawdopodobnie ze zdolności ich przenikania przez błony biologiczne i migracji w komórce. Aktywną formą aminoestru oddziaływującą na błony jest jego protonowana postać, powstała po wychwyceniu protonu z otoczenia, do którego dotarł w komórce.

- Właściwości powierzchniowe, a szczególnie zdolność do micelowania, wydają się mieć wpływ na aktywność biologiczną związku, jednak stan dynamicznej równowagi uniemożliwia precyzyjne wyznaczenie c.m.c. metodą pomiaru przewodnictwa.
- Uzyskane rezultaty pozwoliły opracować zależność struktura – aktywność i mogą stanowić podstawę racjonalnego projektowania substancji lizosomotropowych.
- Stwierdzono silne działanie bakteriobójcze badanych aminoestrów w stosunku do chorobotwórczych bakterii, co rokuje nadzieje na ich zastosowanie do dezynfekcji pomieszczeń i sprzętu szpitalnego zakażonych bakteriami odpornymi na antybiotyki i dotychczas stosowane środki dezynfekcyjne. Inną możliwością stosowania badanych związków jest terapia przeciwnowotworowa, te jednak badania są dopiero na etapie wstępnym. Badane substancje mają również działanie przeciwgrzybicze, w szczególności na grzyby z rodzaju *Candida*, jest ono jednak słabsze niż w stosunku do drożdży *S.cerevisiae*. Jest to potencjalny obszar ich praktycznego wykorzystania.

7. PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

1. B.C.Monk, A.B.Mason, T.B.Kardos, D.S.Perlin, *Acta Biochim. Polonica*, 1995, **42**, No.4, 481-496
2. A.de la Maza, J.L.Parra, *Biophys.J.*, 1997, **72**, 1668-1675
3. R.D.Klausner, A.M.Kleinfeld, R.L.Hoover, M.J.Karnovsky, *J.Biol.Chem.*, 1980, **225**, 1286-1296
4. A.P.Hornby, R.P.Cullis, *Biochim.Biophys.Acta*, 1981, **647**, 285-292
5. P.Seeman, *Biochem.Pharm.*, 1972, **15**, 1753-1766
6. S.Almog, B.J.Litman, W.Wimley, J.Cohen, E.J.Wachtel, Y.Barneholz, A.ben-Shaul, D.Lichtenberg, *Biochemistry*, 1990, **29**, 4582-4592
7. M.Breton, C.Wolf, O.Colard, *Biochim.Biophys.Acta*, 1983, **117**, 809-816
8. A.N.Petocchi, *Antiseptics and Disinfectants*, 1983, **14**, 309-329
9. F.Devinsky, J.Lacko, F.Bittererova, D.Mlynarcik, *Chem.Papers.*, 1987, **41**, 803-814
10. F.Devinsky, L.Krasnec, J.Lacko, D.Mlynarcik, V.Racansky, *Tenside Deterg.*, 1985, **22**, 10-15
11. J.Gabrielska, S.Przestalski, M.Oświęcimska, S.Witek, *Studia Biophysica*, 1984, **102**, No.1, 5-13
12. M.Rucka, M.Oświęcimska, S.Witek, *Envir.Protect.Eng.*, 1983, **9**, No.3, 25-31
13. J.Kuczera, T.Janas, S.Przestalski, S.Witek, M.Oświęcimska, *Stud.Biophys.*, 1985, **105**, 167-176
14. T.M.Lachowicz, S.Witek, J.Łuczyński, R.Witkowska, A.Bałakuszew (Krasowska), H.Kleszczyńska, T.Kral, J.Kuczera, S.Przestalski, *Folia Microbiol.*, 1996, **41**, 102-105
15. U.Antoni, C.Christophersen, L.Hougaard, P.Nielsen, *Comp.Biochem. Physiol*, 1991, **99B**, 1-18
16. E.A.Weretinyk, S.Bednarek, K.F.McCue, D.Rhodes, A.D.Hanson, *Planta*, 1989, **178**, 342
17. L.Csonka, *Microbiol.Rev.*, 1989, **53**, 121

18. D.M.J.Dickson, G.D.Kirst, *New Phytol.*, 1987, **106**, 645
19. T.Nakanishi, M.B.Burg, *Am.J.Physiol.*, 1989, **257**, 964
20. A.J.Barak, H.C.Beckenbauer, *Biochem.Arch.*, 1986, **2**, 351
21. S.Berking, *Differentiation* (Berlin), 1986, **32**, 10
22. H.R.Scholte, I.Luyt-Houwen, M.Vanndrager-Verduin, W: *Lipid metabolism in the normoxic and ischaemic heart*, Springer Verl., New York 1987, p.63
23. S.Witek, Materiały IV Sympozjum „Czwartorzędowe sole amoniowe i ich zastosowanie w gospodarce”, Poznań, 1998, s.9-20
24. J.Górska-Poczopko, S.Witek, *Abh.Akad.d.Wiss.DDR*, 1982, **1**, 271
25. M.Rucka, M.Oświęcimska, S.Witek, *Environ.Protec.Eng.*, 1980, **6**, 455; 1981, **7**, 45
26. J.Kołodzyński, S.Ułaszewski, D.Grobelny, R.Witkowska, S.Witek, T.M.Lachowicz, *Acta Microbiol. Polon.*, 1984, **33**, 119
27. J.Skała, G.Orłowska-Matuszewska, M.Misiewicz, M.Oświęcimska, S.Witek, Z.Kotylak, *Acta Microbiol. Polon.*, 1988, **37**, 249
28. E.Obłąk, T.Lachowicz, S.Witek, *Folia Microbiol.*, 1996, **41**, 116
29. J.Gabrielska, D.Grobelny, J.Kuczera, S.Przestalski, S.Witek, R.Żyłka, *Stud.Biophys.*, 1979, **77**, 193
30. J.Piątkowski, *Auksotrofia a wrażliwość drobnoustrojów na czwartorzędowe sole amoniowe*, rozprawa doktorska, Uniwersytet Wrocławski, Wrocław 1993
31. R.Thompson, *Amphiphilic glycine-based esters as soft antimicrobial agents*, PhD Thesis, Goeteborg 1992
32. E.Obłąk, S.Ułaszewski, T.Lachowicz, *Acta Microbiol. Polon.*, 1988, **37**, 261
33. A.Krasowska, *Wpływ wybranych aminoestrów na fizjologię drożdży piekarniczych Saccharomyces cerevisiae*, rozprawa doktorska, Uniwersytet Wrocławski, Wrocław 1998
34. T.Lachowicz, J.Piątkowski, S.Witek, *Pestic. Sci.*, 1995, **43**, 105
35. C.deDuve, T.deBarsy, B.Poole, A.Trouet, P.Tulkens, F.vanHoof, *Biochem. Pharmacol.*, 1974, **23**, 2495
36. G.M.Dubowchik, S.L.Gawlak, R.A.Firestone, *Bioorg.Med.Chem.Letters*, 1995, **5**, 893
37. D.K.Miller, E.Griffits, J.Lenard, R.A.Firestone, *J.Cell Biol.*, 1983, **97**, 1841

38. E.Uchida, Y.Oshumi, Y.Anraku, *J.Biol.Chem.*, 1985, **260**, 1090
39. S.Ohkuma, B.Poole, *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*, 1978, **75**, 3327
40. R.A.Firestone, J.M.Pisano, R.J.Bonney, *J.Med.Chem.*, 1979, **22**, 1130
41. M.J.Boyer, I.Horn, R.A.Firestone, D.Steele-Norwood, I.F.Tannock, *Br.J. Cancer*, 1993, **67**, 81
42. M.Hussain, M.J.Leibowitz, J.Lenard, *Antimicrob.Agents Chemother.*, 1987, **31**, 512
43. J.L.Wike-Hooley, J.Haveman, J.S.Reinhold, *Radiother.Oncol.*, 1984, **2**, 343
44. J.P.Jaffrezou, G.Laurent, *FEBS Lett.*, 1993, **323**, 191
45. G.M.Dubowchik, L.Padilla, K.edinger, R.A.Firestone, *Biochim.Biophys. Acta*, 1994, **1191**, 103
46. G.M.Dubowchik, S.L.Gawlak, R.A.Firestone, *Bioorg.Med.Chem.Lett.*, 1995, **5**, 893
47. Y.Kahinuma, Y.Oshumi, Y.Anraku, *J.Biol.Chem.*, 1981, **256**, 10859
48. P.Matile, *Annu.Rev.Plant.Physiol.*, 1978, **29**, 193
49. E.W.Johnes, *Annu.Rev.Genet.*, 1984, **18**, 233
50. T.M.Lachowicz, S.Witek, J.Łuczyński, R.Witkowska, H.Kleszczyńska, S.Przestalski, *Folia Microbiol.*, 1997, **42**, 231
51. H.Kleszczyńska, J.Łuczyński, S.Witek, S.Przestalski, *Z. Naturforsch.*, 1998, **55c**, 101
52. H.Kleszczyńska, J.Łuczyński, S.Witek, S.Przestalski, *Polish J.Environ. Studies*, 1997, **6**, 21
53. S.Witek, A.Goffeau, J.Nader, J.Łuczyński, T.M.Lachowicz, B.Kuta, E.Obłąk, *Folia Microbiol.*, 1997, **42**, 252
54. J.Kuczera, S.Witek, H.Kral, J.Hładyszowski, J.Łuczyński, S.Przestalski, *Z. Naturforsch.*, 1998, **53c**, 389
55. J.Łuczyński, M.Oświęcimska, M.Radomska, R.Radomski, S.Witek, *Materiały II Kongresu Technologii Chemicznej*, Wrocław, 1997, **t.II**, 495
56. T.M.Lachowicz, A.Krasowska, J.Łuczyński, S.Witek, *Folia Microbiol.*, 1998, **43**, 201
57. S.Witek, M.Kończkowski, T.M.Lachowicz, A.Kończkowska, J.Łuczyński, A.Goffeau, *Folia Microbiol.*, 1998, **43**, 214

58. M.Kołaczkowski et al., *J.Biol.Chem.*, 1996, **271**, 31543
59. M.Kołaczkowski, A.Kołaczkowska, J.Łuczyński, S.Witek, A.Goffeau, *Microb. Drug Resistance*, 1998, **4**, 143
60. S.Przestalski, *Proc. of 12th School on Biophysics of Membrane Transport*. (red. S.Przestalski, J.Kuczera, H.Kleszczyńska), 1994, **t. I**, 9
61. E.Sackmann, *Physical basis of self-organization and function of membranes: physics of vesicles*. (red. R.Lipowsky, E.Sackmann), Elsevier Science, Amsterdam, New York, Tokyo, 1995
62. R.Sherrer, R.L.Louden, P.Gerhardt, *J.Bacteriol.*, 1974, **118**, 534
63. S.J.Singer, G.L.Nicolson, *Science*, 1972, **175**, 720
64. L.D.Bergelson, L.I.Borsukov, *Science*, 1977, **197**, 224
65. R.Serrano, *Mol.Cell.Biochem.*, 1978, **22**, 51-62
66. C.Gancedo, R.Serrano, *The yeast*, 1989, **3**, 2nded., Acad.Press.Inc., New York, 205
67. P.Supplý, A.Wach, A.Goffeau, *J.Biol.Chem.*, 1993, **268**, 19753
68. B.C.Monk, D.S.Perling, *Crit.Rev.Microbiol.*, 1994, **20**, 209
69. A.Helenius, K.Simons, *Biochim.Biophys.Acta*, 1975, **415**, 29
70. D.N.Bhattacharya, R.Y.Kelkar, *J.Colloid Interface Science*, 1983, **92**, 260
71. A.Chattopadhyay, K.G.Harikumar, *FEBS Lett.*, 1996, **391**, 199
72. R.N.Farais, *Adv.Lipid Res.*, 1980, **17**, 251
73. B.Różycka-Roszak, *Proc. of 11th School on Biophysics of Membrane Transport*, 1992, 252
74. D.Lichtenberg, R.J.Robson, E.A.Dennis, *Biochim.Biophys.Acta*, 1983, **737**, 285
75. R.K.Murray, *Erythrocyty i leukocyty.*, Biochemia Harpera., Wydawnictwa Lekarskie PZWL, Warszawa, 866
76. J.W.Karris, R.W.Kellermeyer, *Published for the Commonwealth Fund Harvard University Press Cambridge, Massachusette*, 1972, 448
77. W.D.Stein, *Acad.Press*, London, New York, 1967, 242
78. B.Isomaa, *Biochem.Pharmacol.*, 1979, **28**, 9975
79. K.Mashino, Y.Tanaka, K.Takahashi, K.Inoue, S.Nojima, *J.Biochem.*, 1983, **94**, 821
80. S.Eskelinen, *Can.J.Physiol.Pharmacol.*, 1987, **65**, 2373

81. M.Stasiuk, A.Kozubek, *Cell.Mol.Biol.Lett.*, 1996, **1**, 189
82. M.A.Vives, M.Macian, J.Seguer, M.R.Infante, M.P.Vinardell, *Comp. Biochem.Physiol.*, 1997, **118** C(1), 71
83. B.Deuticke, *Biochim.Biophys.Acta*, 1968, **168**, 494
84. M.P.Sheetz, S.J.Singer, *Proc.Nat.Acad.Sci.*, 1974, **71** (11), 4457
85. T.Fujii, T.Sato, A.Tamura, M.Wakatsuki, Y.Kanaho, *Biochem.Pharmacol.*, 1979, **28**, 613
86. H.Hagerstrand, B.Isomaa, *Biochim.Biophys.Acta*, 1992, **1109**, 117
87. E.P.Solomon, L.R.Berg, D.W.Martin, C.A.Villee, *Biologia*, 1996, MULTICO Oficyna Wydawnicza, Warszawa, 95
88. J.Kowiak, J.Mirecka, M.Olszewska, J.Warchoła, *Podstawy cytofizjologii*, 1995, **15**, 267
89. K.A.Hassall, *The Biochemistry and Uses of Pesticides*, 1990, **12**, 335
90. J.Barbosa, D. Barron, J.L. Beltran, V. Sanz-Nebot, *Anal. Chim. Acta*, 1995, **75**, 317
91. E.Bosch, P. Bou, H. Allemann, M. Roses, *Anal. Chem.*, 1996, **68**, 3651
92. A.Avdeef, J.E.A.Comer, S.J. Thomson, *Anal. Chem.*, 1993, **65**, 42
93. R.Radomski, M.Radomska, M.Dankowski, K.Szajnowska, Z.Wisialski, *Computers Chem.*, 1995, **19**, No. 3, 303
94. D.E.Johnson, C.G.Enke, *Anal.Chem.*, 1974, **42**, 329
95. A.W.Ralston, C.W.Hoerr, E.J.Hoffman, *J.Amer.Chem.Soc.*, 1942, **64**, 97
96. R.A.Thompson, S.Allenmark, *Acta Chim. Scand.*, 1989, **43**, 690
97. A.Goffeau, A.Amory, J.P.Dufour, *Methods in Enzymology*, 1988, **157**, 513
98. A.Goffeau, C.W.Slayman, *Biochem.Biophys.Acta*, 1981, **639**, 197-223
99. A.Koty, *Romanian J.Biophys.*, 1993, **3**, No.1, 17
100. K.Sigler, A.Knotkova, A.Koty, *Biochim. et Biophys. Acta*, 1981, **643**, 572
101. R.S.Haworth, B.D.Lemire, D.Crandall, E.J.Jr.Cragoe, L.Fliegell, *Biochim. et Biophys. Acta*, 1991, **1098**, 79
102. J.R.Lakowicz, *Principles of fluorescence spectroscopy*, 1983, New York, London, Plenum Press., 112
103. L.D.Campbell, R.A.Dwek, *Fluorescence in Biological Spectroscopy*, 1984, The Benjamin Cummings Publishing Company Inc. Menlo Park, London, 91

104. B.R.Lentz, *Spectroscopic Membrane Probes*, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 1988, **1**, 13
105. Z.Kowszyk-Gindifer, W.Sobieszewski, *Grzybice i sposoby ich zwalczania*, 1986, PZWL, Warszawa
106. T.Bergman, M.Vangdal, *Chemotherapy*, 1983, **29**, 104
107. S.Jevons, G.E.Gymer, K.W.Brammer, D.A.Cox, M.R.Leeming, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1979, **15**, 594
108. K.A.McIntyre, J.Galgiani, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1989, **33**, 1095
109. Tao Peng, J.Galgiani, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1993, **37**, 2126
110. E.Sauter, *Występowanie grzybów drożdżopodobnych u dzieci przebywających na leczeniu szpitalnym i ich wrażliwość na nowosyntezowane pochodne aminowe*, praca magisterska, Uniwersytet Wrocławski 1995
111. M.R.McGinnis, *Laboratory handbook of medical mycology*, 1980, Academic. Press, New York
112. A.Kurnatowska, *Wybrane zagadnienia mikologii medycznej*, 1992, Promedi, Łódź
113. D.D.Perrin, *Dissociation constants of organic bases in aqueous solution*, International Union of Pure and Applied Chemistry, 1965, London

Realizacja mojej pracy byłaby niemożliwa bez ścisłej współpracy z zespołami biologów i biofizyków. Była ona dla mnie źródłem satysfakcji, a kontakt ze współpracującymi osobami pozwolił mi na znaczne poszerzenie moich wiadomości z tych – odległych przecież - dziedzin. A przy tym współpraca ta przebiegała w ogromnie życzliwej atmosferze. Nie znajduję słów by w pełni wyrazić moją wdzięczność za to wszystko co dzięki tym wspaniałym ludziom osiągnąłem. W szczególności moje podziękowania kieruję do:

Prof. **Tadeusza M.Lachowicza** z Wyższej Szkoły Pedagogicznej w Zielonej Górze za realizację szeregu badań na drożdżach jak i Jego cenne uwagi i dyskusje;

Prof. **Andre Goffeau** oraz **Josefa Nadera** z Katolickiego Uniwersytetu w Louvain-la Neuve w Belgii za realizację badań nad hamowaniem aktywności H^+ -ATPazy drożdży;

Dr hab. **Haliny Kleszczyńskiej** z Katedry Fizyki i Biofizyki Akademii Rolniczej we Wrocławiu za wykonane badania na erytrocytach, a także pomoc i dyskusje przy interpretacji wyników badań;

Dr **Anny Krasowskiej**, dr **Ewy Obłąk** oraz dr **Małgorzaty Bień** z Instytutu Mikrobiologii Uniwersytetu Wrocławskiego za zrealizowane badania na drożdżach i drożdżopodobnych mikroorganizmach, a także za częste dyskusje, życzliwość i ciepłą atmosferę tej współpracy;

Dr hab. **Jerzego Sadowskiego** z Instytutu Uprawy, Nawożenia i Gleboznawstwa we Wrocławiu za pomoc w realizacji badań nad hydrolizą aminoestrów, udostępnienie sprzętu i pomoc w interpretacji wyników;

Dr **Marii Radomskiej** i dr **Ryszarda Radomskiego** z Instytutu Chemii Fizycznej i Teoretycznej Politechniki Wrocławskiej za pomoc w wyznaczeniu zasadowości badanych aminoestrów;

Prof. **Kazimierze Annie Wilk**, dzięki której określenie powierzchniowo-czynnych właściwości amonoestrów było w ogóle możliwe;

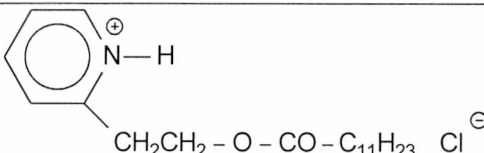
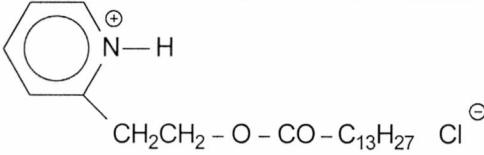
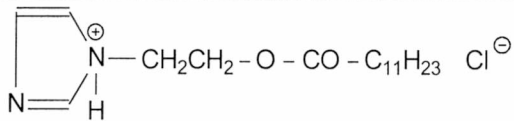
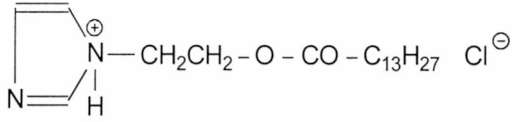
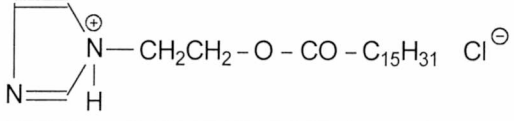
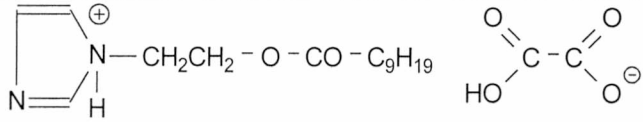
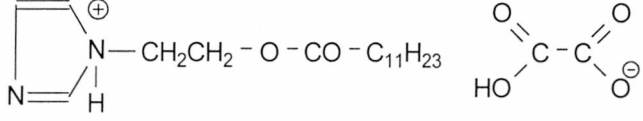
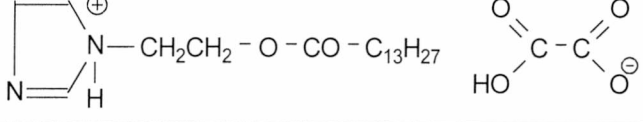
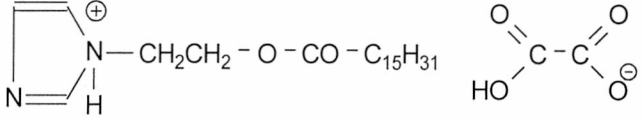
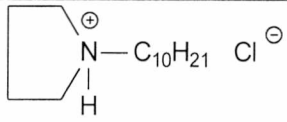
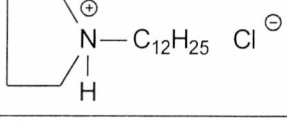
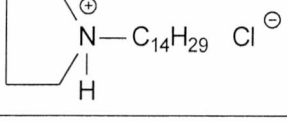
I wreszcie wszystkich **Kolegów** z Zespołu, którzy wspierali mnie przy realizacji mej rozprawy i pomagali tam, gdzie było to ich zdaniem potrzebne.

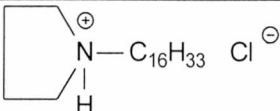
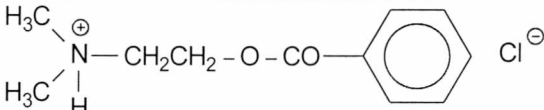
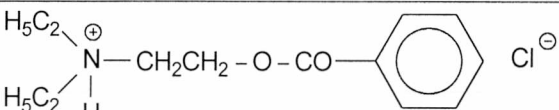
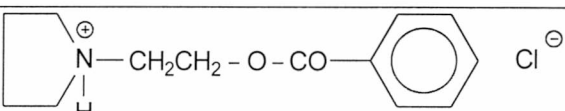
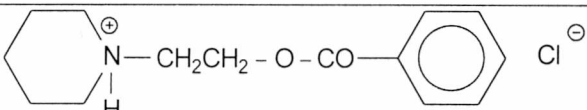
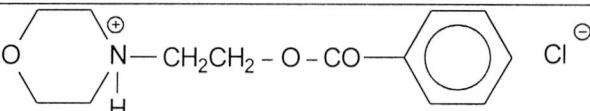
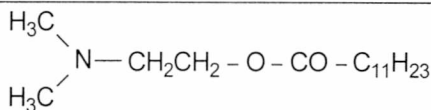
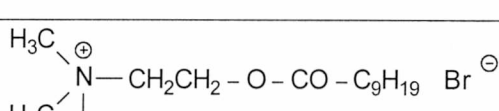
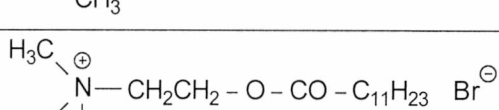
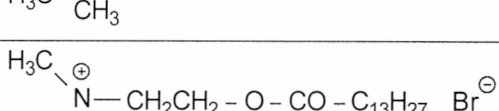
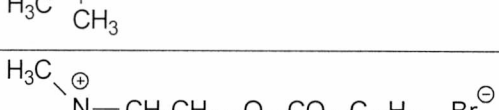
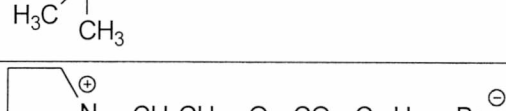
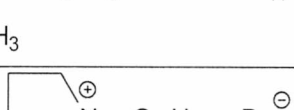
APPENDIX

WYKAZ ZSYNTEZOWANYCH ZWIĄZKÓW

(objaśnienie symboli stosowanych w tekście)

Lp	SYMBOL	STRUKTURA
1	DM-9	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C} \\ \diagup \\ \text{N}^+ \\ \diagdown \\ \text{H}_3\text{C} \\ \\ \text{H} \end{array} - \text{CH}_2\text{CH}_2 - \text{O} - \text{CO} - \text{C}_9\text{H}_{19} \quad \text{Cl}^-$
2	DM-11	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C} \\ \diagup \\ \text{N}^+ \\ \diagdown \\ \text{H}_3\text{C} \\ \\ \text{H} \end{array} - \text{CH}_2\text{CH}_2 - \text{O} - \text{CO} - \text{C}_{11}\text{H}_{23} \quad \text{Cl}^-$
3	DM-13	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C} \\ \diagup \\ \text{N}^+ \\ \diagdown \\ \text{H}_3\text{C} \\ \\ \text{H} \end{array} - \text{CH}_2\text{CH}_2 - \text{O} - \text{CO} - \text{C}_{13}\text{H}_{27} \quad \text{Cl}^-$
4	DM-15	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C} \\ \diagup \\ \text{N}^+ \\ \diagdown \\ \text{H}_3\text{C} \\ \\ \text{H} \end{array} - \text{CH}_2\text{CH}_2 - \text{O} - \text{CO} - \text{C}_{15}\text{H}_{31} \quad \text{Cl}^-$
5	DE-11	$\begin{array}{c} \text{H}_5\text{C}_2 \\ \diagup \\ \text{N}^+ \\ \diagdown \\ \text{H}_5\text{C}_2 \\ \\ \text{H} \end{array} - \text{CH}_2\text{CH}_2 - \text{O} - \text{CO} - \text{C}_{11}\text{H}_{23} \quad \text{Cl}^-$
6	DE-13	$\begin{array}{c} \text{H}_5\text{C}_2 \\ \diagup \\ \text{N}^+ \\ \diagdown \\ \text{H}_5\text{C}_2 \\ \\ \text{H} \end{array} - \text{CH}_2\text{CH}_2 - \text{O} - \text{CO} - \text{C}_{13}\text{H}_{27} \quad \text{Cl}^-$
7	PY-11	$\begin{array}{c} \text{ } \\ \diagup \\ \text{N}^+ \\ \diagdown \\ \text{H} \end{array} - \text{CH}_2\text{CH}_2 - \text{O} - \text{CO} - \text{C}_{11}\text{H}_{23} \quad \text{Cl}^-$
8	PY-13	$\begin{array}{c} \text{ } \\ \diagup \\ \text{N}^+ \\ \diagdown \\ \text{H} \end{array} - \text{CH}_2\text{CH}_2 - \text{O} - \text{CO} - \text{C}_{13}\text{H}_{27} \quad \text{Cl}^-$
9	PP-11	$\begin{array}{c} \text{ } \\ \diagup \\ \text{N}^+ \\ \diagdown \\ \text{H} \end{array} - \text{CH}_2\text{CH}_2 - \text{O} - \text{CO} - \text{C}_{11}\text{H}_{23} \quad \text{Cl}^-$
10	PP-13	$\begin{array}{c} \text{ } \\ \diagup \\ \text{N}^+ \\ \diagdown \\ \text{H} \end{array} - \text{CH}_2\text{CH}_2 - \text{O} - \text{CO} - \text{C}_{13}\text{H}_{27} \quad \text{Cl}^-$
11	MR-11	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \diagup \\ \text{N}^+ \\ \diagdown \\ \text{H} \end{array} - \text{CH}_2\text{CH}_2 - \text{O} - \text{CO} - \text{C}_{11}\text{H}_{23} \quad \text{Cl}^-$
12	MR-13	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \diagup \\ \text{N}^+ \\ \diagdown \\ \text{H} \end{array} - \text{CH}_2\text{CH}_2 - \text{O} - \text{CO} - \text{C}_{13}\text{H}_{27} \quad \text{Cl}^-$

13	MO-11	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C} \\ \\ \text{H}_{17}\text{C}_8 - \text{N}^+ - \text{CH}_2\text{CH}_2 - \text{O} - \text{CO} - \text{C}_{11}\text{H}_{23} \\ \\ \text{H} \end{array} \quad \text{Cl}^-$
14	PI-11	
15	PI-13	
16	IM-11	
17	IM-13	
18	IM-15	
19	IM-9s	
20	IM-11s	
21	IM-13s	
22	IM-15s	
23	PYL-10	
24	PYL-12	
25	PYL-14	

26	PYL-16	
27	DMB	
28	DEB	
29	PYB	
30	PPB	
31	MRB	
32	DM_w-11	
33	DMM-9	
34	DMM-11	
35	DMM-13	
36	DMM-15	
37	PYM-11	
38	PYLM-12	

STOSOWANE MATERIAŁY

chlorek kwasu dekanowego, 98%	Aldrich-Chemical Co. Ltd.
chlorek kwasu laurynowego, 98%	Aldrich-Chemical Co. Ltd.
chlorek kwasu mirystynowego, 97%	Aldrich-Chemical Co. Ltd.
chlorek kwasu palmitynowego, 98%	Aldrich-Chemical Co. Ltd.
chlorek benzoilu, 99%	Aldrich-Chemical Co. Ltd.
dimetyloaminoetanol	MERCK
dietyloaminoetanol	FLUKA AG
N-(2-hydroksyetylo)piperidyna, 99%	Aldrich-Chemical Co. Ltd.
N-(hydroksyetylo)morfolina, 99%	Aldrich-Chemical Co. Ltd.
N-(hydroksyetylo)pirolidyna	Aldrich-Chemical Co. Ltd.
2-(2-hydroksyetylo)pirydyna	Aldrich-Chemical Co. Ltd.
pirolidyna	Aldrich-Chemical Co. Ltd.
bromek metylu	SYNCHEMICA
bromek decylowy, 97%	Fluka AG
bromek dodecylowy, 97%	Fluka AG
bromek tetradecylowy, 97%	Fluka AG
bromek heksadecylowy, 97%	Fluka AG
chlorohydryna etylenowa	Fluka AG
imidazol cz.	Koch-Light Laboratories LTD
kwas szczawiowy cz.d.a.	„POCh” S.A. Gliwice
eter dietylowy cz.d.a.	LACHEMA
chloroform cz.d.a.	POCH Gliwice
aceton cz.d.a.	POCH Gliwice
n-heksan cz.	POCH Gliwice
kwas solny 36% cz.d.a.	PPH „Standard” Lublin
kwas siarkowy 95-97% cz.d.a.	MERCK KGaA
wodorotlenek sodu cz.d.a.	POCH Gliwice
kwaśny węglan sodu cz.d.a.	POCH Gliwice
węglan potasu bezw. cz.d.a.	POCH Gliwice
siarczan magnezu bezwodny cz.d.a.	POCH Gliwice
sód metaliczny	REACHIM
wodorek wapnia, 95%	Aldrich-Chemical Co. Ltd.

